



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SINTESI DI NUOVI POSSIBILI CHELANTI
PER RADIOFARMACI A BASE DI RAME E RADIO**

Relatore: Prof. Valerio Di Marco

Correlatore: Prof. Fabrizio Mancin

Controrelatore: Prof. Saverio Santi

LAUREANDO: Franco Giacomo

ANNO ACCADEMICO: 2022/2023

INDICE

INDICE	III
RIASSUNTO	VII
ABSTRACT	IX
CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	1
1.1 RADIOFARMACI	1
1.2 RADIONUCLIDI	3
1.2.1 Radioattività	3
1.2.1.1 Decadimento α	4
1.2.1.2 Decadimenti β	4
1.2.1.3 Decadimento γ e conversione interna	5
1.2.2 Radionuclidi diagnostici	6
1.2.2.1 Positron Emission Tomography (PET)	7
1.2.2.2 Single-Photon Emission Computed Tomography	7
1.2.3 Radionuclidi terapeutici	8
1.2.4 Radionuclidi teranostici	9
1.3 RADIOMETALLI	10
1.3.1 Rame in radiofarmacia	11
1.3.2 RADIO-223	12
1.4 CHELANTI BIFUNZIONALI	15
1.4.1 Classi di Chelanti	17
1.4.1.1 Chelanti aciclici	17
1.4.1.2 Chelanti macrociclici	20
1.5 LINKER	25
1.6 TARGETING AGENT	28
1.6.1 Anticorpi	28
1.6.2 Peptidi	29
1.6.3 Altre biomolecole e agenti di targeting	29

CAPITOLO 2-SCOPO DELLA TESI.....	31
CAPITOLO 3-TENTATIVI DI SINTESI	33
3.1 DO4NH ₂	33
3.1.1 Tentativo 1	33
3.1.2 Tentativo 2	35
3.1.3 Tentativo 3	37
3.2 CHELANTI PER IL RADIO	43
3.2.1 MOLECOLA 1	43
3.2.2 MOLECOLA 2	44
CAPITOLO 4-CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	47
CAPITOLO 5-PARTE SPERIMENTALE	51
5.1 MATERIALI E REAGENTI	51
5.2 STRUMENTAZIONE	51
5.3 PROCEDURE SINTETICHE	52
5.3.1 Sintesi 2-[4,7,10-tris(carbometil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-ile] acetammide (1)	52
5.3.2 Sintesi 4,7,10-tris-cianometil-1,4,7,10-tetraaza-ciclododec-1-ile-acetonitrile (3).....	53
5.3.3 Sintesi N-(2-cloroetil)-O-pivaloilidrossilammina (13).....	54
5.3.4 Sintesi del ((1,4,7,10-tetraaciclododecano- 1,4,7,10 -tetraol) tetrakis (etan-2,1-diol)) tetracarbammato (14)	55
5.3.5 Sintesi [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina)] (DO4NH ₂) (15).....	57
5.3.6 Sintesi di dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato (16)	58
5.3.7 Sintesi di dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato (17)	59
5.3.8 Sintesi di metile 6-(clorometil)picolinato (18)	60
5.3.9 Sintesi N,N'-bis[(6-metossicarbossi 2-piridil)metil]-4,13-diaza-18-corona-6 (19).....	61

5.3.10 Sintesi acido 6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene))dipicolinico (macropa)	63
5.3.11 Sintesi di 2-(clorometil)piridina 1-ossido (20)	64
5.3.12 Sintesi dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato	65
5.3.13 Sintesi tetraetile (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo))bis(fosfonato) (20)	67
5.3.14 Sintesi acido (6,6'- ((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis (metilene)) bis(piridina-6,2-diolo)) difosfonico (macrophospho)	69
APPENDICE	71
BIBLIOGRAFIA.....	89

RIASSUNTO

Il progetto di tesi prevede la sintesi di alcune molecole di potenziale interesse nell'ambito dei radiofarmaci. Si tratta di chelanti, molecole organiche solitamente costituite da atomi di carbonio, ossigeno e azoto, la cui funzione è quella di chelare ioni radioattivi, i quali vengono utilizzati in medicina oncologica nucleare per la diagnosi e/o la terapia di malattie principalmente a carattere tumorale. Nei radiofarmaci questa molecola viene funzionalizzata con un gruppo affinché possa legarsi ad un *targeting-agent* tramite un *linker* (spaziatore), ottenendo così il chelante bifunzionale. I progressi nello studio e nella ricerca radiofarmacologica hanno permesso di disegnare e sintetizzare nuovi chelanti ritenuti utili per chelare radionuclidi "sconosciuti" nel campo medico, come quelli di rame(II) e radio(II). Il primo chelante sintetizzato è il DO4NH₂ [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina)], una nuova molecola che si suppone possa chelare radionuclidi di tipo *bordeline*, come appunto Cu(II). In seguito a diverse prove, la via sintetica che si è rivelata più proficua per la produzione del DO4NH₂ prevede tre passaggi principali: una prima protezione della 2-cloroetilammina con di-ter-butile dicarbonato, successiva N-alchilazione del cyclen con terz-butile (2-cloroetil) carbammato, ed infine deprotezione del ter-butilossicarbonile (BOC).

Sono stati poi sintetizzati altri due chelanti che invece potrebbero essere utilizzati nei radiofarmaci a base di Ra(II): l'acido 6,6'-[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene)]dipicolinico (Macropa) e l'acido {6,6'-[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo) bis (metilene)] bis (piridin-6,2-diolo)} difosfonico (Macrophospho).

In prospettiva, saranno svolte alcune caratterizzazioni analitiche al fine di determinare le costanti di acidità dei chelanti e quelle di complessamento con gli ioni Cu(II) e Ra(II).

ABSTRACT

This thesis project involves the synthesis of some molecules of potential interest in the field of radiopharmaceuticals. These molecules are chelators, organic compounds usually composed by carbon, oxygen and nitrogen atoms, whose function is to chelate radioactive ions, which are used in nuclear oncology medicine for the diagnosis and/or therapy of mainly tumour-related diseases. In radiopharmaceuticals, the chelator is functionalised with a group so that it can bind to a targeting-agent via a linker (spacer), thus obtaining the bifunctional chelator. Advances in radiopharmacological studies and research have made it possible to design and synthesize new chelators considered useful for chelating 'unknown' radionuclides in the medical field, such as copper(II) and radium(II). The first chelator synthesized is DO4NH₂ [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(2-ethylamine)], a new molecule that is supposed to chelate borderline-type radionuclides, such as Cu(II). Following several trials, the synthetic route that proved to be most fruitful for the production of DO4NH₂ involves three main steps: an initial protection of 2-chloroethylamine with di-tert-butyl dicarbonate, subsequent N-alkylation of cyclen with tert-butyl (2-chloroethyl) carbamate, and finally deprotection of tert-butyloxycarbonyl (BOC).

Two other chelators were then synthesized that could be used in Ra(II)-based radiopharmaceuticals: 6,6'-[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diol)bis(methylene)]dipicolinic acid (MACROPA) and {6,6'-[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane-7,16-diol) bis(methylene)] bis(pyridin-6,2-diol)} diphosphonic acid (MACROPHOSPHO).

Looking forward, some analytical characterizations will be carried out in order to determine the acidity constants of the chelators and the stability constants of the complexes formed with Cu(II) and Ra(II) ions.

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

La ricerca di nuovi radiofarmaci è in continua evoluzione e coinvolge diverse discipline come la chimica inorganica, la radiochimica, la chimica organica, la biochimica, la farmacologia, la medicina nucleare e la fisica. I radiofarmaci sono utilizzati per l'*imaging* non invasivo e per la terapia di numerose malattie e in particolare del cancro. L'obiettivo dell'*imaging* è quello di ottenere informazioni sullo stato funzionale di un tessuto e di rilevare la presenza della malattia, mentre l'obiettivo della terapia è quello di trattarla. Il cuore del radiofarmaco sono i radiometalli che hanno specifiche proprietà fisiche quali l'emivita, l'energia di emissione delle radiazioni, il tipo di radiazione (γ , β^+ , β^- , Auger e α), e la disponibilità/capacità chimica di coordinare con i chelanti [1]; tali proprietà dipendono dal fatto che il farmaco sia usato per l'*imaging* o per la terapia.[9]

1.1 RADIOFARMACI

I radiofarmaci, molecole radiomarcate, grazie alla loro elevata specificità vengono utilizzate in medicina nucleare sia in ambito diagnostico che terapeutico.

Diagnosticamente si sfrutta l'emissione di radiazioni elettromagnetiche (raggi γ), la cui rilevazione consente di localizzare e semi-quantificare il radiofarmaco nell'organismo. Terapeuticamente, le radiazioni ionizzanti emesse dal decadimento del radionuclide vengono utilizzate per distruggere le cellule malate.[2][3]

È utile sottolineare che le somministrazioni di radiofarmaci, avendo dosi molto inferiori a quelle dei farmaci usuali, non generano effetti biochimici aspecifici al di fuori del bersaglio.[4]

I radiofarmaci si dividono in due grandi classi, differenziate per la strategia di incorporazione dei radionuclidi: quelli di derivazione organica e quelli a base di metalli. I radiofarmaci di derivazione organica includono radionuclidi non metallici, ad esempio ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{123}I , che si legano alla molecola organica mediante la formazione di legami covalenti. Le applicazioni risultano essere limitate a causa delle brevi emivite e delle scarse caratteristiche di decadimento dei radionuclidi "organici". I radiofarmaci *metal-based* contengono invece radionuclidi metallici, i quali possiedono delle caratteristiche di decadimento molto più variegata rispetto ai radionuclidi organici, e quindi risultano potenzialmente molto più versatili.

Esistono due categorie principali di radiofarmaci *metal-based*: *metal-essential* e *metal-nonessential*. nei radiofarmaci metallo-essenziali, il radiometallo è determinante per dirigere l'agente verso il bersaglio biologico. Sono semplici da sintetizzare ma difficili da derivatizzare. Diversamente, per i radiofarmaci metallo-non essenziali la chimica di coordinazione ad opera di un chelante bifunzionale svolge un ruolo fondamentale nell'inglobare il radionuclide metallico all'interno del farmaco, la cui distribuzione nell'organismo non dipende quindi dal tipo di metallo che viene coordinato. [5][6]

Come si evince dalla Figura 1.1 la struttura dei radiofarmaci *metal-based* è descritta da quattro parti differenti: radiometallo, chelante, *linker* e bioconiugato (molecola direzionante). Ogni componente può essere modificato per modulare la funzione del farmaco, offrendo un enorme potenziale per la scoperta di farmaci “*plug-and-play*”. [5] La funzione diagnostica/terapeutica dipende dalle proprietà di decadimento del radiometallo. [5] Il chelante si coordina stabilmente al metallo, [6] mentre la biomolecola direzionante ha il compito di accumulare il farmaco nelle cellule bersaglio. [5]

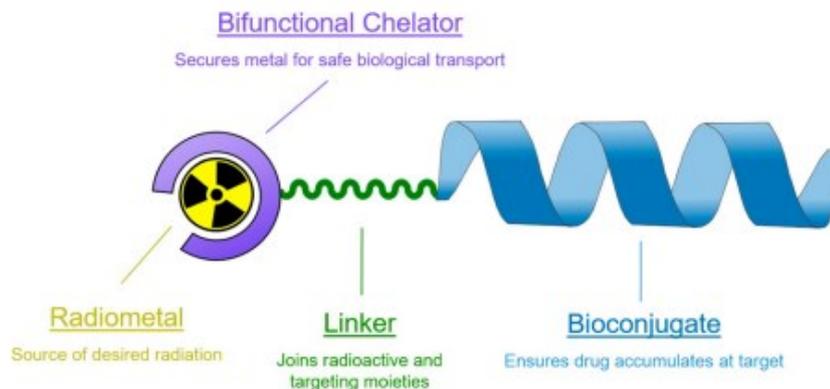


Figura 1.1 Struttura schematica di un radiofarmaco *metal-based* [5]

1.2 RADIONUCLIDI

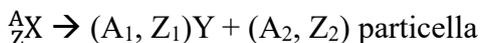
Il nuclide viene definito come un atomo con numero atomico Z e numero di neutroni N : il numero totale di protoni e neutroni costituisce il numero di massa A . Il nuclide è rappresentato come A_ZX_N .

Gli atomi dello stesso elemento con numero diverso di neutroni sono chiamati isotopi. Gli elementi possono infatti avere diversi isotopi, la maggior parte dei quali sono instabili. Affinché il nucleo sia stabile, nella maggior parte dei casi il numero di neutroni dovrebbe essere uguale o leggermente superiore al numero di protoni. Se il numero di neutroni è sbilanciato, il nucleo ha un eccesso di energia che, prima o poi, verrà scaricata attraverso processi di decadimento, emettendo raggi γ o particelle subatomiche. Un atomo che presenta un nucleo sbilanciato/instabile viene quindi definito radioattivo, nuclide o radionuclide. I radionuclidi sono presenti in natura ma possono anche essere prodotti artificialmente.[10]

1.2.1 Radioattività

La radioattività, ovvero il decadimento radioattivo o trasmutazione radioattiva, è un fenomeno di trasformazione nucleare spontanea di radionuclidi. Può comportare l'emissione di particelle (α , β^- , β^+), o di radiazione γ , oppure (meno comunemente) si possono verificare anche la cattura di elettroni o l'emissione di protoni o di altri frammenti.

Il processo di decadimento può essere descritto come segue:



Dove X è il nuclide "genitore" e Y è il nuclide "figlio".

Il decadimento è solitamente accompagnato dall'emissione di radiazioni γ . L'energia rilasciata (processo esoergonico) è dovuta al fatto che il nucleo primario ha una massa (e quindi energia) maggiore della somma delle masse (e quindi energia) dei prodotti del decadimento. [10]

Ogni nuclide radioattivo è caratterizzato da una propria emivita $T_{1/2}$, che rappresenta il tempo necessario affinché il numero di atomi diminuisca fino alla metà del valore iniziale. L'emivita è quindi correlata alla costante di decadimento attraverso l'equazione:

$$T = \ln 2 / \lambda, \text{ da cui } T = 0.693 / \lambda$$

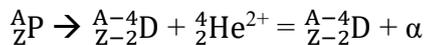
La quantità che caratterizza la velocità del decadimento radioattivo è chiamata attività (o attività emittente). L'attività A è definita come il numero di decadimenti per unità di tempo, o la perdita del numero di nuclei non ancora decaduti per unità di tempo:

$$A_t = -dN_t/dt = \lambda N_t$$

L'unità di un'attività è il becquerel (Bq), che rappresenta una disintegrazione al secondo.[10]

1.2.1.1 Decadimento α

Nel decadimento α , un nucleo genitore (P) decade in un nucleo figlio (D), emettendo una particella α . Simbolicamente il processo può essere scritto come segue:

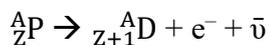


La particella α è un atomo di He; nel decadimento il numero atomico Z del genitore diminuisce di due e il suo numero di massa atomica A diminuisce di quattro.

Le particelle α sono poco penetranti ma sono altamente cariche (+2) e quindi molto dannose. [10][11]

1.2.1.2 Decadimenti β

I decadimenti β possono essere di due tipi: β^- e β^+ . Nel primo caso il nucleo genitore *neutron-rich* trasforma un neutrone in un protone, emettendo un elettrone (e^-) e un antineutrino elettronico ($\bar{\nu}_e$). Il numero atomico del figlio (D) aumenta di uno, mentre il numero di massa rimane costante:

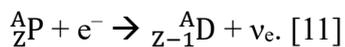


Nel secondo caso, il nucleo genitore *proton-rich* trasforma un protone in un neutrone, emettendo un positrone (e^+) e un neutrino elettronico (ν_e). Il numero atomico del figlio (D) diminuisce di uno, il numero di massa rimane costante:



I radionuclidi che subiscono un decadimento β^+ sono chiamati emettitori di positroni e sono utilizzati in medicina per l'*imaging* PET.

Un fenomeno simile all'emissione β si può avere nella cattura elettronica, che si verifica quando un protone cattura un elettrone dei gusci circostanti, trasformandosi in un neutrone, provocando l'espulsione di un neutrino elettronico (ν_e). Il numero atomico del figlio (D) diminuisce di uno e il numero di massa rimane costante:



1.2.1.3 Decadimento γ e conversione interna

Sia il decadimento α che quelli β producono un nucleo figlio (D) in uno stato energetico eccitato, il quale decadrà (istantaneamente o con un certo ritardo) in uno stato fondamentale. Il decadimento può aver luogo mediante emissione dell'energia di eccitazione sotto forma di uno o più fotoni γ (decadimento γ), oppure trasferendo l'energia a uno degli orbitali atomici (conversione interna). La vacanza, mediata da un elettrone in un guscio elettronico interno, viene riempita da una transizione proveniente da un guscio elettronico esterno, dando luogo all'emissione di raggi X e/o di elettroni Auger.[11]

La Figura 1.2 mostra un riassunto dei diversi tipi di decadimento e le loro possibili applicazioni in medicina nucleare.

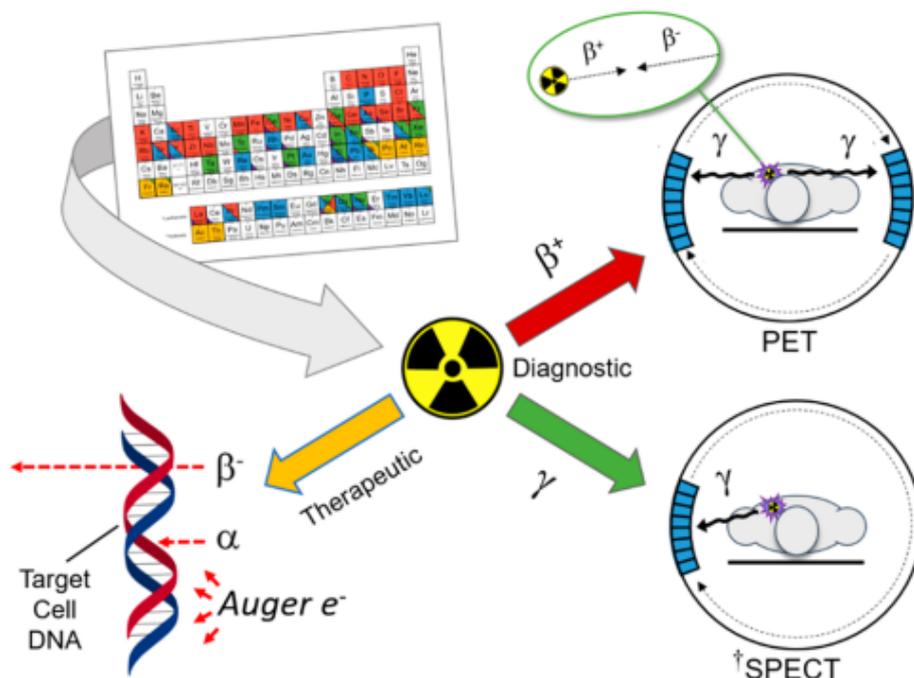


Figura 1.2 Tipi di decadimento radioattivi e relative applicazioni in medicina nucleare. [5]

1.2.2 Radionuclidi diagnostici

I radionuclidi diagnostici emettono direttamente o producono indirettamente fotoni, che vengono rilevati da materiale ad alta densità per produrre rappresentazioni spaziali della distribuzione del farmaco in vivo.

I principali criteri per l'uso diagnostico sono:

- elevata efficienza di rivelazione del radionuclide, compatibile con la più bassa dose di radiazioni possibile al paziente;
- selettività per gli organi/tessuti bersaglio e biocompatibilità.

Le modalità di *imaging* più diffuse sono la tomografia a emissione di positroni (PET) e la tomografia computerizzata a emissione di fotoni singoli (SPECT).

Queste tecniche sono utilizzate per analizzare le disfunzioni biochimiche come segni precoci della malattia, i suoi meccanismi e l'associazione con gli stati patologici, dal cancro alle malattie cardiovascolari e ai disturbi mentali. [5][12][13][14]

1.2.2.1 Positron Emission Tomography (PET)

L'*imaging* PET utilizza emettitori di positroni β^+ . Questi, pochi nanometri dopo l'emissione, collidono con elettroni vicini e si annichilano. Il processo porta all'emissione simultanea di due fotoni γ in direzioni opposte (180°), con un'energia caratteristica di 511 keV . Gli scanner rilevano questi raggi γ simultanei mentre metodi computazionali sono in grado di calcolare con precisione la posizione del radiotracciante, determinando il punto di annichilazione. L'elevata concentrazione del radiotracciante nei tumori e la bassa attività di fondo facilitano l'acquisizione di immagini ad alta risoluzione.

Il radiotracciante PET di gran lunga più utilizzato oggi è l'analogo del glucosio, il ^{18}F -fluorodeossiglucosio, che grazie alla sua somiglianza col glucosio ha una spontanea propensione a essere assunto selettivamente dai tumori in crescita aggressiva.

La PET risulta essere più rapida e avere maggiore risoluzione rispetto alla SPECT. [15][16][12]

1.2.2.2 Single-Photon Emission Computed Tomography

La SPECT si basa sulla rilevazione dei raggi γ , emessi dai radionuclidi, attraverso fenomeni di cattura elettronica. Restituisce immagini tridimensionali per produrre rappresentazioni più orientate nello spazio del comportamento del tracciante. I raggi γ a bassa energia ($100\text{-}250 \text{ keV}$) sono ideali per la SPECT. Questa tecnica viene utilizzata principalmente per visualizzare il flusso sanguigno attraverso vene e arterie e per eseguire una valutazione prechirurgica delle crisi epilettiche. È utile anche nella diagnosi di ischemie (aree cerebrali prive di sangue), fratture da stress della colonna vertebrale (spondilolisi) e tumori. Il radionuclide più frequentemente utilizzato per l'*imaging* della perfusione cardiaca è il $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Rispetto alla PET, trova un uso molto più ampio grazie ai costi notevolmente inferiori dei radionuclidi, della strumentazione e dell'operazione. [5][12][17]

1.2.3 Radionuclidi terapeutici

I radionuclidi terapeutici sono utilizzati per uccidere cellule attraverso le radiazioni ionizzanti emesse al decadimento.

Inducono principalmente i loro effetti citotossici attraverso un danno irreversibile al DNA, con conseguenti delezioni, aberrazioni cromosomiche e morte cellulare. Il danno al DNA può essere ottenuto con l'emissione di particelle beta (β^-), alfa (α) o elettroni Auger (Figura 1.2). L'efficacia di danneggiamento, per una particella emessa, dipende dal suo trasferimento di energia lineare (LET), che è una misura della ionizzazione/eccitazione dell'atomo per unità di lunghezza, riportata in $keV/\mu m$. Particelle con LET elevato sono altamente ionizzanti, e depositano la loro energia su distanze brevi assicurando danni biologici e/o chimici nel trattamento di piccoli tumori e micrometastasi. Le particelle con basso LET percorrono invece distanze più lunghe nei tessuti, garantendo una maggior portata tissutale. Questo è utile per il trattamento di tumori di grandi dimensioni, ma gli effetti tossici possono essere indotti anche su siti non target. [18][19][3]

Le particelle β^- hanno un'energia variabile (0.1-2.2 MeV) e un LET basso ($0.2 keV/\mu m$). Gli emettitori β^- a bassa energia, come il ^{177}Lu , sono molto studiati grazie al loro intervallo di decadimento più basso rispetto agli emettitori β^- ad alta energia (ad esempio ^{90}Y). Le particelle α hanno invece energie elevate (5-8 MeV) e un LET estremamente elevato ($\sim 80 keV/\mu m$), con conseguente basso intervallo di decadimento (40-100 μm ; meno di 10 diametri cellulari). La loro natura altamente ionizzante e il breve intervallo di decadimento nei tessuti vengono sfruttate per sviluppare nuove tecniche come la terapia alfa mirata (*targeted alpha therapy*, TAT), che ha provato ad esempio ad utilizzare il radionuclide ^{225}Ac , [20][21] tuttavia finora senza grandi successi.

Gli elettroni Auger sono particelle a bassa energia (1-10 KeV) con elevato LET (4-26 $keV/\mu m$), che si traduce con una bassa penetrazione nei tessuti (1-20 μm , spesso inferiore del diametro di una singola cellula). Gli effetti sui tessuti circostanti, rispetto al bersaglio, sono inesistenti. Gli elettroni Auger possono quindi essere utilizzati per trattare le metastasi tumorali di una singola cellula. Il loro utilizzo in campo terapeutico è però limitato dalla necessità di sviluppare un radiofarmaco in grado di direzionare il radionuclide nelle cellule tumorali o nel nucleo stesso. [22]

1.2.4 Radionuclidi teranostici

Gli agenti teranostici si basano sull'utilizzo combinato di isotopi che permettono di effettuare sia la diagnosi che la terapia. Alcuni radionuclidi, emettendo diversi tipi di radiazioni contemporaneamente, sono intrinsecamente teranostici. Più in generale, invece, gli agenti teranostici sono composti da coppie di radioisotopi, chimicamente identici, con emivite simili ed emissioni complementari. In questo modo, le modalità di decadimento diagnostico e terapeutico sono ottimali e i radioisotopi presentano un comportamento biochimico identico. Per una dosimetria accurata, il comportamento in vivo dei radionuclidi terapeutici e diagnostici deve coincidere. Al contrario l'utilizzo di coppie non chimicamente identiche (ad esempio ^{111}In per l'imaging/ ^{90}Y per la terapia) porta a far sì che le informazioni diagnostiche siano meno rappresentative della distribuzione della dose terapeutica.

I radionuclidi diagnostici e terapeutici devono essere prontamente disponibili, cioè, possono essere prodotti in più sedi, con costi ragionevoli e possono essere distribuiti su larga scala. [23][24]

1.3 RADIOMETALLI

I radiometalli sono radionuclidi con proprietà metalliche. Le proprietà di decadimento, le applicazioni e la produzione dei radiometalli utilizzati oggi giorno in radiofarmacia sono illustrate nella Tabella 1.1.[5]

Tabella 1.1 Radionuclidi oggi giorno più utilizzati con i loro percorsi produttivi, parametri di decadimento e applicazioni [25]

radionuclide	production	half life (h)	decay mode and branching	average energy of decay particle (keV) ^a	max gamma energy (keV) (intensity %)	application
⁴⁴ Sc	⁴⁴ Ca(p,n) ⁴⁴ Sc	4.04	β^+ (94%)	632	1157 (100%)	PET
	⁴⁴ Ti/ ⁴⁴ Sc generator		EC (6%)			
⁴⁷ Sc	⁴⁷ Ti(n,p) ⁴⁷ Sc	80.4	β^- (100%)	162	159 (68%)	β^- therapy SPECT
	⁴⁰ Ca(n, γ) ⁴⁷ Ca \rightarrow ⁴⁷ Sc					
⁶⁶ Ga	⁶⁶ Zn(p,n) ⁶⁶ Ga	9.49	β^+ (57%) EC (43%)	1747	1039 (37%) 2752 (23%)	PET
⁶⁷ Ga	⁶⁷ Zn(p,n) ⁶⁷ Ga	78.2	EC (100%)	Auger: 6.3 ^b	93 (39%)	SPECT
			4.7 e ⁻ /decay ^b		185 (21%) 300 (17%)	
⁶⁸ Ga	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga generator	1.13	β^+ (89%) EC (11%)	830		PET
⁸⁶ Y	⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y	14.7	β^+ (32%)	664	777 (22%)	PET
			EC (68%)		1077 (83%) 1153 (31%)	
⁹⁰ Y	⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y generator	64.0	β^- (100%)	934		β^- therapy
^{110m} In	¹¹⁰ Cd(p,n) ^{110m} In	1.15	β^+ (61%)	1011	658 (98%)	PET
			EC (39%)			
¹¹¹ In	¹¹¹ Cd(p,xn) ¹¹¹ In	67.2	EC (100%)	Auger: 6.8 ^b	245 (94%)	SPECT
			14.7 e ⁻ /decay ^b		171 (91%)	
^{114m} In	¹¹⁴ Cd(p,n) ^{114m} In	1188	IT (97%)		190 (16%)	Auger electron therapy
¹⁴⁰ Tb	spallation of Ta-foil	4.12	α (17%)	α : 3970	165 (26%)	α therapy
			β^- (7%)	β^- : 728	352 (29%)	
			EC (76%)		389 (18%) 817 (12%) 853 (16%)	
¹⁵² Tb	spallation of Ta-foil	17.5	β^+ (20%)	1142	344 (64%)	PET
			EC (80%)			
¹⁵⁸ Tb	spallation of Ta-foil	128	EC (100%)		87 (32%)	SPECT
					105 (25%)	
¹⁶¹ Tb	¹⁵⁹ Tb(p,5n) ¹⁵⁵ Dy \rightarrow ¹⁵⁵ Tb	165	β^- (100%)	β^- : 154	26 (23%)	β^- and Auger electron therapy
			12.4 e ⁻ /decay ^c	Auger: 46.5 ^c	49 (17%) 75 (10%) 208 (10%)	
¹⁷⁷ Lu	¹⁷⁶ Lu(n, γ) ¹⁷⁷ Lu	159	β^- (100%)	134	113 (6%) 208 (10%)	β^- therapy SPECT
			¹⁷⁶ Yb(n, γ) ¹⁷⁷ Yb \rightarrow ¹⁷⁷ Lu			
²¹² Bi	²²⁸ Th/ ²¹² Pb/ ²¹² Bi generator	1.01	α (36%)	α : 6210		α and β^- therapy
			β^- (64%)	α : 8780 (daughter) β^- : 771		
²¹³ Bi	²²⁵ Ac/ ²¹³ Bi generator	0.76	α (2%)	α : 8.35 MeV ^d (daughter)	440 (26%)	α and β^- therapy
			β^- (98%)	β^- : 435		
²²⁵ Ac	²²⁸ Th/ ²²⁵ Ac generator	238	α (100%)	α : 5.8–8.4 MeV ^d (chain average)		α therapy
			²²⁶ Ra(p,2n) ²²⁵ Ac			
	²³² Th(p,2p6n) ²²⁵ Ac					

^aRef 16; weighted average of average values. ^bRefs 18 and 19. ^cRef 20. ^dRef 21.

1.3.1 Rame in radiofarmacia

Tra tutti gli elementi disponibili per l'applicazione in medicina nucleare, i radionuclidi del rame (Cu) sono molto interessanti per l'imaging e per la terapia, in quanto essi sono soggetti a decadimenti β^- , β^+ e cattura di elettroni, sfruttati per la terapia, ma anche all'emissione di raggi gamma γ adoperati per l'imaging tomografico. Il rame, quindi, è estremamente promettente in quanto due suoi isotopi possono rappresentare delle coppie teranostiche. Le proprietà fisiche dei vari radionuclidi del rame sono elencate nella Tabella 1.4.

Tabella 1.2 Proprietà fisiche dei radionuclidi di rame per l'imaging e la terapia. [80]

Radionuclide	$t_{1/2}$ (h)	Decay (%)	E_p (keV)	E_{np} (keV)	R_{np} (mm)	Source
^{60}Cu	0.38	β^+ (93) EC (7)	511 1332	873	4.4	cyclotron
^{61}Cu	3.3	β^+ (62) EC (38)	511 283	527	2.6	cyclotron
^{62}Cu	0.16	β^+ (98) EC (2)	511	1315	6.6	generator/cyclotron
^{64}Cu	13	β^- (19) EC (41)	511 1346	278	1.4	reactor/cyclotron
^{66}Cu	0.09	β^- (100)		190 1109	0.95 5.6	reactor/cyclotron
^{67}Cu	62	β^- (100)	93	121	0.61	reactor/cyclotron

E_p = energy of the most abundant penetrating (γ) radiation following the corresponding decay.

E_{np} = average energy of the most abundant nonpenetrating (β^+/β^-) radiation.

R_{np} = average range of nonpenetrating radiation in tissue.

Tra i vari radionuclidi, il ^{62}Cu , il ^{64}Cu e il ^{67}Cu sono attualmente utilizzati in composti come il $^{62}\text{CuPTSM}$ (pirivaldeide-bis(N4-metiltiosemicarbazone)) e come radiomarcanti di anticorpi monoclonali.

In chimica gli stati di ossidazione predominanti del rame sono Cu(I) e Cu(II), ma Cu(I) risulta instabile in acqua secondo il seguente equilibrio:



In certe condizioni si può stabilizzare Cu(I) in acqua mediante la formazione di complessi ; per tale ione si devono utilizzare leganti altamente covalenti e facilmente polarizzabili, come tioeteri, fosfine, nitrili, ioni cianuro o idruro; viceversa, i complessi sono invece instabili e Cu(I) si dismuta; per evitare questi rischi, che porterebbero al rilascio di rame metallico radioattivo nell'organismo, attualmente la ricerca di radiofarmaci basati sul rame prevede che il metallo abbia stato di ossidazione (II). Per la formazione di complessi stabili con Cu(II) sono necessari leganti meno polarizzabili e con minor covalenza, in particolare leganti ossigenati e, ancora meglio, azotati [80].

Cu(II) ha una configurazione $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^9$, quindi è paramagnetico; quando il complesso legante-metallo è stabilizzato, il guscio d risulta insaturo, definendo così delle preferenze stereochimiche. I complessi di rame con numero di coordinazione quattro mostrano geometrie planari quadrate, tetraedriche e intermedie. Nei complessi ottaedrici e tetraedrici, la configurazione d^9 provoca una distorsione di Jahn-Teller, che si traduce nel primo caso in un allungamento assiale mentre nel secondo in una compressione tetragonale. [80]

1.3.2 RADIO-223

Il ^{223}Ra (emivita 11.4 giorni) potrebbe rappresentare un promettente alfa-emettitore utilizzabile nella TAT. Il radionuclide decade a ^{207}Pb stabile attraverso un percorso di disintegrazione con numerosi nuclei figli radioattivi, i quali producono particelle α . (Figura 1.5).[83][84]. Durante il processo vengono emesse anche particelle γ , consentendo l'*imaging*. L'energia media delle particelle nel decadimento del ^{223}Ra è di 5.7 MeV che, combinata per tutti i radionuclidi figli, è di 28.2 MeV.[85][86]

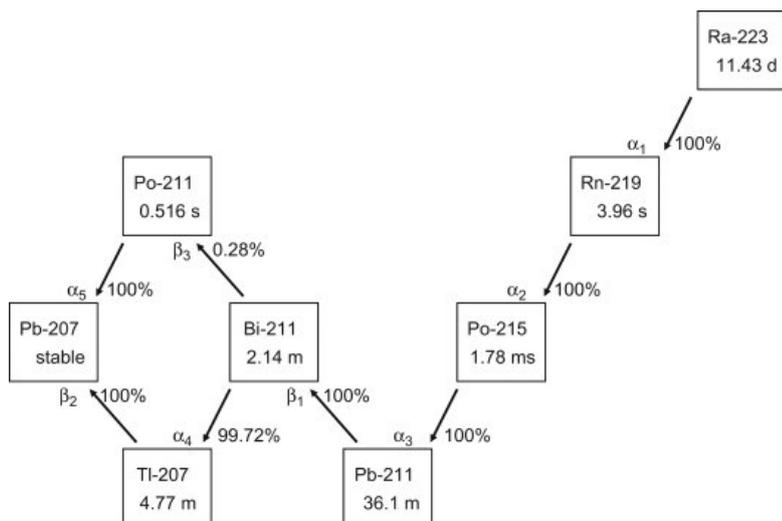


Figura 1.5 meccanismo decadimento del ^{223}Ra a ^{207}Pb stabile. [87]

Uno dei vantaggi di questo radionuclide è che esso è commercialmente disponibile come soluzione salina di cloruro di Radio (RaCl_2), venduta dalla Bayer HealthCare con il nome di Xofigo[®]. [81] Tale composto è in effetti in uso come radiofarmaco: il ^{223}Ra dicloruro è molto efficace per trattare il cancro alla prostata (carcinoma prostatico resistente alla castrazione); tuttavia, l'incorporazione del ^{223}Ra nella matrice ossea (nei siti di mineralizzazione attiva attraverso osteoblasti) è il principale svantaggio. Lo sviluppo di metastasi ossee provoca dolore, compressione del midollo spinale, fratture, riducendo così la qualità di vita dei pazienti (Figura 1.6). [82]

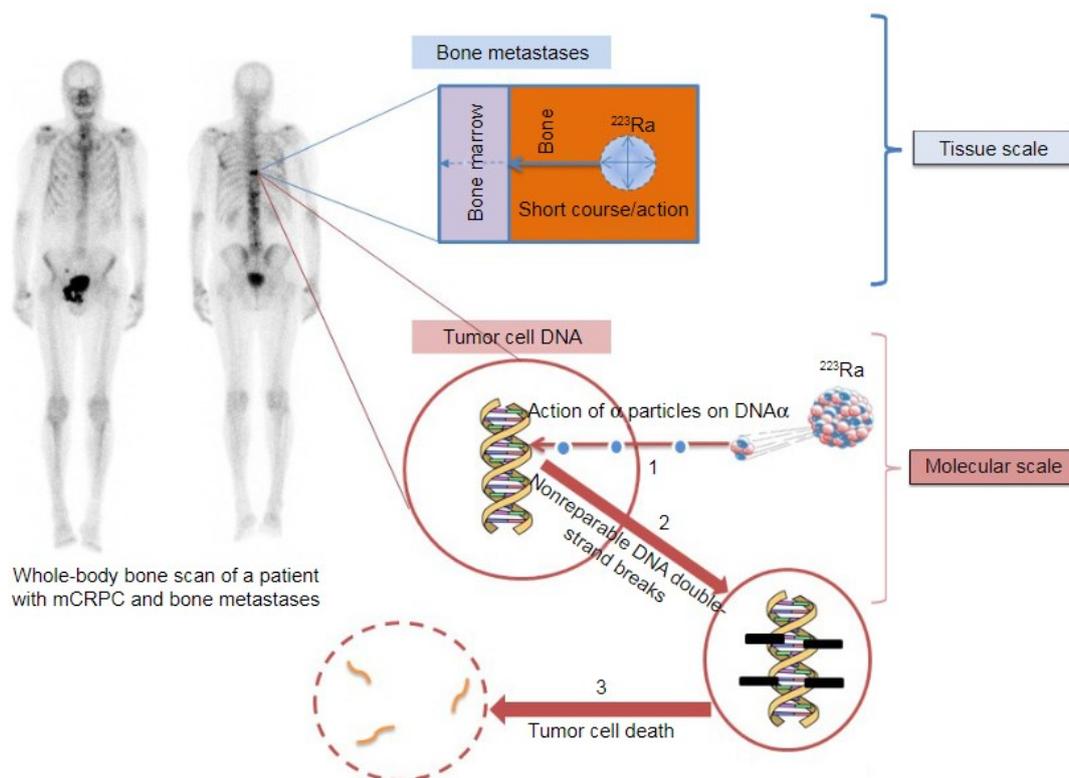


Figura 1.6 Meccanismo d'azione del ^{223}Ra nel trattamento mCRPC (cancro alla prostata metastatico resistente alla castrazione), ed effetto nelle metastasi ossee.[82]

Come detto in precedenza, il radionuclide, una volta iniettato per via endovenosa, viene assorbito nelle ossa (percentuale pari al 25%) attraverso i siti di mineralizzazione attiva con alta attività osteoblastica. [88] Viene poi espulso dall'apparato gastrointestinale, e solo l'1% dell'attività di esso rimane nel sangue 24 ore dopo l'iniezione.[89] [86] L'utilizzo del radionuclide per applicazioni diverse da quelle permesse dal Xofigo[®] richiede una strategia differente: l'uso di chelanti, come descritto nei paragrafi seguenti.

1.4 CHELANTI BIFUNZIONALI

Lo sviluppo di molecole in grado di formare forti legami coordinativi (*radiolabeling*) con i radiometalli è uno dei principali obiettivi nella sintesi dei radiofarmaci. Le molecole di interesse sono i chelanti bifunzionali (BFC), che hanno il duplice scopo di coordinare stabilmente il radionuclide (complessamento) e di disporre di un gruppo funzionale in grado di legare il *linker* (bioconiugazione). Nella progettazione del BFC si deve considerare il tipo di radiometallo in uso ma anche le proprietà biologiche del farmaco specifico. Sono disponibili differenti tipi di BFC con atomi donatori e struttura chelante, poiché i radiometalli, utilizzati in medicina nucleare, variano significativamente nella loro chimica di coordinazione; l'elettronegatività, lo stato di ossidazione, la carica e il raggio di uno ione metallico, giocano un ruolo fondamentale nella formazione dei complessi metallo-chelante. I complessi devono essere formati in alte rese (>99.5%) e con elevate attività specifiche.

Per l'applicazione in vivo sono necessarie elevate inerzie cinetiche e stabilità termodinamiche, in condizioni fisiologiche, per prevenire il rilascio e la dissociazione del radiometallo dal suo complesso ed evitare così l'accumulo in organi *off-target*.
[5][26][27]

Per definire la velocità di formazione del complesso radiometallo-chelante ci si basa sulla cinetica di complessamento, la quale è influenzata dalla temperatura di reazione. Tempi di reazione lunghi sono svantaggiosi soprattutto se i radiometalli hanno emivita breve (ad esempio ^{68}Ga (67.7 min), ^{212}Bi (60.6 min) o ^{213}Bi (45.6 min)). Le alte temperature di reazione, invece, danneggiano l'attività biologica dei *targeting-agent* (ad esempio gli anticorpi sono sensibili al calore). Per avere un risultato ottimale è auspicabile che i complessi radiometallo-chelante si formino in meno di 15 minuti a una temperatura ambiente.

La stabilità termodinamica dei complessi metallici si traduce come valori di costanti (K_{ML}) ottenuti ad esempio tramite titolazioni potenziometriche o spettrofotometriche:
[28][29][30]



$$K_{ML} = \frac{[ML_n^{m+}]}{[M^{m+}] \cdot [L]^n}$$

Nel formare complessi stabili, i chelanti multidentati sono più efficaci rispetto ai chelanti monodentati, in virtù del minor costo entropico di coordinazione; tasche di legame preorganizzate hanno un effetto più proficuo sull'inerzia dei complessi metallici, grazie ad una minore entropia.[31][32] Per i leganti macrociclici subentra anche "l'effetto macrociclico" che favorisce la formazione di complessi degli ioni metallici aventi dimensioni ottimali rispetto a quelle dell'anello.

1.4.1 Classi di Chelanti

Come detto in precedenza, la scelta appropriata di un chelante per un determinato radiometallo è fondamentale. Per la maggior parte dei radiometalli utilizzati per le applicazioni radiofarmaceutiche si utilizzano acidi polammino-policarbossilici. Tali composti dominano il campo dei chelanti bifunzionali, grazie alla loro disponibilità commerciale e alla facilità di coniugazione con le biomolecole. Vengono classificati a seconda della loro natura, aciclica e macrociclica, formando comunque complessi altamente stabili. I chelanti aciclici hanno una cinetica di reazione più rapida per la reazione di complessamento, mentre quelli macrociclici hanno una maggiore stabilità in vivo. [33] Nei prossimi paragrafi vedremo alcuni esempi di entrambe le categorie di chelanti.

1.4.1.1 Chelanti aciclici

Il DTPA (acido dietilenetriammino-pentaacetico, Figura 1.3) è un chelante ottadentato. Possiede 5 atomi di ossigeno dei gruppi carbossilici e 3 atomi di azoto dei gruppi amminici, ideali per coordinare ioni metallici.[34]

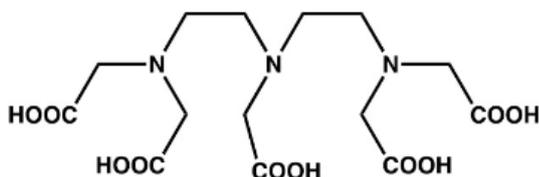


Figura 1.3 Struttura dell'acido dietilenetriammino-pentaacetico. [33]

Il DTPA è uno dei primi chelanti bifunzionali utilizzati nello sviluppo di radiofarmaci approvati dalla FDA (Food and Drug Administration), ed attualmente è presente in due

farmaci, [^{111}In] In-DTPA-octreotide (OctreoscanTM) e [^{111}In] In-capromab pendetide (ProstaScint[®]), utilizzati rispettivamente per l'imaging SPECT dei tumori neuroendocrini positivi al recettore della somatostatina e dei tumori della prostata positivi al PSMA (prostate-specific membrane antigen).[35][36] Una delle problematiche dei complessi DTPA-radiometallici è la scarsa stabilità in vivo dovuta alla dissociazione e alla transchelazione del radiometallo.[37][38]

L'1B4M-DTPA (acido 2-(4-isotiocianatobenzil)-6-metil-dietilenetriaminapentaacetico, **Figura 1.4**) differisce dal DTPA tal quale perché presenta un gruppo metilico e un gruppo p-isotiocianatobenzilico.[37]

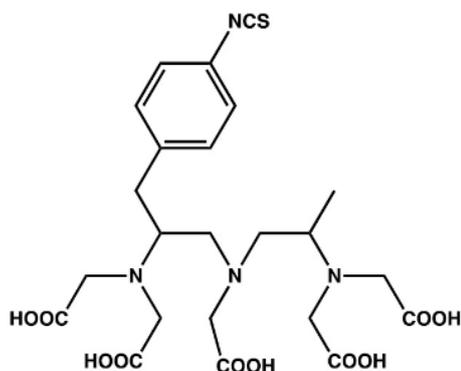


Figura 1.4 Struttura dell'acido 2-(4-isotiocianatobenzil)-6-metil-dietilenetriaminapentaacetico[33]

Il metile impartisce maggiore rigidità e stabilità in vivo per i cationi [^{111}In]In³⁺ e [^{90}Y]Y³⁺, mentre il gruppo p-isotiocianatobenzilico è adatto alla coniugazione con una biomolecola attraverso la formazione di un legame tiourea con un'ammina primaria. [39][40] Questo chelante è impiegato nel [^{90}Y]Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), radiofarmaco per la radioimmunoterapia del linfoma a cellule B non Hodgkin. [15][41][42]

Un altro chelante della famiglia del DTPA è il **CHX-A''-DTPA** ([®-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)- acido cicloesano-1,2-diammino-pentaacetico], **Figura 1.5**); presenta un gruppo cicloesano che conferisce una superiore rigidità e una migliore inerzia cinetica per ioni come ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu , e $^{212/213}\text{Bi}$. [26][43][44]

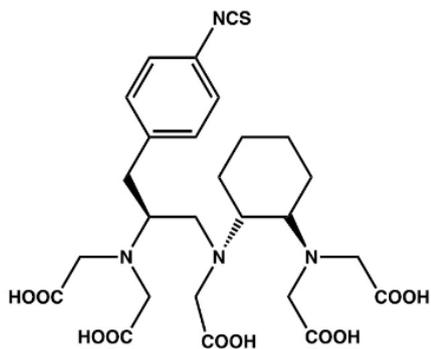


Figura 1.5 Struttura del [R -2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)-acido cicloesano-1,2-diammino-pentaacetico] [33]

Recentemente, come alternative ai leganti dell'acido poliamminico, sono stati sviluppati chelanti aciclici basati su derivati dell'acido picolinico. Due esempi sono mostrati in Figura 1.6. Il **H2dedpa**, chelante esadentato, forma complessi termodinamicamente stabili con il Ga^{3+} , in tempi brevi, a temperatura ambiente e in tampone acquoso a pH 4. **H4octapa** è ottadentato e forma complessi stabili con ^{111}In e ^{177}Lu . Differisce strutturalmente dal H2dedpa per la sostituzione dell'etilendiammina con una cicloesadiammina. [61][62][63]

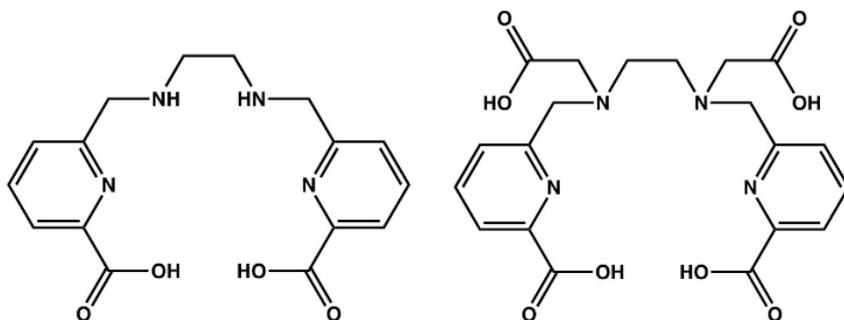


Figura 1.6 Struttura del H2dedpa e del H4octapa. [33]

Infine, altri due chelanti mostrati in Figura 1.7, **H2CHXdedpa** e **H4CHXoctapa**, si prestano molto bene nel complessare ^{64}Ga e ^{111}In , dimostrando una eccellente stabilità nel siero umano.[33]

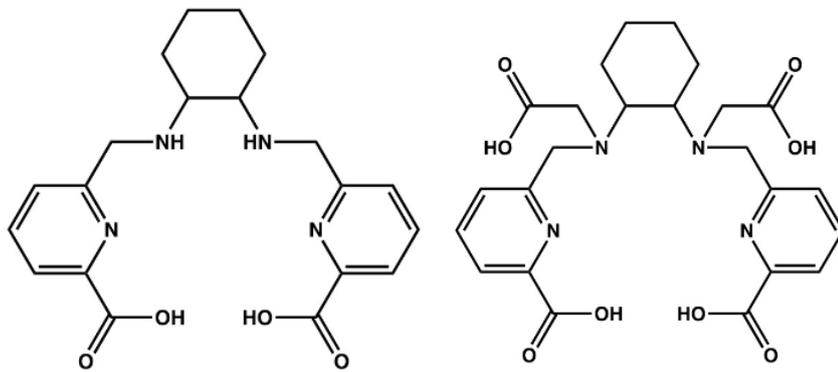


Figura 1.7 Struttura del H₂CHXdedpa e del H₄CHXoctapa. [33]

1.4.1.2 Chelanti macrociclici

Come detto prima, sebbene si siano introdotte delle rigidificazioni nella struttura, i chelanti aciclici mostrano sempre una certa instabilità in vivo; per risolvere questa limitazione sono stati introdotti i chelanti macrociclici.

I primi quattro chelanti che saranno descritti mostrano la stessa struttura macrociclica, il cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclododecano), che viene opportunamente funzionalizzato a seconda dello ione metallico e/o dei *linker* utilizzati nei radiofarmaci. Successivamente verranno citati ulteriori chelanti aventi scheletri ciclici differenti.

Il **DOTA** (acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico, Figura 1.8) è un chelante ottadentato ed è il più popolare e il più utilizzato nella ricerca chimica sui radiofarmaci. Ha una struttura ottimale in grado di coordinarsi agli ioni metallici attraverso i quattro gruppi amminici terziari e i quattro acidi carbossilici.

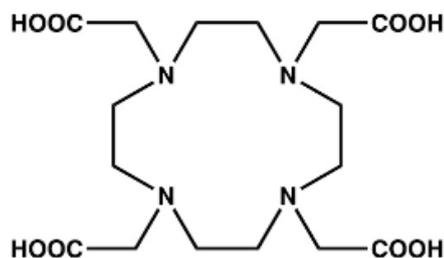


Figura 1.8 Struttura dell'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico[33]

In generale il DOTA è un chelante adatto per ¹¹¹In, ^{86/90}Y, ^{44/47}Sc, Bismuto-212/213, ²¹²Pb, ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Oh, ¹⁵²Tb e ²²⁵Ac. [26][45][46]

Il **DOTAGA** [acido 2-(4,7,10-tris(carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il) pentandioico, Figura 1.9], molto simile al DOTA, presenta i quattro bracci dell'acido carbossilico, usati per chelare gli ioni metallici, e un gruppo dell'acido propionico sfruttato per legare il *linker*. [37][47]

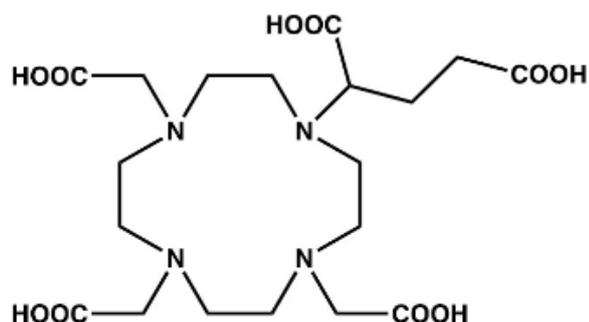


Figura 1.9 Struttura dell'acido 2-(4,7,10-tris(carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il) pentandioico[33]

Il **p-SCN-Bn-DOTA** (figura 1.10) differisce dal DOTAGA per la presenza di un gruppo p-isotiocianatobenzilico al posto dell'acido propionico. Anche in questo caso la funzionalizzazione è utile per legare il chelante con il *linker*. [33]

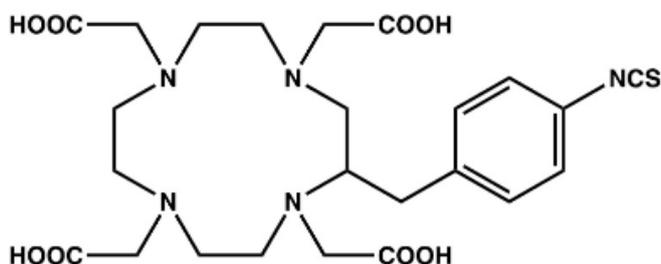


Figura 1.10 Struttura p-SCN-Bn-DOTA. [33]

Nel **DOTAM**, o **TCMC** ([2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra-il) tetraacetamide], Figura 1.11) i gruppi carbossilici delle catene laterali del DOTA sono sostituiti da gruppi ammidici, che gli permettono di avere una eccellente stabilità con alcuni ioni metallici, come Pb(II), anche a pH relativamente acidi.[48]

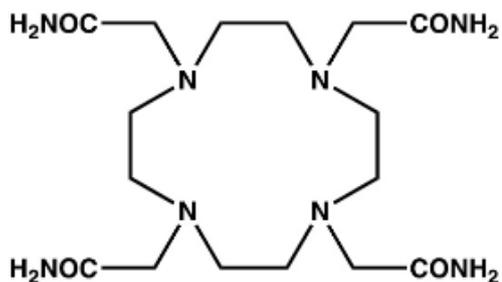


Figura 1.11 Struttura del DOTAM [33]

Il **NOTA** (acido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico, Figura 1.12) è un chelante macrociclico simile al DOTA ma basato su un anello più piccolo del cyclen, cioè l'1,4,7-triazaciclononano.

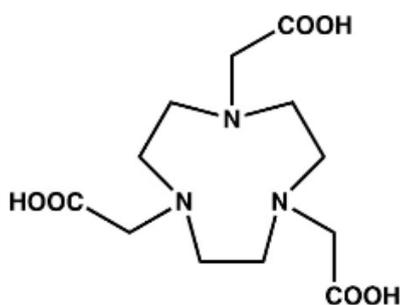


Figura 1.12 Struttura dell'acido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico.[33]

Avendo un diametro minore rispetto al DOTA, si presta meglio a chelare cationi metallici di piccole dimensioni come Cu^{2+} e Ga^{3+} . In particolare, forma dei complessi con il ^{68}Ga ad elevata stabilità in vivo, oltre a presentare una rapida cinetica di formazione a temperatura ambiente.[20][26][36]

Altri derivati del NOTA sono il **NODASA** (acido 2-(4,7-bis(carbossimetil)-1,4,7-triazonan-1-il)succinico) e il **NODAGA** (acido 2-(4,7-bis(carbossimetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanedioico, Figura 1.13), nei quali si presenta un ulteriore gruppo carbossilico su una delle catene laterali. [49][50]

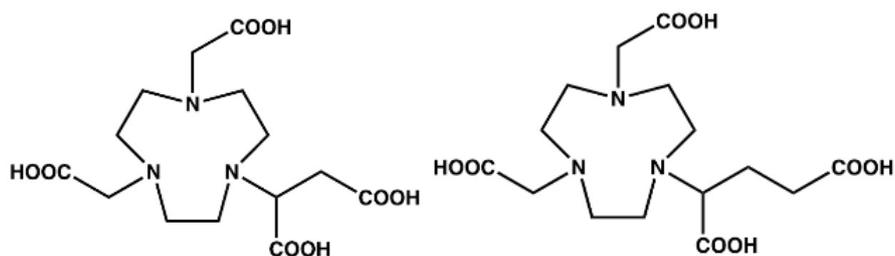


Figura 1.13 Struttura dell'acido 2-(4,7-bis(carbossimetil)-1,4,7-triazonan-1-il)succinico e dell'acido 2-(4,7-bis(carbossimetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanedioico.[15]

Il carbossile aggiuntivo permette il legame con il *linker*. Gli studi preclinici condotti sui bioconiugati [^{64}Cu]Cu-NODAGA hanno evidenziato una farmacocinetica e una stabilità in vivo favorevoli. [51][52]

Un analogo modificato del NOTA è il **NETA** (acido 2,2'-((2-(4,7-bis(carbossimetil)-1,4,7-triazonan-1-il)etil)azandiolo)diacetico, Figura 1.14), chelante che è caratterizzato da una struttura mista. [53][54] La componente macrociclica (la stessa del NOTA) conferisce rigidità e stabilità termodinamica. Al contrario quella aciclica, costituita da un gruppo bis-carbossimetil-ammino, consente una rapida cinetica di complessamento. Il NETA è stato utilizzato come chelante per la radioterapia a bersaglio molecolare con ^{177}Lu , ^{90}Y e Bismuto-205/206.[55][56][57]

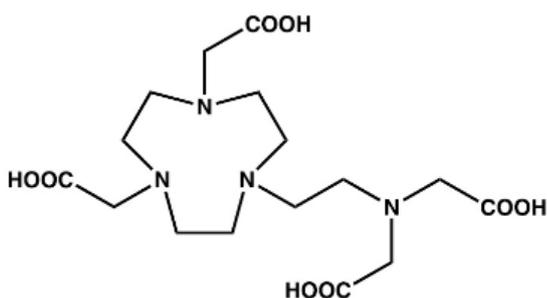


Figura 1.14 Struttura dell'acido 2,2'-((2-(4,7-bis(carbossimetil)- 1,4,7-triazonan-1-il)etil)azandiolo)diacetico. [33]

Il **TETA** (acido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetico, Figura 1.15) è un chelante ottadentato come il DOTA; tuttavia, ha una dimensione di anello maggiore per la presenza di due metileni in più.

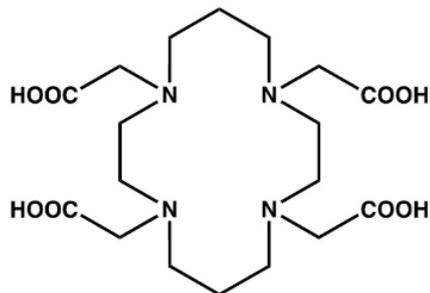


Figura 1.15 Struttura dell'acido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetico. [33]

I complessi $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TETA}$ hanno tuttavia mostrato una scarsa stabilità in vivo a causa della transchelazione del Cu^{2+} . [58][59][60]

La poca stabilità in vivo del TETA ha portato allo sviluppo di nuovi chelanti come il **CB-TE2A** dell'acido 2,2'(1,4,8,11-tetraazabicyclico(6.6.2)esadecan-4,11-diolo) diacetico, Figura 1.16). La maggiore rigidità è data dal CB, *cross-bridge*, ossia un ponte etilenico che unisce due azoti opposti dell'anello.

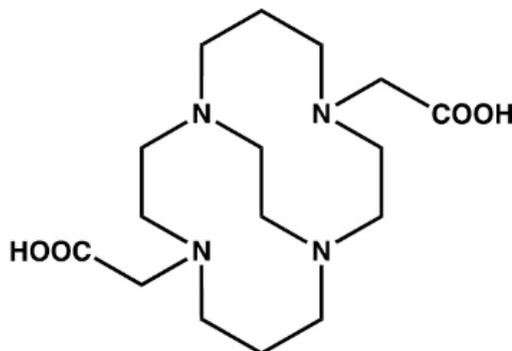


Figura 1.16 Struttura dell'acido 2,2'(1,4,8,11-tetraazabicyclico(6.6.2)esadecan-4,11-diolo) diacetico.[33]

Il complesso $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-CB-TE2A}$ mostra maggior inerzia cinetica e stabilità in vivo rispetto al complesso $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TETA}$. Tuttavia, uno dei principali svantaggi dell'uso di CB-TE2A è che richiede condizioni drastiche per la radiomarcatura (~ 1 h a 95°C), non ideali per biomolecole sensibili al calore come gli anticorpi.[58][60]

1.5 LINKER

Nella struttura di un radiofarmaco il *linker*, o spaziatore, permette di legare il chelante bifunzionale all'agente di *targeting*, limitando le interferenze reciproche tra le due molecole. Sono anche utilizzati per modulare le proprietà farmaco-cinetiche dell'intero radiofarmaco. Devono essere stabili in condizioni fisiologiche, in modo tale da non ostacolare la specificità o l'affinità dell'agente di *targeting* verso il bersaglio biologico. I *linker* più comuni sono quelli a base di polietilenglicole (PEG), aminoacidi (ad esempio acido glutammico e glicina) e acido amminoesanoico (ahx). [33]

Esistono diversi approcci per legare il chelante all'agente di *targeting* tramite un *linker*, ed alcuni di questi sono illustrati nella Figura 1.17.

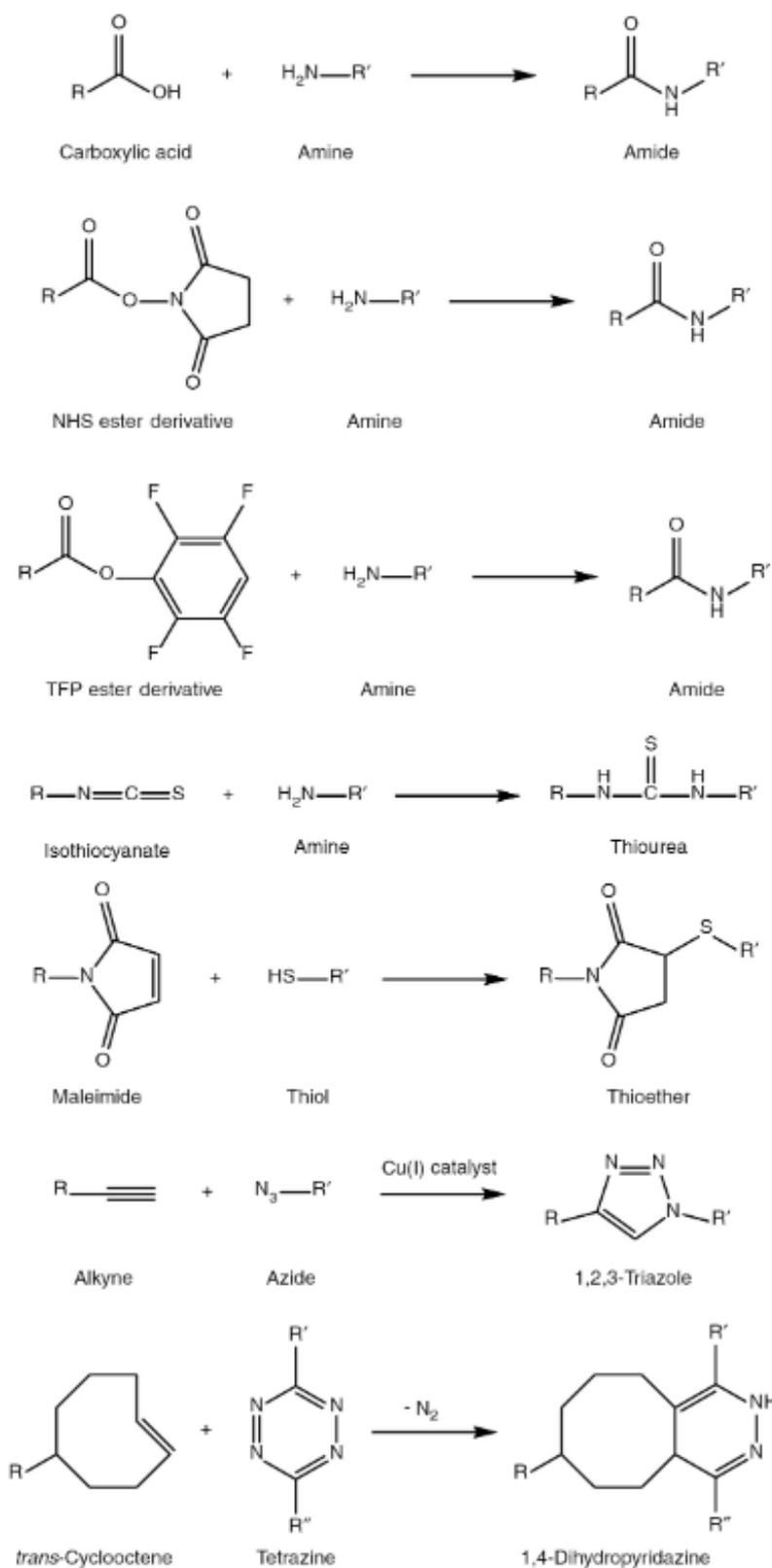


Figura 1.17 Esempi di legame tra chelante, *linker* e agente di *targeting*. [33]

Le condizioni della reazione di accoppiamento non devono causare la degradazione di nessuno dei due componenti, e il nuovo legame chimico non deve interrompere la funzione dell'agente di *targeting* né ridurre significativamente la forza di coordinazione del chelante-radiometallo. Ad esempio, le ammine primarie possono essere accoppiate con acidi carbossilici o esteri attivati (ad esempio N-idrossisuccinimide NHS-estere, tetrafluorofenile TFP-estere) per formare legami ammidici, oppure con un isotiocianato per ottenere un legame tiourea, mentre la reazione di un solfidrile e una maleimmide forma un legame tioetere. Un altro metodo è quello di sfruttare la *click chemistry* (ad esempio formare un legame triazoico), sfruttandone la selettività e cinetica rapida; le reazioni di cicloaddizione azide-alchinica, che utilizzano Cu(I) come catalizzatore, consentono la formazione di un anello 1,4-disostituito di 1,2,3-triazolo. Gli svantaggi di questo sistema sono dovuti al catalizzatore di rame non radiattivo: esso può competere con la coordinazione del BFC, diminuendo la sua attività specifica e/o introducendo un'impurità non radioattiva nel complesso formatosi con il radiometallo. Si potrebbe pensare di ovviare al problema utilizzando dei metodi *click* senza rame, come l'accoppiamento tra i gruppi funzionali trans-cicloottene e tetrazina, sfruttando un gruppo ingombrante per favorire cinetiche ancora più rapide; tuttavia, aumenta la lipofilia con conseguente riduzione dell'affinità con il bersaglio e formazione di regioisomeri.[64][65]

1.6 TARGETING AGENT

Le cellule cancerose presentano molti biomarcatori che, sebbene non manchino anche nelle cellule normali, sono mutati o sovraespressi. L'agente di *targeting* è una molecola con attività biologica, dunque può essere costituita da peptidi, anticorpi o piccole strutture molecolari, e la sua funzione è quella di far accumulare il radiofarmaco nel sito tumorale grazie al riconoscimento specifico dei biomarcatori (Figura 1.18).[66][67][68]

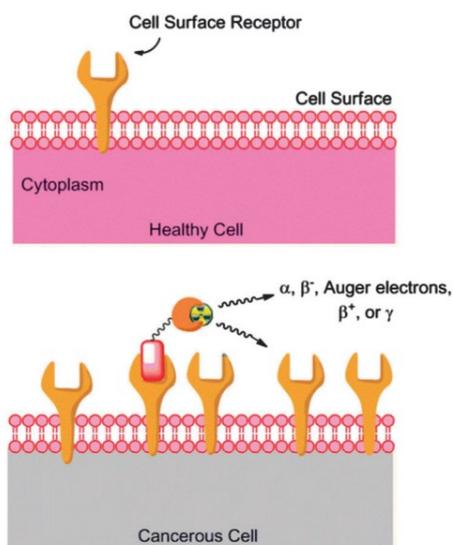


Figura 1.18 Individuazione dei recettori di superficie cellulare sovraespressi nel tessuto canceroso tramite l'agente di *targeting*. [20]

1.6.1 Anticorpi

Un anticorpo (Ab), definito anche immunoglobulina (Ig), è una proteina con un peso molecolare elevato (140-160 kDa). Per questo scopo possono essere usati anticorpi monoclonali (mAbs), anche se il loro uso oggi è limitato a causa di un accumulo ridotto nei tumori. Ciononostante, sul mercato sono presenti quattro mAb radiomarcanti approvati dalla FDA: Bexxar (agente ^{111}In), Zevalin (ibritumomab tiuxetan marcato con ^{90}Y), ProstaScint (agente ^{111}In) e un agente $^{99\text{m}}\text{Tc}$. [68][69] L'anticorpo deve essere abbinato a un radioisotopo con un'emivita lunga, per consentire l'accumulo del tumore e la *clearance* non specifica. Oltre a questo, gli mAb hanno molteplici gruppi funzionali disponibili sulla loro superficie, il che rende difficile controllare il numero e la posizione degli attacchi alla parte chelante (*linker*+BFC) nelle reazioni di coniugazione;

spesso possono essere attaccati più parti chelanti a un singolo anticorpo. Il numero di residui legati a ciascun anticorpo può essere dedotto attraverso un metodo di diluizione isotopica ed è controllato modificando i rapporti molari tra parte chelante e anticorpo. Di solito è preferibile introdurre la massima capacità di legame radioattivo possibile senza influenzare negativamente l'affinità di legame dell'anticorpo con il suo antigene.[20]

1.6.2 Peptidi

I peptidi hanno suscitato grande interesse come vettori di *targeting* per scopi radiofarmaceutici in quanto possono essere facilmente modificati chimicamente e radiomarcati. Hanno un'elevata captazione nei tessuti bersaglio e una rapida *clearance* dal sangue e dai tessuti *off target*. L'Octreoscan (^{111}In -DTPA-octreotide), approvato dalla FDA, è un esempio di peptide radiomarcato utilizzato nell'imaging SPECT. La rapida localizzazione dei peptidi permette loro di adattarsi a radioisotopi con emivita breve. La maggior parte di essi è presente in natura, ragion per cui sono soggetti a rapida degradazione enzimatica; per migliorarne la stabilità metabolica, sono stati ingegnerizzati peptidi che incorporano residui di amminoacidi non naturali, amminoalcoli o peptidi ciclici. Queste modifiche non devono influire sull'affinità di legame nativa del peptide per l'antigene. La sintesi di peptidi in fase solida (SPPS) è ampiamente utilizzata e può facilmente produrre peptidi con una alta varietà di modifiche. [70][71][72]

1.6.3 Altre biomolecole e agenti di targeting

Altre biomolecole utilizzate come elementi di targeting nei radiofarmaci sono frammenti di anticorpi, oligonucleotidi e nanoparticelle; è quindi possibile scegliere tra un'ampia varietà di agenti di *targeting* con diverse proprietà farmacocinetiche. [73][74][75] Esempi di frammenti di anticorpi sono gli scFv (frammento variabile a catena singola, 25 kDa), i diabodies (50 kDa), i Fab (frammento che lega l'antigene, 55 kDa), i minibodies (80 kDa) e i F[ab']₂ (110 kDa), ognuno dei quali è composto da diversi domini di un mAb.[76][77] In generale, l'emivita dei frammenti anticorpali è

inversamente proporzionale al peso molecolare della molecola. Grazie alle loro dimensioni ridotte, presentano una *clearance* ematica più rapida dell'anticorpo tal quale, il che significa tempi di acquisizione più veloci per l'*imaging* e una minore radiotossicità aspecifica per gli isotopi terapeutici. Gli isotopi utilizzati con i frammenti di anticorpi possono avere emivite più brevi; ad esempio, un frammento di anticorpo marcato con ^{68}Ga , il F[ab']²-trastuzumab, si è dimostrato molto promettente per l'*imaging* PET dei tumori solidi che esprimono il recettore HER-2/neu.[78]

Un'altra classe di vettori di *targeting* in medicina nucleare sono le nanoparticelle. Il loro utilizzo si basa sulla loro biodistribuzione (sono di grandi dimensioni) e sulla capacità di sfruttare l'effetto EPR (maggiore permeabilità e ritenzione) nel tessuto tumorale. Per migliorare la capacità di bersaglio tumorale delle nanoparticelle, sulla loro superficie vengono spesso immobilizzati agenti di *targeting*, come peptidi o anticorpi.[79]

CAPITOLO 2-SCOPO DELLA TESI

Al giorno d'oggi, lo sviluppo di nuovi radiofarmaci richiede uno studio approfondito della chimica di coordinazione, necessaria per somministrare in modo controllato e sicuro radioisotopi metallici al tessuto bersaglio (biodistribuzione). È quindi fondamentale progettare complessi di coordinazione in grado di legare in modo efficace lo ione metallico.[89]

Oltre a ciò, la scelta del radionuclide, per la diagnosi e/o terapia, dipende da una serie di fattori, tra cui disponibilità, costo di produzione, purezza ed emivita. Da questo punto di vista gli isotopi del rame (^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu e ^{64}Cu), sono estremamente interessanti perché rientrano in queste caratteristiche. Ad esempio, il ^{64}Cu è un isotopo del rame che ha un tempo di dimezzamento di 12.7 ore. Durante il suo processo di decadimento emette sia particelle β^+ che β^- , consentendo sia l'*imaging* PET che la radioterapia, il che lo rende un isotopo versatile per applicazioni mediche.[89] [90]

Come visto nel capitolo 1, chelanti come il DOTA e il TETA sono ideali per il Cu(II), in quanto la presenza del gruppo carbossilico permette la formazione di complessi cineticamente e termodinamicamente stabili; tuttavia, bisogna considerare che in vivo Cu(II) può essere bioridotto a Cu(I), e in questo caso DOTA e TETA non sono per nulla ideali. Quando il rame si riduce a Cu(I) sussiste il fenomeno di transchelazione, con quindi perdita del radiometallo. [91][92]

Anche il ^{223}Ra (α emettitore), come i radionuclidi del rame, ha proprietà che risultano vantaggiose per l'utilizzo nella radioimmunoterapia: infatti, ha una emivita di 11.4 giorni che consente di avere più tempo per la preparazione, spedizione e somministrazione.[93] Altresì, recentemente è stato approvato dall' Agenzia Europea per i Medicinali e dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento di pazienti con cancro alla prostata (carcinoma prostatico resistente alla castrazione).[94][95] Attualmente, tuttavia, non sono noti chelanti per il radio che consentano di utilizzare tale radionuclide anche per la terapia di altri tipi di tumore.

Il seguente lavoro di tesi mira alla sintesi di nuovi chelanti con lo scopo di complessare efficacemente la coppia Cu(II)/Cu(I) e/o Ra(II). In particolare, le molecole oggetto di questo lavoro di tesi, mostrate in Figura 2.1, sono il [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina)] (DO4NH_2), l'acido 6,6'-[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene)]dipicolinico (Macropa) e l'acido {6,6'-

[(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis (metilene)] bis (piridin-6,2-diolo)}difosfonico (Macrophosfo). DO4NH₂ dovrebbe essere ideale per la formazione di complessi con Cu(II)/Cu(I), poiché l'azoto, essendo *borderline*, forma complessi stabili sia con metalli *hard/bordeline* come Cu(II) che con metalli *soft* come Cu(I). Le altre due molecole possiedono un anello di dimensioni maggiori, che rispetto al cyclen è più adatto per complessare ioni di dimensioni maggiori come Ra(II). La scelta di queste due molecole è motivata da uno studio preliminare di tipo computazionale in corso di svolgimento nell'ambito di un progetto di dottorato [96], nonché da alcuni lavori di letteratura nel quale macrocicli simili sono in corso di studio per il radio e per metalli simili, come il bario. [97]

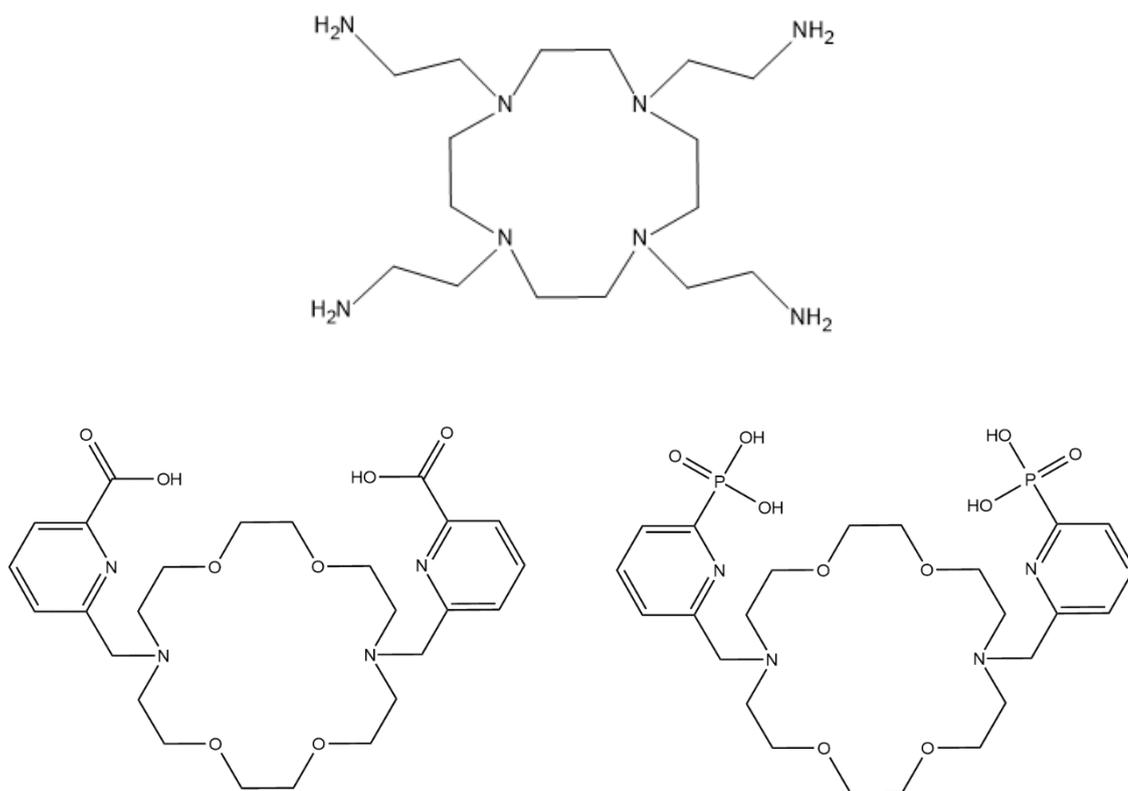


Figura 2.1 Struttura DO4NH₂, Macropa e Macrophosfo.

CAPITOLO 3-TENTATIVI DI SINTESI

3.1 DO4NH₂

La prima molecola che si è cercato di sintetizzare è l'1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina), brevemente denominata DO4NH₂. È una molecola non presente in letteratura, quindi non ancora studiata, e che si pensa possa essere ben adatta a formare complessi stabili con metalli *soft* quali rame(I) e argento(I), nonché di altri metalli più *hard* come Cu(II), data la presenza di quattro ammine primarie nelle catene laterali.

Durante la sintesi si sono incontrate diverse difficoltà a cui sono seguiti, quindi diversi tentativi riportati di seguito.

3.1.1 Tentativo 1

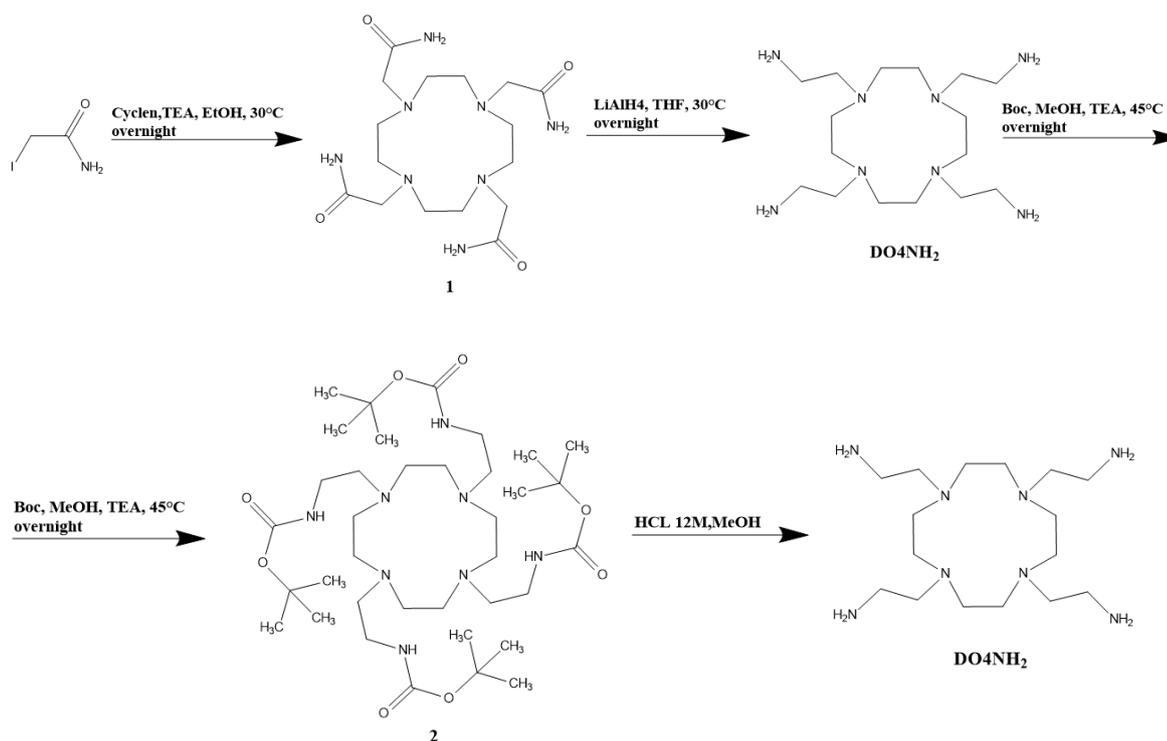


Figura 3.1 Schema di sintesi del primo tentativo per ottenere DO4NH₂.

Il primo tentativo di sintesi è stato già proposto in un lavoro di tesi precedente a questo, ed è mostrato in Figura 3.1. [100] La sintesi consiste in una prima reazione di N-alkilazione del *cyclen* con iodoacetammide. Il derivato tetrasostituito ricavato,

(molecola 1, Figura 3.1), deve poi essere trattato con litio alluminio idruro, consentendo così la riduzione delle ammidi ad ammine; dato che non si è riusciti a spingere la reazione a completezza, per favorire l'isolamento del prodotto completamente ridotto dalle impurezze è necessaria una prima protezione delle ammine con il di-*ter*-butil dicarbonato, in modo da rendere i derivati più lipofili, e successiva purificazione in colonna cromatografica. Infine, il DO₄NH₂ può essere ottenuto con una deprotezione del BOC mediata dall'acido cloridrico 12 M. Tuttavia, successive analisi di massa hanno mostrato che in colonna non è stato possibile separare il composto desiderato da quello con ancora una catena non ridotta ad ammina e quindi il prodotto finale non è risultato puro [100].

Si è dunque deciso di riprovare questa via sintetica apportando alcune modifiche con il fine di ottenere la molecola in forma più pura. Per cercare di aumentare la resa per il primo step si è pensato di utilizzare le condizioni di reazione riportate dalla letteratura per questo tipo di reazione su macrocicli (acetonitrile, carbonato di potassio come base, 60°C, *overnight*). La difficoltà principale di questo step è l'ottenimento della tetrasostituzione. Dopo 24 h la miscela di reazione viene monitorata tramite TLC in silica gel, con rapporti differenti isopropanolo/ammoniaca come eluente, e dunque separata in colonna cromatografica. Tuttavia, in questo caso gli spettri di massa e NMR hanno evidenziato che la reazione non ha portato alla sintesi del 2-[4,7,10-tris(carbometil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-ile] acetammide (Figura 3.1 molecola 1).

Dato che la modifica apportata al primo step non ha avuto successo, si è deciso di ritornare alle stesse condizioni di reazione descritte nel precedente lavoro di tesi [100]: etanolo come solvente, trietilammina come base, 30°C *overnight*. Il vantaggio di questa reazione è la precipitazione del prodotto tetrasostituito che, oltre a spingere la reazione verso il composto di interesse, rende il successivo *work up* molto semplice. Esso, infatti, consta in una semplice filtrazione sottovuoto con imbuto buchner. La molecola 1 è stata ottenuta con una resa pari al 66% (0.617 g).

Il successivo passaggio si basa nella riduzione delle ammidi ad ammine, con LiAlH₄ in soluzione 1 M in THF. In questo caso la difficoltà consiste nello spingere la reazione a

completezza; infatti, i prodotti parzialmente ridotti non potrebbero poi essere separati tramite *flash* cromatografia da quello di interesse (come già dimostrato nel precedente lavoro di tesi [100]), con il risultato di ottenere un prodotto non puro. La reazione per questo motivo è stata lasciata a reagire per una settimana, con ulteriori aggiunte di LiAlH_4 e monitorandola attraverso analisi di massa. Tuttavia, ancora dopo questo tempo non si è ottenuto il DO4NH_2 puro, bensì una miscela del prodotto desiderato più la molecola in cui una delle quattro catene laterali non è stata ridotta ad ammina (Figura 3.2).

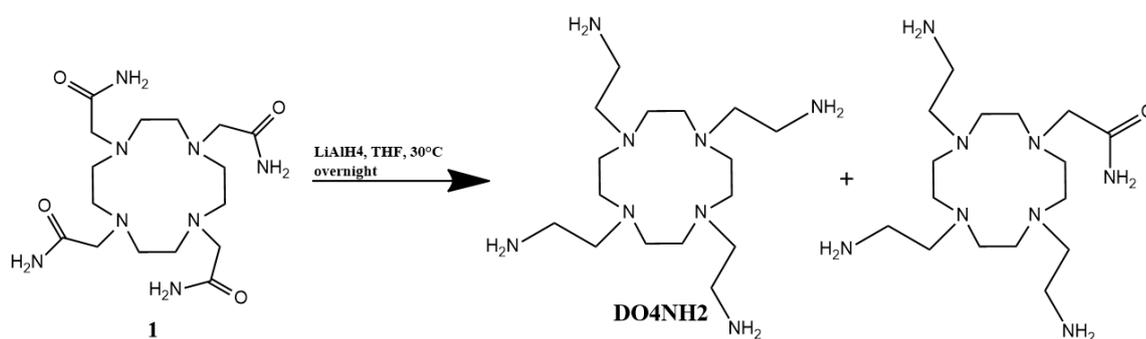


Figura 3.2 Miscela ottenuta dopo la riduzione della molecola 1.

Si è quindi deciso di abbandonare questa via sintetica.

3.1.2 Tentativo 2

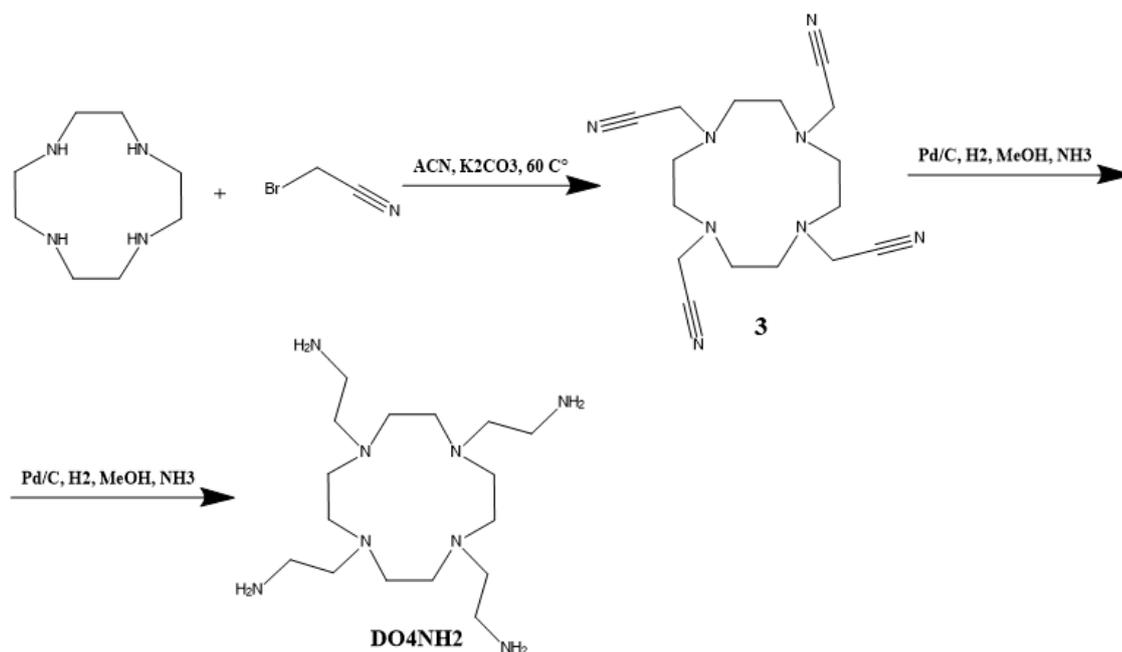


Figura 3.3 Schema di sintesi del secondo tentativo per ottenere DO4NH₂.

Dato che nel precedente tentativo il problema si è riscontrato nello step di riduzione, si è pensato di provare con una catena laterale che contenga un gruppo funzionale che può poi essere trasformato in ammina tramite una riduzione catalitica (teoricamente più efficace e veloce di quella con LiAlH₄). Per questo motivo come catena laterale si è deciso di usare bromoacetonitrile, già commercialmente disponibile.

In una prima fase quindi, si procede ad una N-alchilazione del *cyclen* con bromoacetonitrile e successiva separazione cromatografica (etere di petrolio:etil acetato 1:9) per arrivare al 1,4,7,10 tetra-cianometil-1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano (figura 3.3 molecola 3), con una resa del 17% (33.2 mg).

Si prosegue con la riduzione dei nitrili ad ammine tramite idrogenazione catalitica con palladio su carbonio. Dopo una notte, la reazione viene controllata tramite ESI massa e si nota la comparsa di sottoprodotti che non corrispondono a specie diversamente ridotte. Cercando in letteratura si è trovato che potrebbe esserci una reazione collaterale di condensazione tra l'immina intermedia e ammine già ridotte, con eliminazione di ammoniaca e formazione di immine N-sostituite, anche queste riducibili ad ammine secondarie. Si è quindi deciso di ritentare la reazione, e per evitare la competizione delle ammine appena ridotte al solvente di reazione, metanolo, viene aggiunta ammoniaca. Trascorsa una notte si procede con la centrifugazione, permettendo la separazione del catalizzatore dal surnatante, ma ancora una volta dallo spettro NMR si evince che la reazione non è andata a completezza.

Si è quindi deciso di abbandonare anche questa strada.

3.1.3 Tentativo 3

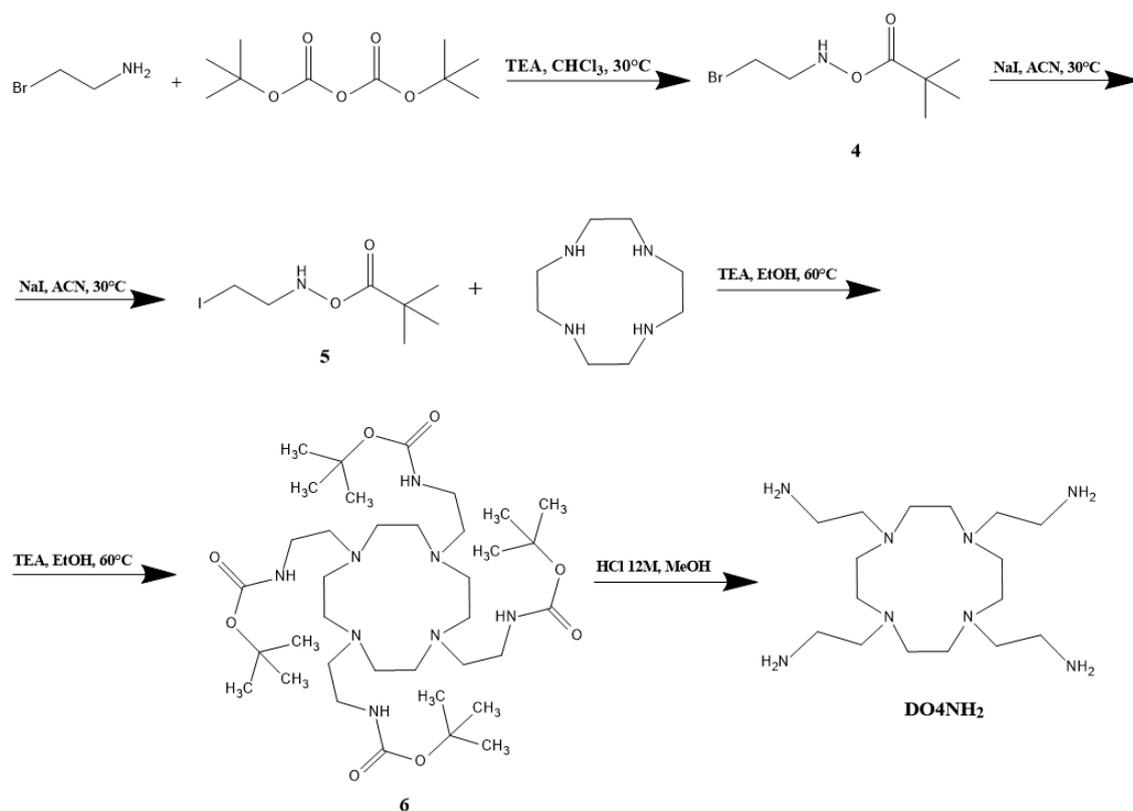


Figura 3.4 Schema di sintesi del terzo tentativo per ottenere DO4NH₂.

Dopo i primi due tentativi falliti a causa della reazione di riduzione (probabilmente ridurre quattro gruppi ad ammina richiede molto tempo), si è cercata un'altra via sintetica che non richieda di usare quella reazione per ottenere un'ammina primaria. Lo schema di sintesi proposto è quello riportato in Figura 3.4. Si tratta di una prima protezione della bromoetilammina con *tert*-butilossicarbonile e seguente sostituzione nucleofila S_N2 con ioduro di sodio. La *tert*-butile(2-iodoetil) carbammato ottenuta (molecola 5, Figura 3.4) funge da catena laterale nella successiva reazione di N-alchilazione del *cyclen* con la formazione del *cyclen* tetrasostituito (molecola 6, Figura 3.4). Infine, la deprotezione delle ammine con HCl 12 M permette di ottenere il DO4NH₂.

Pertanto, alla base dello schema di sintesi citato, si è proceduto innanzitutto a proteggere l'ammina della bromoetilammina mediante di-*tert*-butile dicarbonato, in cloroformio e usando come base la trietilammina; tale step consente di evitare la possibile formazione di prodotti polimerizzati nella successiva N-alchilazione del *cyclen*. Inoltre, per evitare la protezione delle ammine del *cyclen* dovute al di-*tert*-butile

non reagito, si è proceduto alla purificazione della tert-butile (2-iodoetil)carbammato per mezzo di una colonna cromatografica *flash* (etere di petrolio/etil acetato 9:1).

Data la natura molto ingombrata della catena laterale per la presenza del Boc, e la difficoltà che di solito si ha nel formare il composto tetrasostituito, si è subito provato a migliorare il gruppo uscente sostituendolo con lo ioduro, attraverso la reazione di sostituzione nucleofila S_N2 ; in tal modo la reazione di N-alchilazione dovrebbe procedere più velocemente. La tert-butile (2-iodoetil)carbammato (Figura 3.2 molecola 5) è stata così ottenuta con una resa del 97% (2.345 g).

Si prosegue dunque con la N-alchilazione del *cyclen* che viene condotta utilizzando le stesse condizioni che avevano funzionato nel tentativo 1: etanolo come solvente, trietilammina come base ed una temperatura di 30°C. La reazione viene monitorata tramite TLC (diclorometano/metanolo 9:1) per le successive 48 h, mostrando molte macchie sovrapposte, indice presumibilmente della formazione di sottoprodotti, oltre a *cyclen* mono, di, tri e tetra-sostituito. Per favorire la sintesi del tetrasostituito, si è pensato quindi di alzare la temperatura di reazione portandola a 60°C, aggiungendo un condensatore a bolle per evitare l'evaporazione dell'etanolo. Ancora una volta la reazione è stata monitorata con TLC, ESI massa e NMR e, nonostante sia proseguita per altri due giorni, non ha portato alla sintesi della molecola desiderata.

Per superare le difficoltà riscontrate precedentemente, si è deciso dunque di tornare alle condizioni di reazione già più volte riportate anche in letteratura per questo tipo di reazione: acetonitrile, carbonato di potassio, 60°C. Trascorse 48 h, nuovamente le TLC (diclorometano/metanolo 9:1) mostrano la sovrapposizione di *cyclen* mono, di, tri e tetrasostituito. Di conseguenza, al fine di spingere la reazione verso la formazione di *cyclen* tetra-sostituito, si è deciso di aggiungere altri 4 equivalenti (totali equivalenti = 8.5) di catena laterale (Figura 3.4). La successiva purificazione in colonna cromatografica, condotta con eluente diclorometano/metanolo 9:1, ha determinato l'isolamento di una piccola frazione del tetra-tert-butile [(1,4,7,10- tetraacilododecano -1,4,7,10- tetra-*is*-tetrakis (etan-2,1-diolo)] tetracarbammato (Figura 3.2 molecola 6) con una resa del 10 % (41.2 mg). Nelle eluizioni in TLC delle restanti frazioni separate, si è inoltre notata una macchia superiore rispetto a quella del prodotto puro; dall'analisi condotta in NMR si ipotizza che possa essere una specie pentasostituita.

Per concludere, i gruppi protettori delle ammine vengono quindi rimossi utilizzando acido cloridrico 12 M e successiva evaporazione in rotavapor. La quantità di DO₄NH₂ puro ottenuto, circa 0.02 g, non risulta tuttavia essere sufficiente per gli studi da eseguire successivamente per determinare le costanti di acidità e complessamento con il Cu(II).

A fronte della poca quantità di DO₄NH₂ sintetizzato, la decisione è stata quella di ripetere nuovamente la sintesi apportando delle piccole modifiche per cercare di aumentarne la resa.

Rispetto all'antecedente reazione di N-alchilazione del *cyclen* (resa del 10%), si è optato di aumentare la quantità di reagente limitante (*cyclen*), nonché diminuire a quattro gli equivalenti della tert-butile (2-iodoetil)carbammato, per evitare appunto la possibile formazione del sottoprodotto più sostituito. Dopo due giorni, la reazione viene monitorata tramite TLC; la miscela, malgrado le variazioni apportate, mostra nuovamente la formazione del prodotto collaterale; di conseguenza si è proseguito con una purificazione in colonna cromatografica *flash* (diclorometano/metanolo 9:1), che ha permesso di separare esclusivamente *cyclen* bisostituito (0.3 g) dai prodotti di non interesse. Ancora, per limitare la formazione del macrociclo funzionalizzato con cinque catene, si è deciso di sintetizzare il tetrasostituito partendo dal bisostituito, aggiungendo lentamente (1 ml/h) gli equivalenti della catena laterale (due equivalenti) con l'ausilio di una *syringe pump*. Passate 48 h, il controllo in cromatografia su strato sottile ha riscontrato che la sintesi non procedeva come previsto e dunque si è deciso di aggiungere altri 2 equivalenti di tert-butile(2-iodoetil) carbammato (molecola 5, Figura 3.4). Dopo ulteriori due giorni, con la separazione della miscela in colonna cromatografica *flash* (diclorometano/metanolo 9:1), non è stato possibile isolare alcuna frazione contenente tetra-terz-butile [(1,4,7,10- tetraaciclododecano -1,4,7,10- tetrail) tetrakis (etan-2,1-diolo)] tetracarbammato puro (molecola 6, Figura 3.4). Probabilmente si sono nuovamente venute a formare specie più sostituite del desiderato.

A questo punto, dato che l'alchilazione con la catena laterale iodurata porta subito alla formazione di molti sottoprodotti (soprattutto nella prova in grande) di successiva difficile separazione, si è pensato di fare un tentativo partendo dal tert-butile (2-cloroetil) carbammato. In questo modo si spera che la catena clorurata, reagendo più lentamente, dato che rispetto allo iodio è un peggior gruppo uscente, porti ad una minore formazione di specie indesiderate e quindi la reazione proceda in maniera più "pulita".

Si è dunque ritentata la reazione di N-alchilazione nelle solite condizioni (solvente acetonitrile, base carbonato di potassio, temperatura 60°C) con la catena clorurata, che effettivamente come ci si aspettava, è proseguita molto lentamente. La miscela di reazione, per due settimane, è stata controllata mediante NMR ed ESI-massa che hanno evidenziato la formazione di cyclen tri e tetrasostituito, senza presenza di ulteriori sottoprodotti. Dopo questo tempo, si è quindi deciso di eseguire una separazione in colonna cromatografica *flash* (diclorometano/metanolo 8:2) che ha permesso però l'isolamento solo di una piccola frazione di prodotto puro (20.8 mg), in quanto la maggior parte è coeluita al cyclen tri sostituito (800 mg, coeluiti in colonna cromatografica).

Non potendo quindi separare questi due composti si è scelto di farli reagire, intanto solo una piccola parte (300 mg di frazione coeluita), insieme ad altri 1.5 equivalenti di catena laterale clorurata (solvente acetonitrile, base carbonato di potassio, temperatura 60°C), al fine di acquisire il prodotto sostituito di interesse.

Solo quando la spettrometria di massa ha confermato la presenza esclusiva di prodotto tetrasostituito, si è proceduto allo step successivo. Prima della purificazione del prodotto, sono state condotte due prove di separazione utilizzando differenti TLC, una con gel di silice e una con allumina basica; si è riscontrato che la separazione delle macchie in fase stazionaria di allumina basica è stata molto più efficace rispetto alla prima. L'apporto di questa modifica in colonna cromatografica *flash* (fase stazionaria di allumina basica, eluente diclorometano/metanolo 98:2) ha permesso l'isolamento della molecola 6 (Figura 5) per una resa del 37% (139 mg).

Per assicurarsi la ripetibilità di quest'ultima sintesi, oltre ad ottenere un maggior quantitativo di *cyclen* tetrasostituito, la si è riproposta implementando tutte le ottimizzazioni delle sintesi precedenti. Ancora una volta, si è sintetizzata la N-(2-cloroetil)-O-pivaloilidrossilammina, la quale è stata fatta reagire con il *cyclen* nella reazione di N-alcilazione (solvente acetonitrile, base carbonato di potassio, temperatura 60°C); per garantire la formazione esclusiva del *cyclen* tetrasostituito prevenendo la formazione di altri prodotti, e diminuire un po' i tempi di reazione, la strategia è stata quella di aumentare gli equivalenti di catena clorurata (6 equivalenti). In seguito, è stata eseguita la purificazione tramite colonna cromatografica *flash* (allumina neutra, diclorometano/metanolo da 100% a 98:2), con conseguente isolamento di 234 mg di molecola tetrasostituita (resa 54%).

Per quanto riguarda la deprotezione, si è fatta anche una prova con una piccola quantità di *cyclen* tetrasostituito, utilizzando acido trifluoroacetico anziché HCl. Questa decisione è stata presa in quanto l'utilizzo di acido cloridrico porta alla formazione del prodotto salificato come $\text{DO}_4\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$; il problema del cloruro è che, se poi si volesse testare questo chelante non solo con il Cu(II)/Cu(I) ma anche con l'Ag(I) (anche di interesse per il nostro gruppo di ricerca), si formerebbe un sale insolubile che, precipitando, renderebbe impossibile lo studio complessometrico. La reazione di deprotezione, condotta a temperatura ambiente, dopo 24 h viene controllata in NMR: dall'analisi dello spettro si evince che solo due delle catene laterali sono state deprotette. Per questo motivo si sono aggiunti altrettanti equivalenti acido trifluoroacetico, aumentando anche la temperatura fino a 60°C. Nonostante le modifiche apportate, il DO_4NH_2 non è mai stato ottenuto.

Si è quindi deciso di tornare alla deprotezione con HCl 12 M; grazie a questa alternativa, è stato possibile ridurre i tempi di reazione, ottenendo così il DO_4NH_2 in sole 3 h (resa = 95%).

Un ultimo tentativo di ottenere il prodotto non in forma cloridrata è stato fatto aggiungendo ad una soluzione acquosa di prodotto finale una resina a scambio ionico precedentemente lavata con metanolo. La si lascia, senza agitazione, per 15 minuti in modo da far avvenire completamente lo scambio di ioni Cl^- con gli OH^- della resina e

successivamente si filtra la resina in imbuto con cotone. Dall'analisi dello spettro NMR si notano spostamenti dei picchi rispetto al prodotto salificato, ma una successiva analisi elementare per quantificare il cloro residuo ha rivelato la sua non completa eliminazione.

3.2 CHELANTI PER IL RADIO

Per quanto riguarda il radio, date le sue dimensioni maggiori rispetto a quelle di rame, si è dovuto selezionare un altro macrociclo che possa appunto accomodare metalli più grandi. La scelta è ricaduta sul Kriptofix 22 (4,13-diaza-18-crown-6): un ciclo simmetrico costituito da 12 atomi di C, 26 di H, 2 di N e 4 di O. Tenendo quindi questa molecola come struttura di base, si sono selezionate due catene laterali diverse con cui funzionalizzare i due azoti e sintetizzare quindi due chelanti da testare con il radio: il macropa (molecola 1) e il macrophospho (molecola 2).

3.2.1 MOLECOLA 1

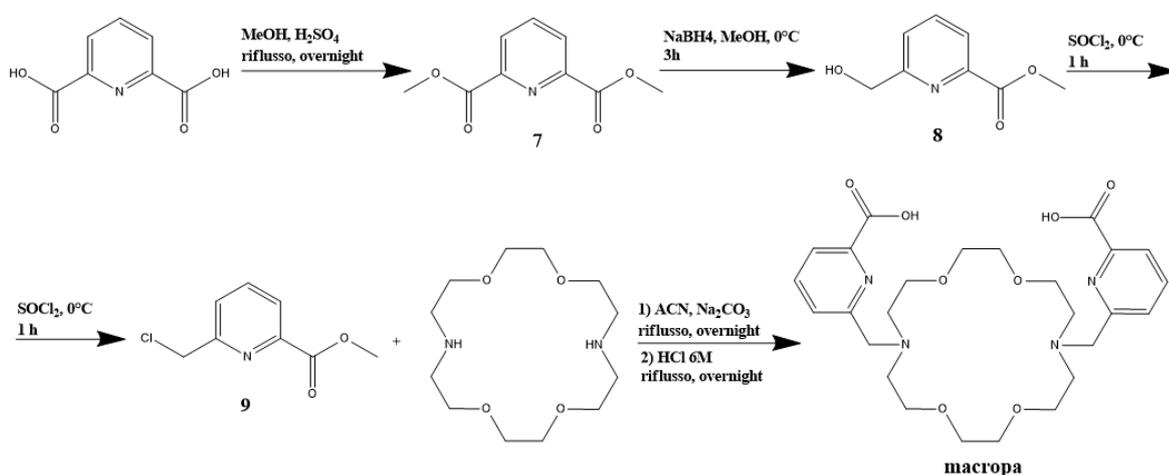


Figura 3.5 Schema di sintesi dell'acido 6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene))dipicolinico (macropa).

Il primo chelante per il radio che si è deciso di sintetizzare è l'unico già presente in letteratura per questo metallo e viene denominato "macropa". La sintesi è stata quindi condotta seguendo le indicazioni riportate nell'articolo [101]. In particolare, lo schema di sintesi, riportato in Figura 3.5, consta in una prima protezione dei gruppi carbossilici dell'acido piridin-2,6-dicarbossilico attraverso un'esterificazione di Fischer. Dopo la successiva estrazione in cloroformio della dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato (molecola 7, Figura 3.5) dalla miscela di reazione, si prosegue con una parziale riduzione degli esteri con sodio boridruro. In seguito, la purificazione in colonna cromatografica *flash* (dicloro metano/metanolo 95:5) consente l'isolamento della molecola 8 (Figura 3.5).

Per ottenere il metil 6-(clorometil)picolinato (molecola 9, Figura 3.5) si effettua una sostituzione nucleofila (S_N2) che coinvolge la reazione tra il metile 6-(idrossimetil) picolinato (molecola 8, Figura 3.5) e il cloruro di tionile.[99] Infine, la N-alchilazione del kryptofix 22 con la catena clorurata e la successiva deprotezione degli esteri metilici con HCl 6 M producono il chelante desiderato.

Seguendo questa via sintetica è stato possibile ottenere il Macropa con una resa finale del 76%. Questa molecola servirà come “standard” per confrontare i nuovi chelanti che verranno ideati e sintetizzati anche in lavori successivi a questo.

3.2.2 MOLECOLA 2

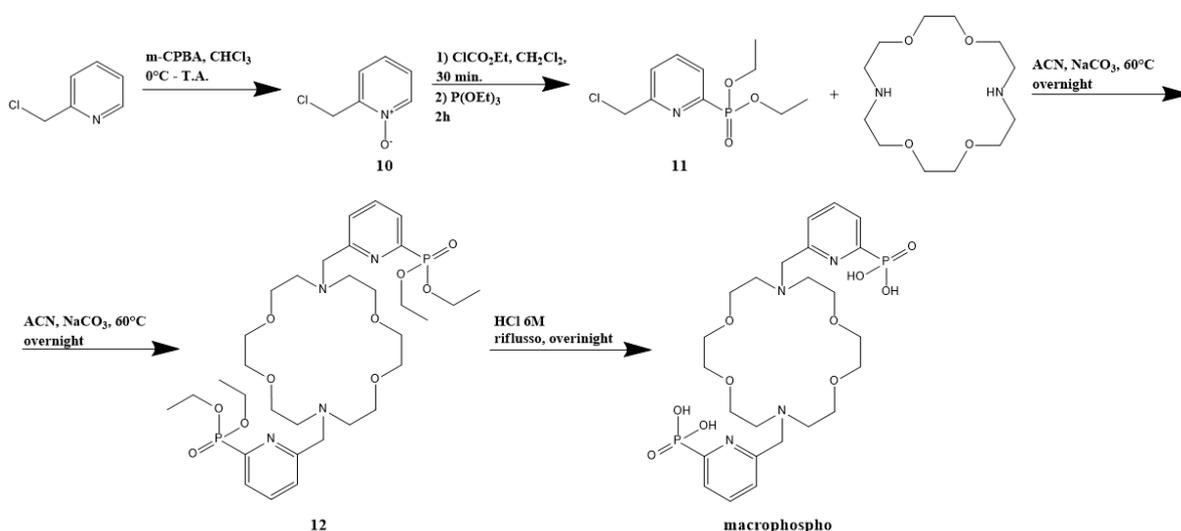


Figura 3.6 Schema di sintesi dell'acido (6,6'- ((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis (metilene)) bis(piridina-6,2-diolo)) difosfonico (macrophospho).

Un altro possibile chelante per il radio è il macrophospho, il cui schema di sintesi è riportato in Figura 3.6. Per la sintesi della dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato (Molecola 11, Figura 3.6) si è fatto riferimento alle indicazioni riportate nell'articolo [98]. Si parte con la sintesi della 2-(clorometil)piridina 1-ossido (Molecola 10, Figura 3.6) preparandola per ossidazione della 2-(clorometil)piridina con acido meta-cloroperbenzoico. L'ossigeno della molecola 10 viene prima etossicarbolinato con etil cloroformiato, e dopo fatto reagire con fosfito di trietile (reazione di Arbuzov); la

distillazione finale della miscela di reazione permette la purificazione della catena laterale di interesse (Molecola 11, Figura 3.6). [98]

La N-alcilazione del Kryptofix 22 (solvente acetonitrile, base carbonato di potassio) con la molecola 11 e la successiva deprotezione dei gruppi ossidrilici mediante HCl 6 M conduce alla produzione della molecola finale.

La problematica principale constatata nella sintesi di questo chelante risiede nella fase di distillazione per la purificazione della dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato. Nonostante siano state eseguite due distillazioni consecutive della miscela di reazione, non si è mai arrivati all'ottenimento della molecola 8 pura. Il problema è stato risolto mediante una purificazione finale in colonna cromatografica *flash* in silica gel (dicloro metano/metanolo 99:1), che ha restituito la catena clorurata senza impurità.

Il macrophospho è stato ottenuto per una resa del 66%.

CAPITOLO 4-CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Questo lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la sintesi di tre chelanti (DO4NH₂, macropa, macrophospho), adatti nel complessare rispettivamente ioni *borderline-soft* come Cu(II)/Cu(I) e ioni grandi come Ra(II). Il primo chelante è il [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina)] (DO4NH₂), una nuova molecola che risulta promettente per il complessamento di Cu(II) e di Cu(I). La sua sintesi si è rivelata più complicata di quanto si fosse pensato inizialmente. Nei primi due tentati proposti, infatti, si è riscontrata difficoltà nella riduzione delle catene laterali della molecola 1 e della molecola 3; in entrambe le situazioni non si è riusciti a produrre la molecola di interesse. Si è quindi provato con una differente via sintetica basata nella funzionalizzazione del *cyclen* con catene laterali protette e seguente deprotezione delle stesse: l'applicazione di questa strategia è stata un percorso lungo ed impegnativo che ha richiesto numerosi tentativi prima di poter ottimizzare la sintesi ed ottenere una quantità adeguata del chelante desiderato.

Il DO4NH₂ è stato infine ottenuto partendo dalla protezione della cloroetilammina con Boc, fatta posteriormente reagire con il *cyclen* nella reazione di N-alchilazione. Dopo aver purificato la molecola 6 in colonna cromatografica di allumina neutra, si è proceduto nella sua deprotezione, ottenendo così il prodotto di interesse puro con una resa del 51%.

La resa non è molto elevata; per migliorarla, si potrebbe ritornare sulle prime vie sintetiche. Queste, erano state scartate anche per i tempi molto lunghi di reazione, che tuttavia con l'ultima via sintetica non si è riusciti ad accorciare; d'altro canto, hanno il vantaggio di consistere in soli due passaggi di sintesi, dei quali il secondo, se ottimizzato potrebbe condurre al prodotto puro senza la necessità di usare una colonna cromatografica. Una prima possibilità, quindi, è che dopo aver ottenuto la molecola 1 (Figura 3.1) lo step di riduzione venga fatto non utilizzando il LiAlH₄ in soluzione 1 M in THF, ma LiAlH₄ solido in polvere in modo da aumentarne la concentrazione. Un altro tentativo potrebbe essere fatto modificando la riduzione catalitica del tentativo 2. Anziché aggiungere NH₃ per evitare la reazione collaterale, si potrebbe aggiungere una piccola quantità di acido che otterrebbe lo stesso effetto per quanto riguarda i sottoprodotti e dovrebbe anche spingere la reazione a completezza, protonando le ammine primarie appena formatesi.

Inoltre, un altro problema che potrebbe essere necessario risolvere in futuro è la presenza di cloruro nel prodotto finale, che non lo rende utilizzabile negli eventuali studi con l'Ag⁺. L'alternativa più semplice, in questo caso, sembra essere quella di lasciare per più tempo la soluzione del prodotto salificato a contatto con la resina a scambio ionico in modo da favorirne la completa sostituzione. Altrimenti, se non dovesse funzionare o richiedesse troppo tempo, bisognerà procedere ad ottimizzare la deprotezione con TFA.

Sono poi stati sintetizzati due ulteriori chelanti, l'acido 6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene))dipicolinico (macropa) e l'acido (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene)) bis(piridina-6,2-diolo)) difosfonico (macrophospho), potenzialmente utilizzabili nei radiofarmaci a base di radio.

Il primo tra questi due è stato prodotto secondo le reazioni riportate nell'articolo [98] ed è stato sintetizzato senza incontrare alcuna difficoltà. Il punto di partenza consiste in una protezione dell'acido piridin-2,6-dicarbossilico (reazione di esterificazione di Fischer), per consentire la sintesi della molecola 7. I passaggi successivi sono stati impiegati prima per ridurre parzialmente gli esteri, poi per sostituire l'ossidrile con un miglior gruppo uscente (Cl⁻); la catena clorurata (molecola 9, Figura 3.5) ottenuta partecipa alla reazione di N-alchilazione del kryptofix 22. Infine, la purificazione della molecola 12 e la successiva deprotezione in HCl 6 M consentono l'ottenimento del chelante.

Come ultimo chelante si è sintetizzato il macrophospho: in questo caso la catena laterale, molecola 11, è stata ottenuta seguendo le indicazioni riportate nell'articolo [98]. Si è dunque ossidata la 2-(clorometil)piridina con acido meta-cloroperbenzoico, successivamente fatta reagire con etil cloroformiato e fosfito di trietile. La conseguente distillazione della molecola 11 non ha portato ad una sua completa purificazione, di conseguenza si è agito utilizzando una colonna cromatografica *flash*. In definitiva, il Kryptofix 22, dopo essere stato funzionalizzato con la catena laterale (N-alchilazione), viene deprotezionato con HCl 6 M per arrivare al chelante desiderato.

Il DO4NH₂ e il macrophospho saranno sottoposti ad una caratterizzazione chimica volta a determinare le proprietà termodinamiche, cinetiche di complessamento/

decomplessamento e strutturali nella formazione di complessi con rispettivamente il rame(II)/rame(I) (e poi forse successivamente l'argento(I)) e il radio(II). Se poi, come si spera, queste molecole risultassero sufficientemente stabili, si procederà all'esecuzione delle misure mediante radioattività.

Per quanto riguarda invece il macropa, esso verrà utilizzato come standard di confronto nelle misure mediante radioattività col radio(II).

CAPITOLO 5-PARTE SPERIMENTALE

5.1 MATERIALI E REAGENTI

Tutti i reagenti di partenza (Sigma-Aldrich, Chematech e Fluka) e i solventi (Sigma-Aldrich e Carlo Erba) utilizzati non necessitano di ulteriori purificazioni.

In NMR sono impiegati solventi deuterati della Sigma-Aldrich con una purezza isotopica minima del 99.8%, mentre per le analisi di massa sono stati usati solventi Plus Gradient HPLC use. La cromatografia su strato sottile è stata eseguita su fogli di alluminio a gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck), e in alcuni casi su lastre di vetro ad allumina basica 60 F₂₅₄ (Merk). Come fase stazionaria nella cromatografia *flash* si è fatto principalmente uso di gel di silice della Kiesiegel 60M, 0.4-0.063 mm; solo in un caso specifico si è sostituita la fase stazionaria con allumina neutra (Merck).

Per la caratterizzazione in NMR si è anche fatto uso della resina a scambio ionico (Ambersep 900 hydroxide form, della Sigma Aldrich) e di soluzioni preparate per diluizione: NaOH 1 M e HCl 1 M entrambi in D₂O.

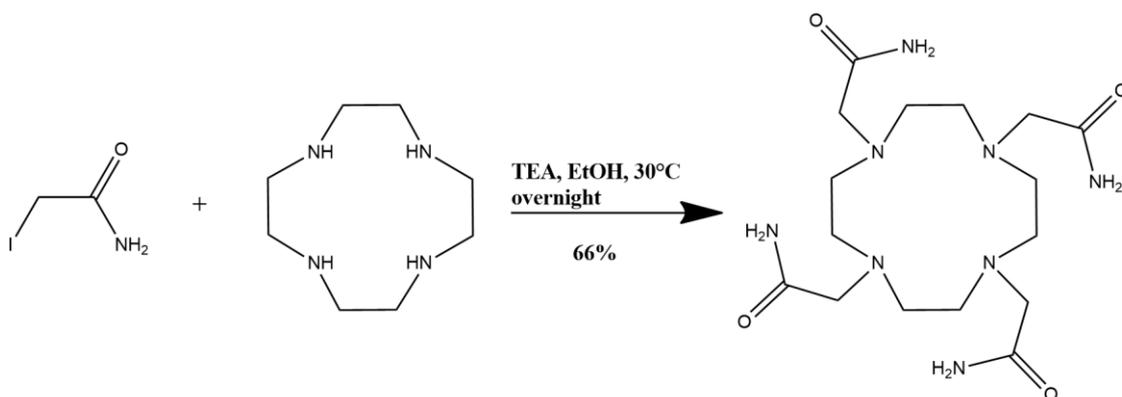
5.2 STRUMENTAZIONE

Gli spettrometri utilizzati per l'ottenimento degli spettri NMR sono i seguenti: Bruker AV III 500 a 500 MHz per ¹H e per ¹³C, Bruker Avance DPX 300 a 300 MHz per ¹H, Bruker Avance 200 a 200 MHz.

Lo strumento usato per l'analisi di massa è Agilent Technologies LC/MSD Trap SL.

5.3 PROCEDURA SINTETICHE

5.3.1 Sintesi 2-[4,7,10-tris(carbometil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-ile] acetammide (1)

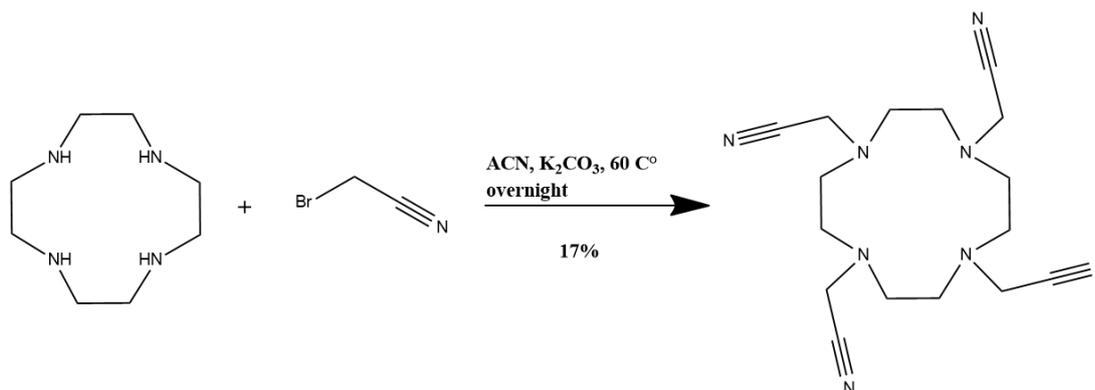


	m/V	Mw	mmol	eq	d
C₂H₄INO	2.147 g	184.96	11.61	5	
CYCLEN	400 mg	172.271	2.322	1	
TEA	1.62 mL	101.19	11.612	5	0.726 g/ml
EtOH	5 mL	46.07			

In un pallone da 25 mL, flussando azoto, e sotto agitazione magnetica, vengono sciolti 400 mg di cyclen in 5 mL di etanolo. Alla soluzione vengono poi aggiunti 1.62 mL di trietanolanmina e 2.147 grammi di iodo acetammide. Dopo 24 h, nella miscela si osserva la formazione di un precipitato, il quale viene filtrato con imbuto di buchner e successivamente lavato per diverse volte con 50 mL di etanolo. Dopo una notte in pompa da vuoto per eliminare possibili tracce di solvente, si ottengono 617 mg di solido bianco per una resa del 66%.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 2.65 (s, 16 H, *H* cyclen), 3.10 (s, 8H, cyclen-CH₂-CONH₂)

5.3.2 Sintesi 4,7,10-tris-cianometil-1,4,7,10-tetraaza-ciclododec-1-ile-acetonitrile (3)



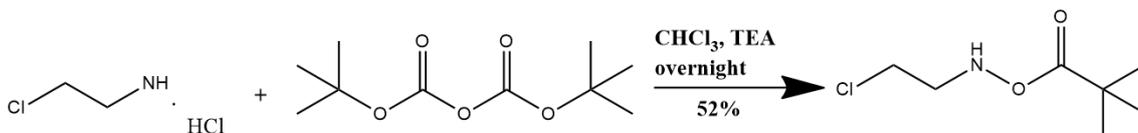
	m/V	Mw	mmol	eq	d
C₂H₂BrN	161.7 μ L	119.95	2.32	4	1.722 g/ml
CYCLEN	100 mg	172.271	0.58	1	
K₂CO₃	401 mg	138.205	2.9	5	
ACN	5 mL				

In un pallone da 25 mL, flussando azoto, vengono inseriti 100 mg insieme a 5 mL di acetonitrile anidro. Alla miscela posta sotto agitazione magnetica si aggiungono 161.7 μ L di bromoacetonitrile e 401 mg di carbonato di potassio. La miscela, trascorse 24 h, viene dapprima centrifugata per eliminare il carbonato di potassio, e il surnatante viene portato all'evaporatore rotante per rimuovere il solvente. Si procede con la purificazione in colonna cromatografica *flash* su silica gel (etere di petrolio:etil acetato 1:9) e successiva evaporazione del solvente al *rotavapor*. Si ottiene un olio scuro per una resa del 17% (33.2 mg).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.80 (s, 16H, *H cyclen*), 3.64 (s, 8H, *cyclen-CH₂-CN*)

ESI(+)**MS**: *m/z* = 329

5.3.3 Sintesi N-(2-cloroetil)-O-pivaloilidrossilammina (13)



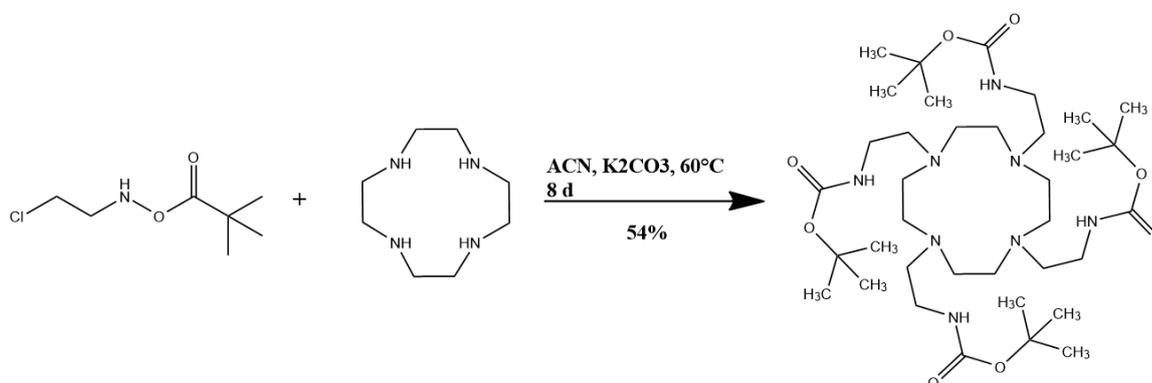
	m/V	Mw	mmol	eq	d
$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$	1 g	115.99	8.62	1	
$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_5$	1.88 g	218.25	8.62	1	
TEA	4.8 mL	101.19	34.48	4	0.726 g/ml
CHCl_3	20 mL				

All'interno di un pallone da 100 mL, sotto agitazione magnetica e flussando azoto, si scioglie 1 g di 2-cloroetilammina cloridrato in 20 mL di cloroformio anidro. Successivamente, alla soluzione si aggiungono 1.88 g di di-tert-butil dicarbonato e 4.8 mL di trietilammina. La reazione viene lasciata a reagire, sotto agitazione, in atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente *overnight*. Il giorno seguente la miscela di reazione viene addizionata con 30 mL di soluzione satura di sodio cloruro ed estratta per 3 volte con cloroformio. La fase organica viene poi anidrificata con solfato di sodio (sale igroscopico) e filtrata in imbuto su cotone per eliminare il sale disidratante. Dopo aver allontanato il solvente tramite *rotavapor* si purifica il prodotto attraverso colonna cromatografica *flash* (fase stazionaria gel di silice, fase mobile etere di petrolio/etil acetato 9:1). Le frazioni di interesse vengono raccolte all'interno di un pallone ed in seguito portate nell'evaporatore rotante per rimuovere il solvente. Dopo una notte in pompa a vuoto, si ottengono 800 mg di olio trasparente per una resa del 52%.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.47 (s, 9H, $-\text{CH}_3$), 3.44-3.52 (m, 2H, $\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.61 (t, 2H, $\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 155.8 (1C, $\text{C}=\text{O}$), 79.9 (1C, C), 44.3 (1C, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 42.5 (1C, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 28.5 (3C, C CH_3).

5.3.4 Sintesi del ((1,4,7,10-tetraacclododecano- 1,4,7,10 -tetraill) tetrakis (etan-2,1-diol) tetracarbamato (14)



	m/V	Mw	mmoli	eq
Cyclen	100 mg	172.271	0.58	1
K₂CO₃	400.8 mg	138.205	2.9	5
ClCH₂CH₂BOC	625 mg	179.645	3.48	6
ACN	5 ml			

In un pallone da 25 mL, flussando azoto, vengono sciolti 100 mg di cyclen in 5 ml di acetonitrile anidro; in seguito, si aggiungono 4 equivalenti di tert-butile (2-cloroetil) carbammato e 5 equivalenti di carbonato di potassio. La temperatura della reazione viene portata a 60°C e lasciata sotto agitazione magnetica e in atmosfera d'azoto per una notte. La reazione viene monitorata tramite analisi di massa che indica la formazione di *cyclen* trisostituito. Per spingere la reazione verso la formazione del prodotto di interesse vengono aggiunti 2 equivalenti di catena protetta con il Boc (208.39 mg). La reazione viene monitorata per una settimana tramite spettrometro di massa e TLC in allumina basica con eluente diclorometano/metanolo 98:2 (*stain* di ninidrina). La miscela viene quindi centrifugata con l'obiettivo di eliminare il carbonato di potassio e il surnatante viene portato all'evaporatore rotante per rimuovere il solvente. Si procede con una purificazione tramite colonna cromatografica *flash*, con fase stazionaria di allumina neutra e miscela eluente a gradiente di

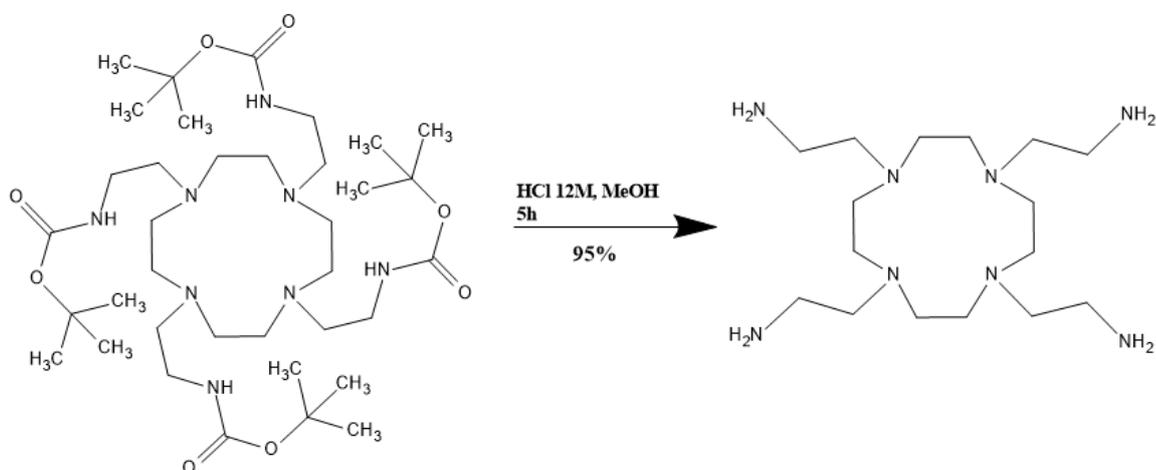
diclorometano/metanolo da 100% diclorometano a 98:2 diclorometano/metanolo. Vengono ottenuti 234 mg di solido bianco per una resa del 54%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (s, 36H, -CH₃), 2.44 (t, 8H, CH₂-CH₂-NH-Boc), 2.56 (s, 16H, *H cyclen*), 3.15 (t, 8H, -CH₂-NH-Boc)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 156.5 (4C, C=O), 78.9 (4C, C), 54.5 (4C, CH₂-CH₂-NH), 54.1 (8C, *C cyclen*), 38.5 (4C, CH₂-CH₂-NH), 28.8 (12C, C CH₃).

ESI(+)MS: *m/z*= 746

5.3.5 Sintesi [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-etilammina)] (DO4NH2) (15)



	m/V	Mw	mmol	eq	d
Cyclen tetrasostituito	234 mg	745.01	0.314	1	
HCl 12 M (37%)	312 μ L	36.46	10.09	32.16	1.18 g/ml
MeOH	6 ml				

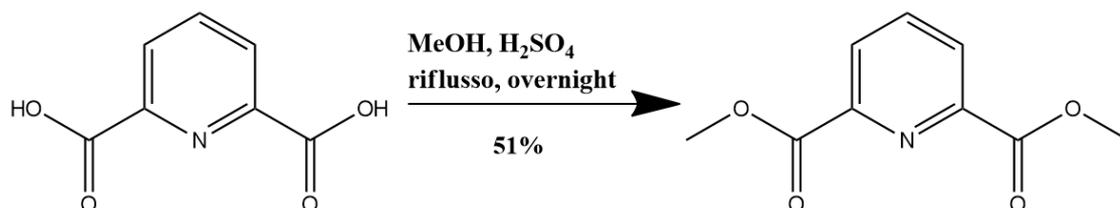
In un pallone da 25 ml, flussando azoto e sotto agitazione magnetica, vengono aggiunti 234 mg di ((1,4,7,10-tetraaciclododecano- 1,4,7,10 -tetrail) tetrakis (etan-2,1-diol)) tetracarbammato, 312 μ L di HCl 37% (12 M) e 6 ml di metanolo. Si lascia reagire per 5 h a temperatura ambiente e si rimuove il solvente con il *rotavapor*. Si ottengono 141.4 mg di solido bianco per una resa del 95%.

1H NMR (500 MHz, D_2O , pH 7 Figura A 5.2): δ 2.81-2.75 (m, 24H, 16H cyclen e 8H -CH₂-CH₂-NH₂), 2.96 (t, 8H -CH₂-CH₂-HN₂)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 52.8 (4C, cyclen-CH₂-CH₂-NH₂), 49.7 (8C, C cyclen), 35.8 (4C, CH₂-CH₂-NH₂).

ESI(+)**MS**: m/z = 345

5.3.6 Sintesi di dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato (16)



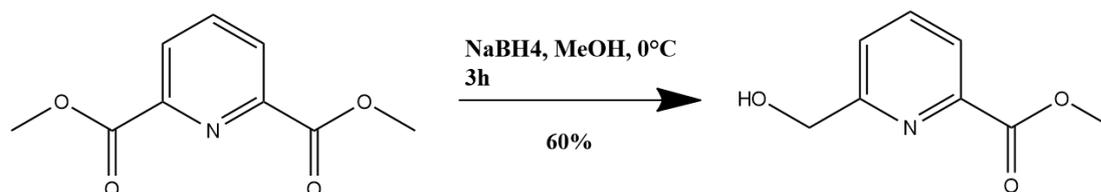
	m/V	Mw	mmoli	eq	d
C₇H₅NO₄	4 g	167.12	23.93	1	
H₂SO₄	10 ml	98.09	0.19	0.008	1.83 g/ml
MeOH	50 ml				

In un pallone da 100 ml vengono aggiunti 4 grammi di acido dipicolinico, che sono sciolti in 50 ml di metanolo sotto agitazione magnetica. Alla soluzione si aggiungono, goccia a goccia, 10 ml di acido solforico concentrato, e si lascia reagire *overnight* a riflusso sotto atmosfera di azoto. La miscela di reazione viene portata al *rotavapor* per rimuovere il solvente. In seguito, dopo aver aggiunto 20 mL di acqua MilliQ e neutralizzato con NaOH, la soluzione acquosa viene estratta per 3 volte con cloroformio. La soluzione organica viene trattata con il sale disidratante (solfato di sodio), filtrata e portata al *rotavapor* per rimuovere il solvente. Si ottiene un solido di color bianco, con una resa del 51% (2.379 g)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.04 (s, 6H, O-CH₃), 8.04(t, 1H, H piridina), 8.33 (d, 2H, H piridina)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 165.4 (2C, C=O), 148.4 (2C, C piridina), 138.6 (1C, C piridina), 128.2 (2C, C piridina), 53.5 (2C, CH₃)

5.3.7 Sintesi di dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato (17)



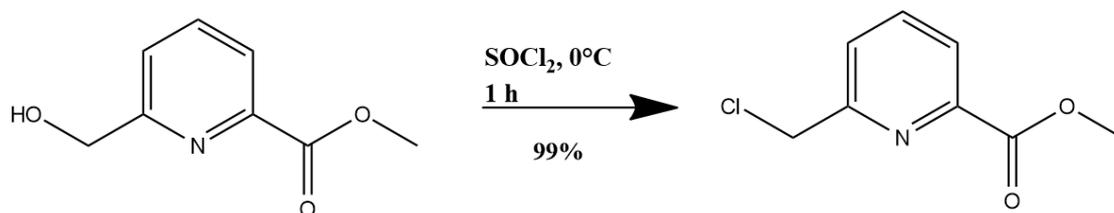
	m/V	Mw	mmoli	eq
C₉H₉NO₄	2.379 g	195.17	12.18	1
NaBH₄	691 mg	37.83	18.27	1.5
MeOH	90 mL			

All'interno di un pallone da 250 mL, posto in bagno di ghiaccio, si prepara una soluzione di dimetilpiridina-2,6-dicarbossilato in 90 mL di metanolo. Alla miscela agitata magneticamente sono aggiunti con piccole porzioni, in un tempo di 30 minuti, 691 mg di sodio-boroidruro. Trascorse 3 h alla temperatura di 0°C, si *quencha* la reazione aggiungendo al pallone 50 mL di soluzione satura di bicarbonato di sodio e si procede con l'estrazione in cloroformio. Si è poi aggiunto sodio solfato, filtrato su imbuto con cotone e rimosso il solvente in *rotavapor*. Il solido così ottenuto viene purificato in colonna cromatografica *flash* (gel di silice, diclorometano/metanolo 95:5) ricavando 1.1867 grammi di solido bianco. La resa è del 60 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.01 (s, 3H, -CH₃), 4.88 (s, 2H, piridina-CH₂-OH), 7.56 (d, 1H, *H* piridina), 7.88 (t, 1H, *H* piridina), 8.06 (d, 1H, *H* piridina)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 165.4 (1C, C=O), 160.1 (1C, C piridina), 147.0 (1C, C piridina), 137.9 (1C, C piridina), 124.2 (1C, C piridina), 123.9 (1C, C piridina), 64.7 (1C, CH₂-OH), 53.5 (1C, O-CH₃)

5.3.8 Sintesi di metile 6-(clorometil)picolinato (18)



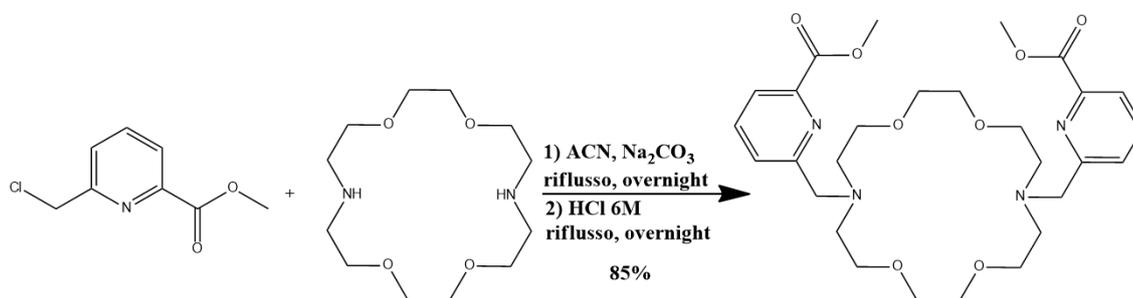
	m/V	Mw	mmoli	eq
C₈H₉NO₃	1.1867 g	167.16	7.10	1
SOCl₂	774 μL	118.97	10.65	1.5

In un pallone da 25 ml, posto sotto atmosfera di azoto, si mette a reagire il metile 6-(idrossimetil) piridina-2-carbossilato con cloruro di tionile in eccesso (774 μL), per 1 ora in bagno di ghiaccio (0°C). Si controlla il decorso della reazione tramite TLC in silica gel (etere di petrolio/etil acetato 4:6); una volta vista la scomparsa del reagente iniziale, la miscela viene portata al *rotavapor* per rimuovere il solvente. Si sono ottenuti 1.3169 grammi di solido bianco per una resa del 99%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.07 (s, 3H, O-CH₃), 5.02 (s, 2H, Cl-CH₂-piridina), 7.9 (d, 1H, *H* piridina), 8.08 (t, 1H, *H* piridina), 8.19 (d, 1H, *H* piridina).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.8 (1C, C=O), 157.2 (1C, C piridina), 146.9 (1C, C piridina), 139.1 (1C, C piridina), 126.8 (1C, C piridina), 124.8 (1C, C piridina), 53.3 (1C, CH₂-Cl), 45.7 (1C, O-CH₃)

5.3.9 Sintesi N,N'-bis[(6-metossicarbossi 2-piridil)metil]-4,13-diaza-18-corona-6 (19)



	m/V	Mw	mmoli	eq
Kryptofix 22	300 mg	262.35	1.14	1
C ₈ H ₈ ClNO ₂	533.70 mg	186.61	2.86	2.5
Na ₂ CO ₃	606.26 mg	105.99	5.72	5
ACN	16 ml			

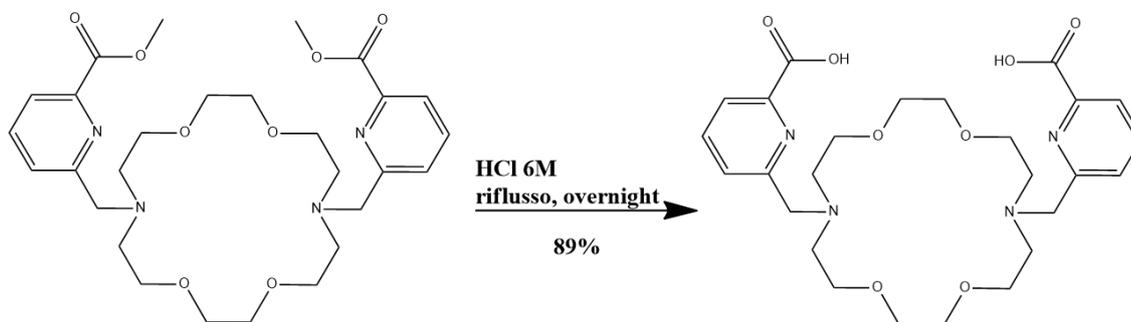
Si pesano 300 mg di Kryptofix 22 e li si inseriscono in un tubo a pressione dove vengono sciolti in 16 ml di acetonitrile anidro. Successivamente, flussando azoto, si procede con l'aggiunta di 533.70 mg metil 6-(clorometil) picolinato e di 606.26 mg di carbonato di sodio. Finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e la temperatura portata a 60°C. Si lascia reagire per 24 h monitorando con TLC in gel di silice (dicloro metano/metanolo 9:1). Per eliminare il sale in eccesso si prosegue con il trasferimento della miscela in provetta con successiva centrifugazione. La fase organica recuperata viene prima portata all'evaporatore rotante per eliminare il solvente, e poi purificata in colonna cromatografica *flash* (fase stazionaria gel di silice, fase mobile diclorometano/metanolo 9:1). La rimozione dell'eluente in *rotavapor* permette di ricavare un olio marrone del peso di 545.5 mg. La resa è pari al 85%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.63 (t, 8H, *H* Kriptofix), 3.36 (s, 8H, *H* Kriptofix), 3.44 (t, 8H, *H* Kriptofix), 3.74 (s, 4H, -CH₂-piridina), 3.76 (s, 6H, O-CH₃), 7.53-7.71 (m, 4H, *H* piridina), 7.77 (d, 2H, *H* piridina).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 150.9 (2C, C=O), 147.5 (4C, *C piridina*), 139.8 (2C, *C piridina*), 127.5 (2C, *C piridina*), 125.2 (2C, *C piridina*), 70.2 (4C, *C Kriptofix*), 64.5 (4C, *C Kriptofix*), 57.6 (2C, piridina-CH₂-Kriptofix), 54.5 (4C, *C Kriptofix*).

ESI(+)MS: *m/z* = 561

5.3.10 Sintesi acido 6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene))dipicolinico (macropa)



	m/V	Mw	mmoli	eq
C₂₈H₄₀N₄O₈	545.5 mg	560.64	0.97	1
HCl 6 M	6 ml			

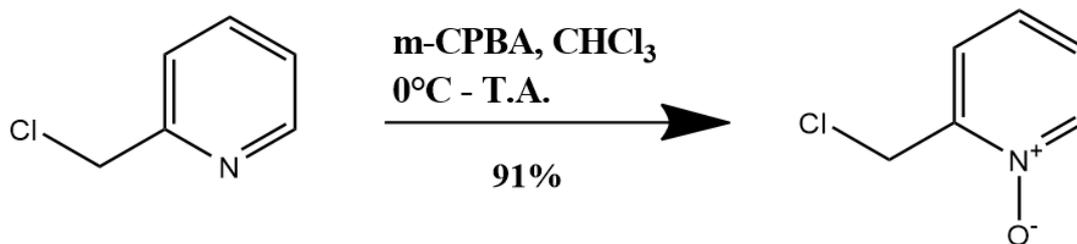
I 545.5 mg di N,N'-bis[(6-metossicarbossi 2-piridil)metil]-4,13-diaza-18-corona-6 vengono messi all'interno di un pallone da 25 mL e trattati con 6 ml HCl 6 M. La deprotezione dell'estere metilico avviene in 24 h a refluxo. Il solvente viene evaporato ottenendo un solido di colore bianco per una resa dell'89% (485.6 mg).

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 3.68 (s broad, 16H, *H* Kriptofix)-3.97 (s broad, 8H, *H* kryptofix), 4.85 (s, 4H, kryptofix-CH₂-piridina), 7.83 (d, 2H, *H* piridina), 8.12 (t, 2H, *H* piridina), 8.21 (d, 2H, *H* piridina).

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ 166.0 (2C, C=O), 150.9 (2C, *C* piridina), 147.6 (2C, *C* piridina), 139.4 (2C, *C* piridina), 127.5 (2C, *C* piridina), 125.0 (2C, *C* piridina), 70.2 (4C, *C* Kriptofix), 64.7 (4C, *C* Kriptofix), 57.6 (2C, piridina-CH₂-Kriptofix), 54.3 (4C, *C* Kriptofix).

ESI(+)MS: *m/z* = 533

5.3.11 Sintesi di 2-(clorometil)piridina 1-ossido (20)



	m/V	Mw	mmoli	eq
C₆H₆ClN	1 g	127.03	7.8	1
C₇H₅ClO₃	2.88 g	172.57	11.17	1.5
CHCl₃	100 ml			

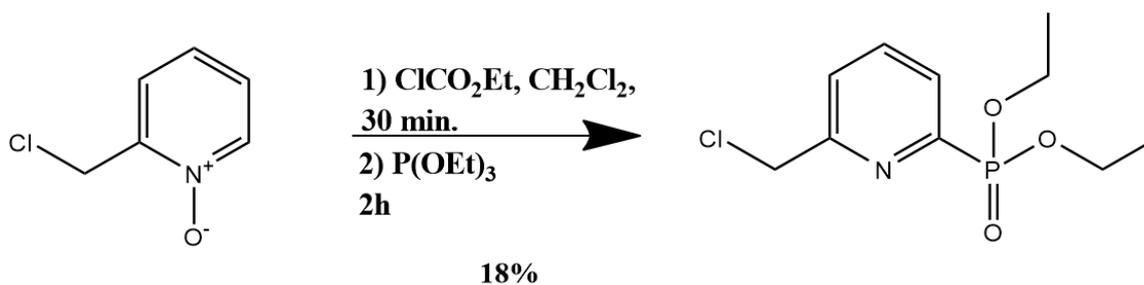
Un pallone da 250 ml viene posto in un contenitore con ghiaccio, e al suo interno si inserisce 1 g di clorometil piridina, che viene sciolto sotto agitazione magnetica e flusso di azoto in 70 ml di cloroformio anidro. Una soluzione di acido meta-cloroperossibenzoico (2.88 g) in 30 ml di cloroformio viene poi aggiunta lentamente alla miscela di reazione attraverso l'uso della *syringe pump* in un tempo di 90 minuti. Una volta finita l'aggiunta, viene tolto il bagno di ghiaccio e la reazione viene lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente *overnight*. Il giorno seguente si monitora il decorso della reazione con TLC in allumina neutra (cloroformio/metanolo 98:2) e si purifica in colonna cromatografica *flash* (stesse fasi della TLC). Si sono ottenuti 1.19 g di olio giallo con una resa del 91%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.86 (s, 2H, -CH₂-Cl), 7.23-7.36 (m, 2H, *H* piridina), 7.64 (d, 1H, *H* piridina), -8.29 (d, 1H, *H* piridina)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 140.6 (1C, *piridina*), 125.9 (1C, *C piridina*), 125.6 (1C, *C piridina*), 125.2 (2C, *C piridina*), 40.0 (1C, Cl-CH₂).

ESI(+)MS: *m/z* = 144

5.3.12 Sintesi dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato (21)



	m/V	Mw	mmoli	eq	d
C₆H₆ClNO	1.19 g	143.57	8.29	1	
ClCO₂Et	2.377 ml	108.52	24.87	3	1.135 g/ml
P(OEt)₃	4.327 ml	166.16	24.87	3	0.995 g/ml
DCM	25 ml				

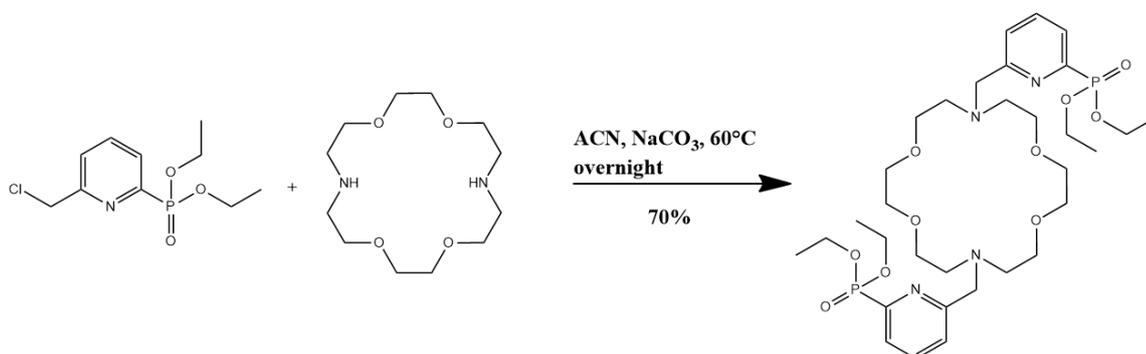
All'interno di un pallone da 100 ml, posto sotto agitazione magnetica e in atmosfera di azoto, l'*N*-ossido della 2-(clorometil) piridina viene sciolto in 25 ml di diclorometano anidro. Alla soluzione formatasi si aggiungono prima 2.377 ml di etil cloroformiato, e dopo 30 minuti si aggiungono 4.327 ml di fosfito di trietile (aggiunti goccia a goccia). Trascorse 2 h si controlla la reazione con TLC in gel di silice (dicloro metano/metanolo 97:3). La miscela risultante viene trattata (lavata) con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, acqua Milli-Q e salamoia (soluzione di cloruro di sodio satura). Dopo aver rimosso in parte le impurità tramite distillazione in vuoto, si purifica il grezzo con cromatografia *flash* in silica gel (dicloro metano/metanolo 99%/1%). La resa dell'olio ottenuto è del 18% (382 mg).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.37 (t, 6H, O-CH₂-CH₃), 1.46 (m, 4H, O-CH₂-CH₃), 4.76 (s, 2H, Cl-CH₂-), 7.67 (d, 1H, *H* piridina), -7.83-7.93 (m, 2H, *H* piridina).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 152.6 (1C, *piridina*), 150.7 (1C, *C piridina*), 137.2 (1C, *C piridina*), 127.3 (1C, *C piridina*), 125.2 (1C, *C piridina*), 63.3 (2C, O-CH₂-CH₃), 46.1 (1C, Cl-CH₂), 16.5 (2C, O-CH₂-CH₃).

ESI(+)MS: *m/z* = 264

5.3.13 Sintesi tetraetile (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo))bis(fosfonato) (22)



	m/V	Mw	mmoli	eq
Kryptofix 22	165 mg	262.35	0.63	1
C₁₀H₁₅ClNO₃P	333.9 mg	263.66	1.44	2.3
Na₂CO₃	382 mg	105.99	3.15	5
ACN	8 ml			

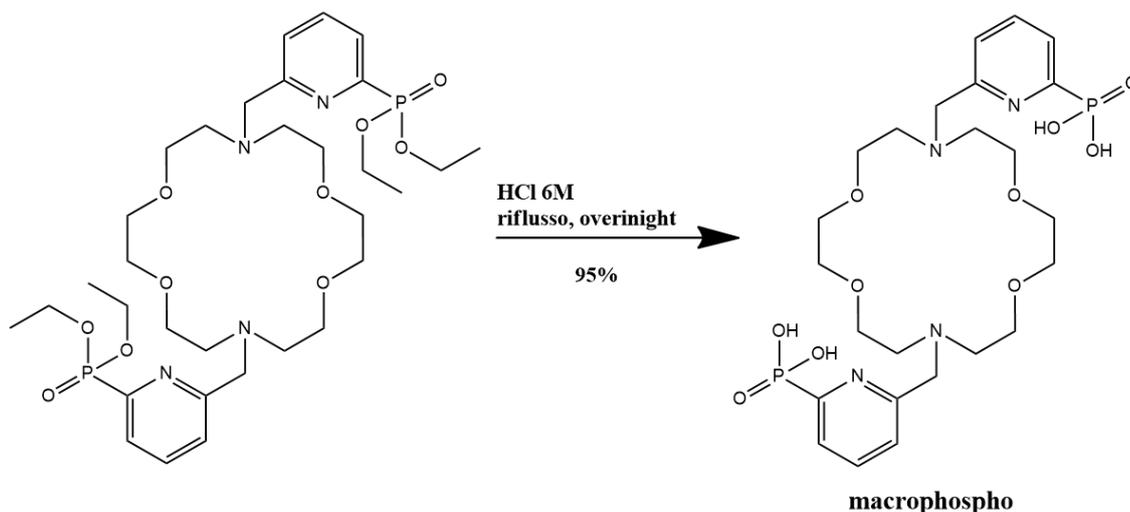
In pallone da 25 ml vengono posti, sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, 165 mg di *Kryptofix 22* e 8 ml di acetonitrile. Vengono poi aggiunti 333.9 mg di dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato e 382 mg di carbonato di sodio, e la temperatura viene portata a 60°C. Trascorsa la notte si esegue un'analisi con TLC (gel di silice) e si procede con la purificazione del grezzo utilizzando la cromatografia *flash* su gel di silice ed eluente diclorometano/metanolo 95:5; le frazioni di interesse vengono recuperate e portate in *rotavapor* per rimuovere il solvente. Si ottiene un olio giallo, con una resa del 70% (315 mg).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (t, 12H, -CH₂CH₃), 2.81-2.90 (m, 8H, *H Kryptofix*), 3.54-3.64 (m, 16H, *H Kryptofix*), 3.92 (s, 4H, *Kryptofix-CH₂-piridina*), 4.14-4.28 (m, 8H, CH₂CH₃), 7.69-7.80 (m, 6H, *H piridina*)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 151.8 (1C, *piridina*), 150.0 (1C, *C piridina*), 136.5 (1C, *C piridina*), 126.4 (1C, *C piridina*), 125.2 (1C, *C piridina*), 70.5 (8C, *C Kriptofix*) 63.0 (4C, O-CH₂-CH₃), 61.1 (2C, Cl-CH₂), 54.7 (4C, *C Kriptofix*), 16.5 (4C, O-CH₂-CH₃).

ESI(+)MS: m/z = 717

5.3.14 Sintesi acido (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo)) difosfonico (macrophosfo)



	m/V	Mw	mmoli	eq
C₃₂H₅₄N₄O₁₀P₂	315 mg	716.75	0.44	1
HCl 6M	10 ml			

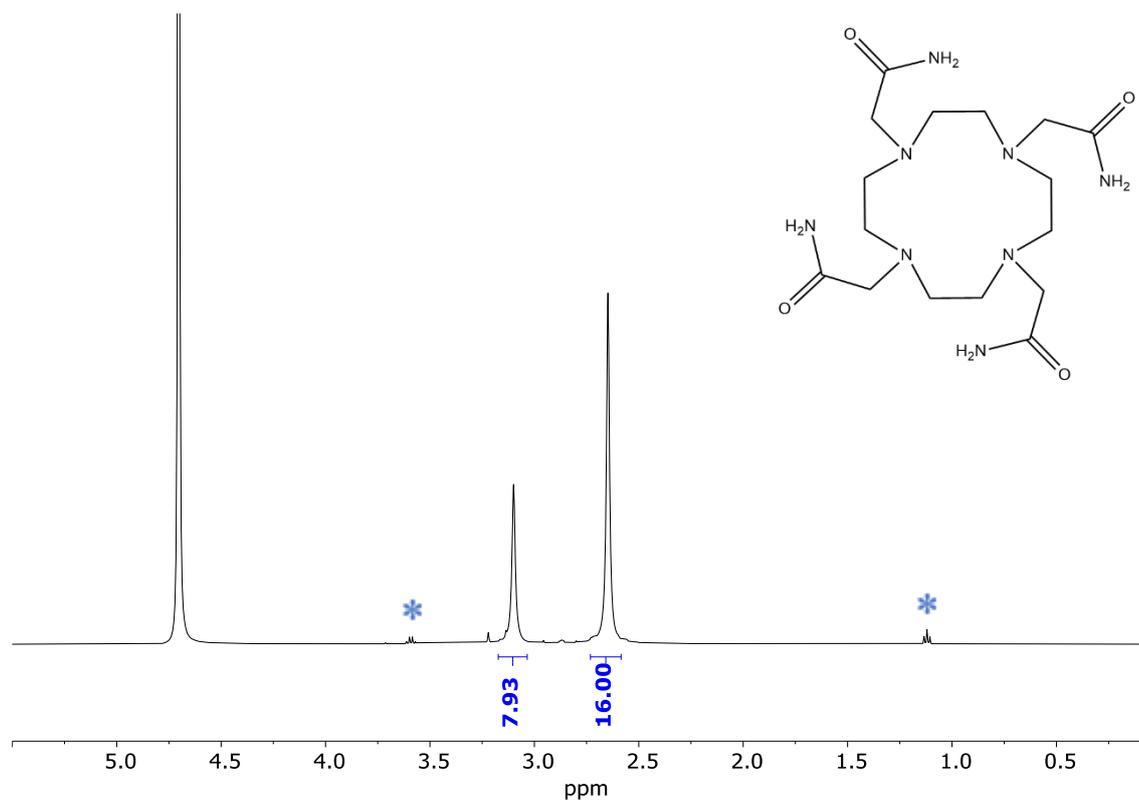
315 mg di (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo))bis(fosfonato) vengono fatti reagire con 10 ml di acido cloridrico 6 M, per 24 h a refluxo. La miscela di reazione viene poi portata all'evaporatore rotante per rimuovere il solvente. Si ottiene così un olio giallo di 298.6 mg per una resa del 95%.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.50-3.60 (m, 16H, H kryptofix 22), 3.79-3.86 (m, 8H, *H Kriptofix*), 4.68 (s, 4H, -CH₂-), 7.67 (d, 2H, *H piridina*), 7.90 (t, 2H, *H piridina*), 8.03-8.09 (m, 2H, *H piridine*)

¹³C NMR: δ 155.6 (2C, *piridina*), 153.6 (2C, *C piridina*), 149.2 (2C, *C piridina*), 140.5 (2C, *C piridina*), 127.5 (2C, *C piridina*), 69.7 (4C, *C Kriptofix*), 63.9 (4C, *C Kriptofix*), 57.0 (2C, -CH₂-), 54.2 (4C, *C Kriptofix*).

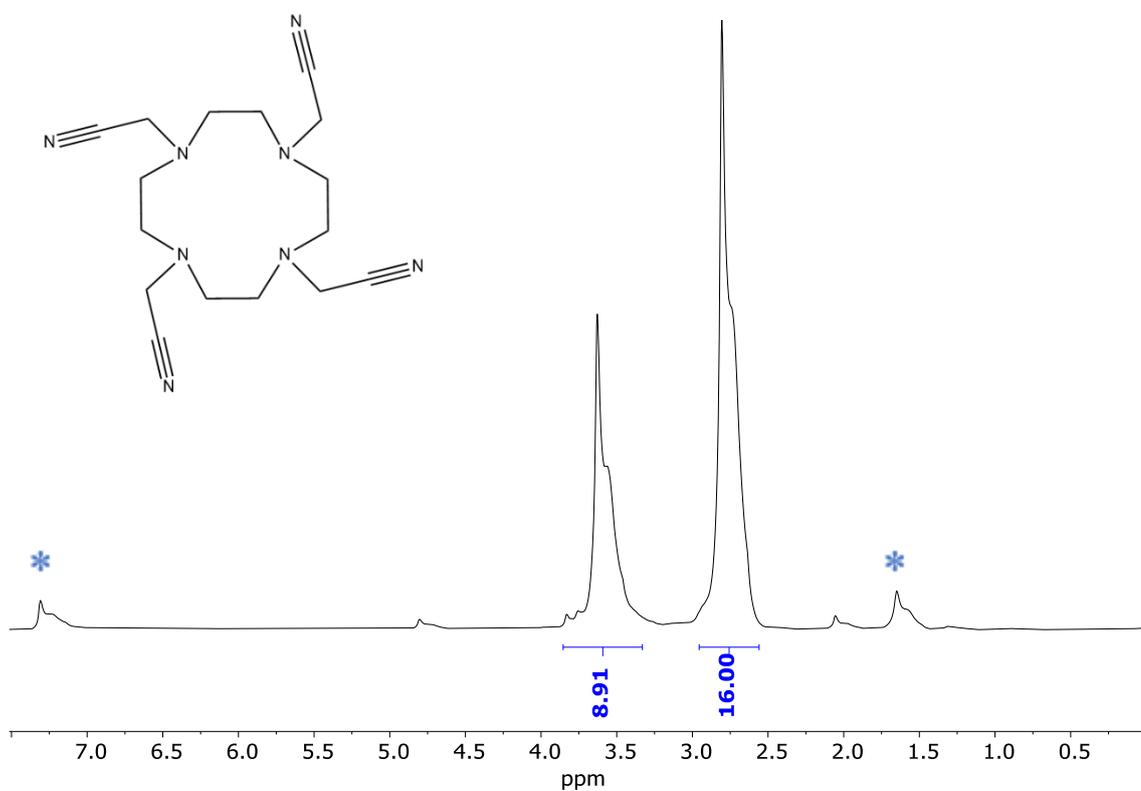
APPENDICE

A.1 Caratterizzazioni 2-[4,7,10-tris(carbometil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-ile] acetammide (1)



A.1.1 spettro $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 1. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

A.2 Caratterizzazioni 4,7,10-tris-cianometil-1,4,7,10-tetraaza-ciclododec-1-ile-acetonitrile (3)



A.2.1 spettro ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) del composto 3. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

A.3 Caratterizzazioni N-(2-cloroetil)-O-pivaloilidrossilammina (13)

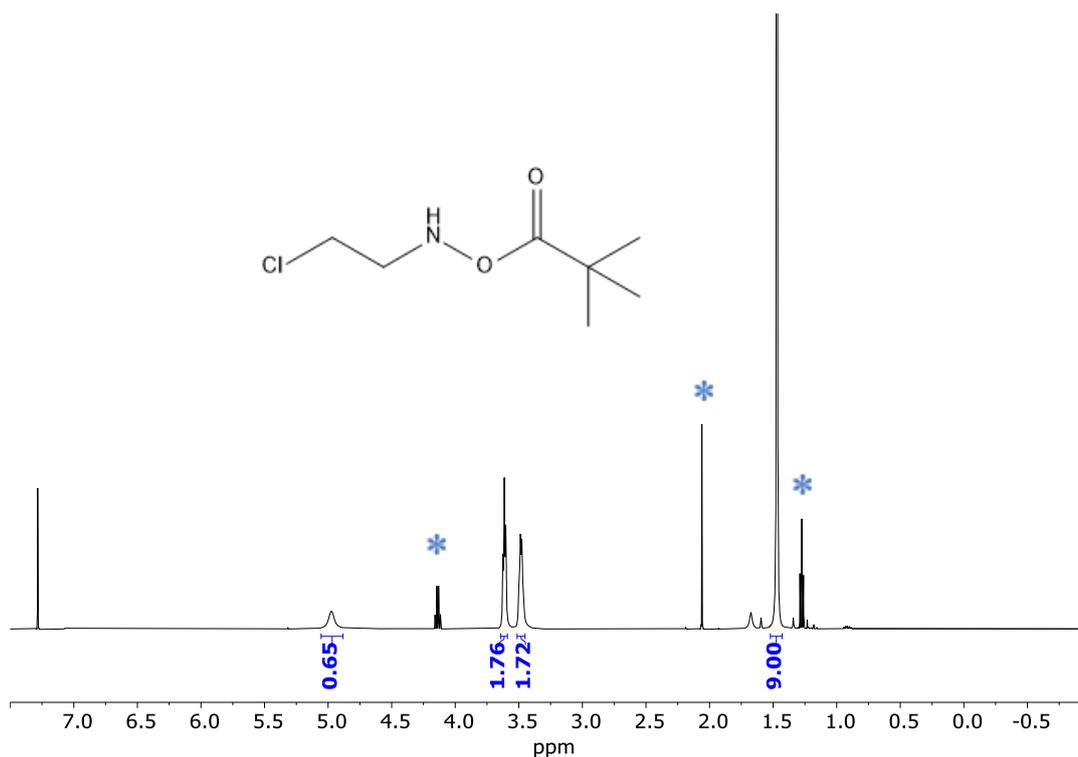


Figura A.3.1: spettro $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 13. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

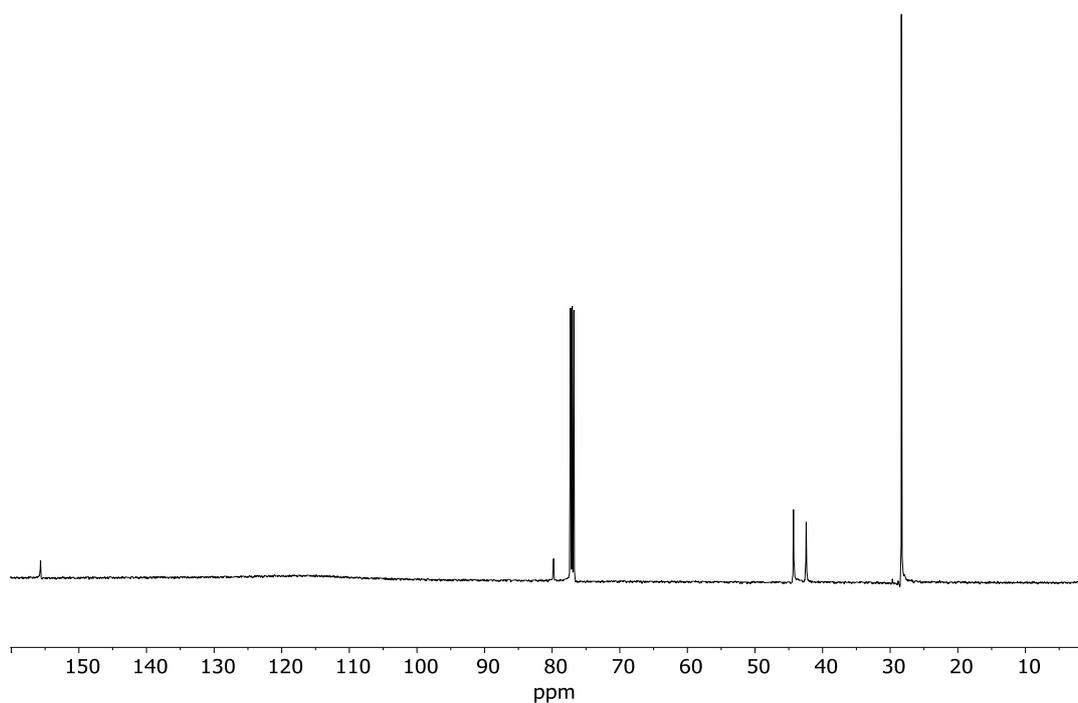


Figura A.3.2: spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) del composto 13.

A.4 Caratterizzazioni ((1,4,7,10-tetraaciclododecano- 1,4,7,10 -tetrail) tetrakis (etan-2,1-diol)) tetracarbamato (14)

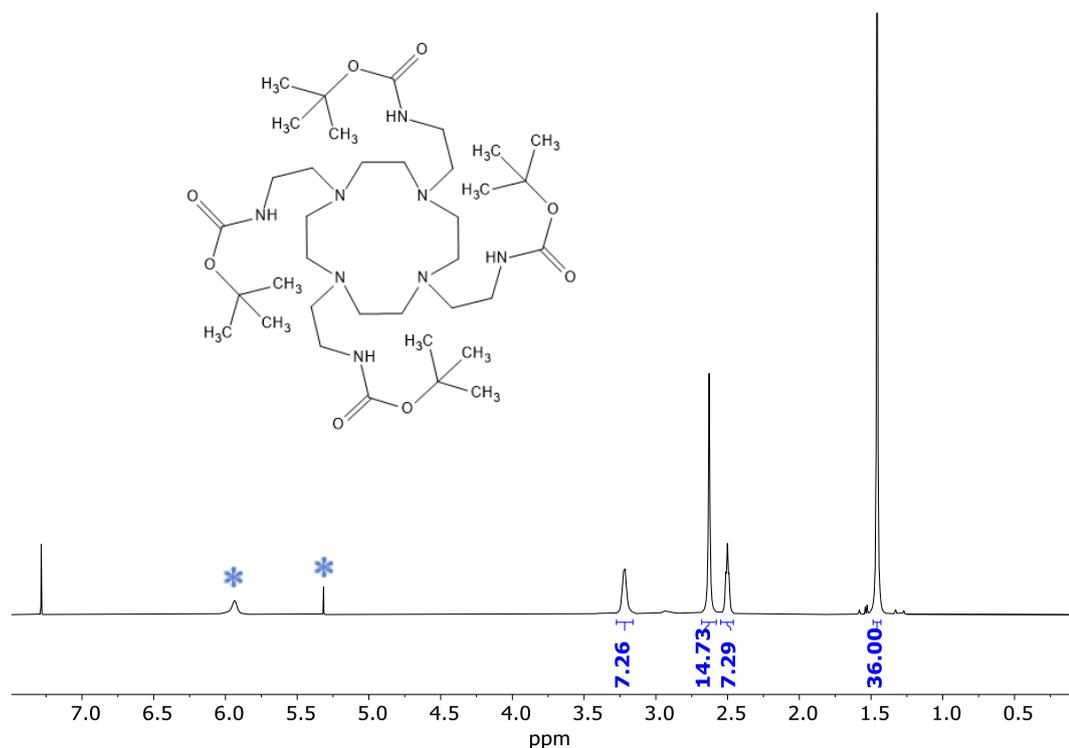


Figura A.4.1: spettro ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) del composto 14. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

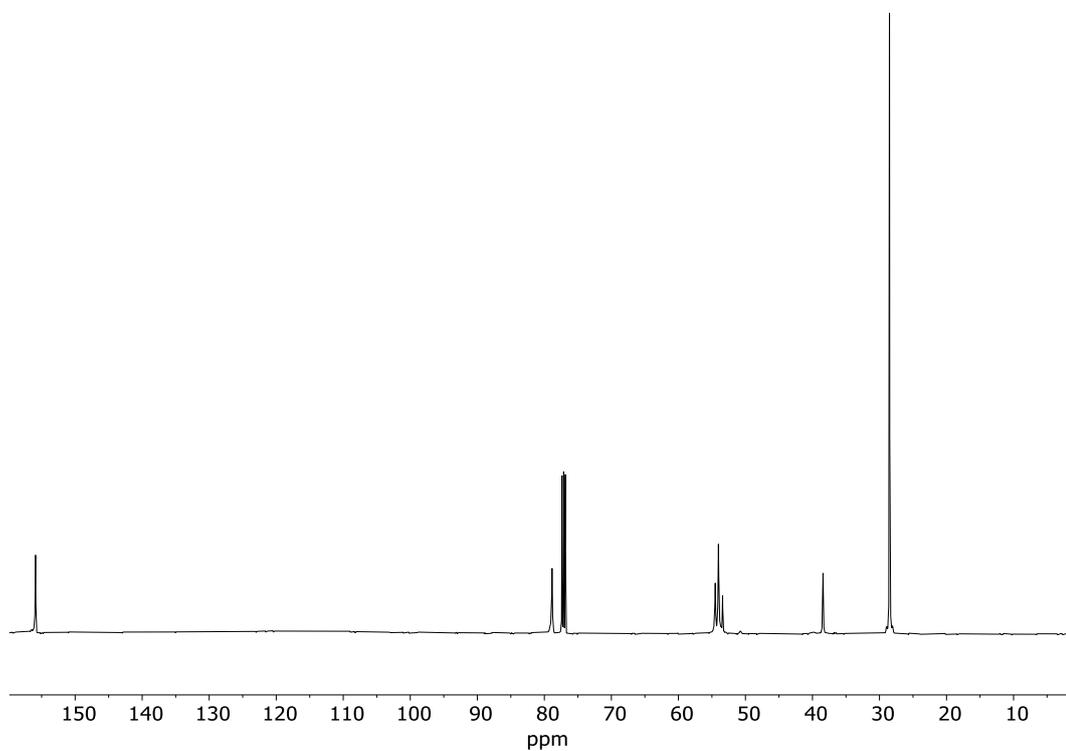


Figura A.4.2: spettro ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) del composto 14.

A.5 Caratterizzazioni
etilammina)] (DO4NH2)

[1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrakis(2-

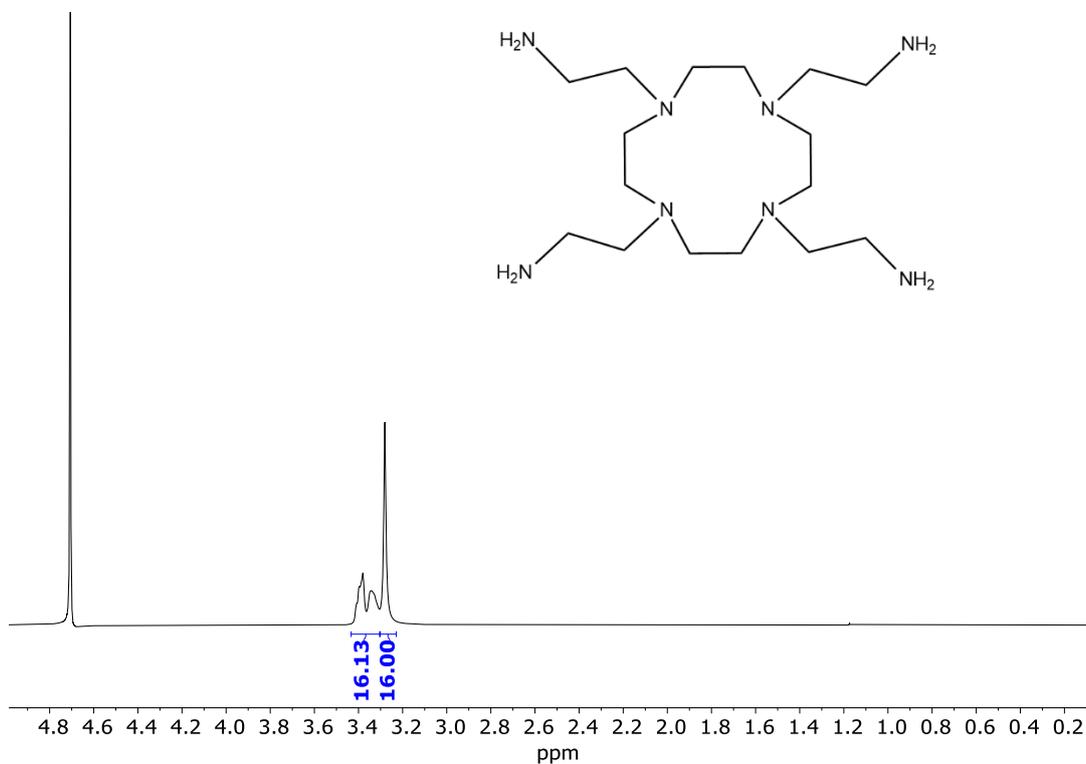


Figura A.5.1: spettro ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) del DO4NH₂ a pH autogeno.

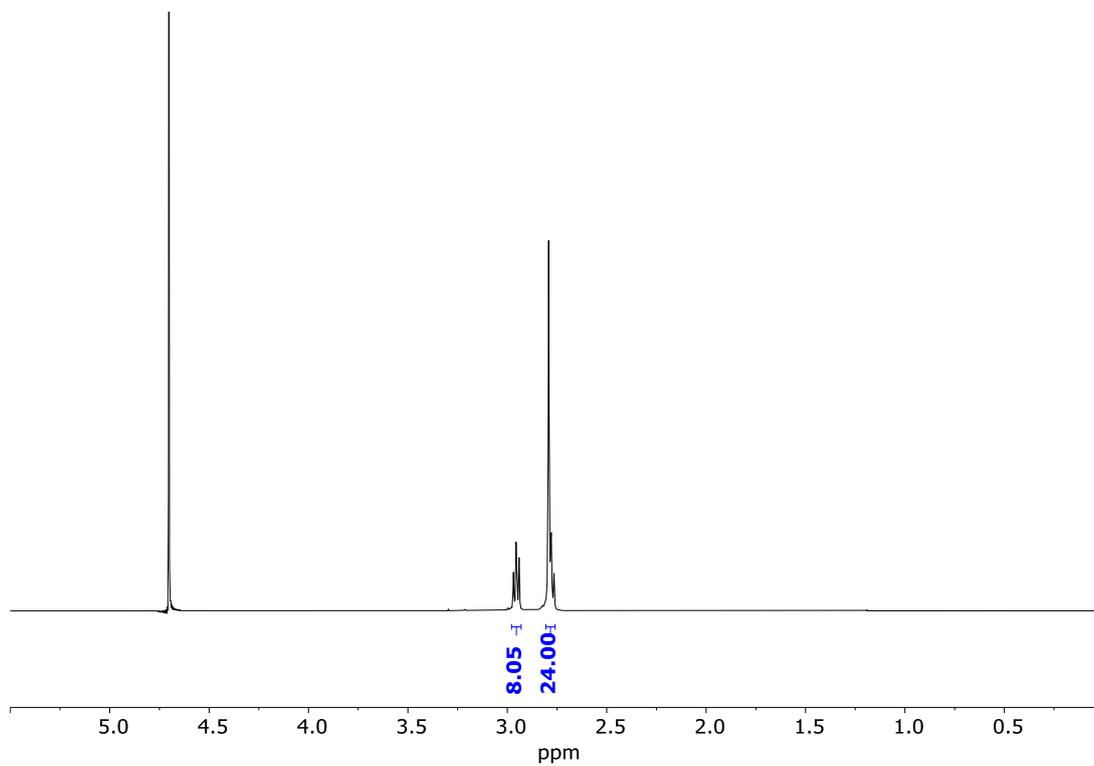


Figura A.5.2: spettro ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) del DO4NH₂ a pH 7.

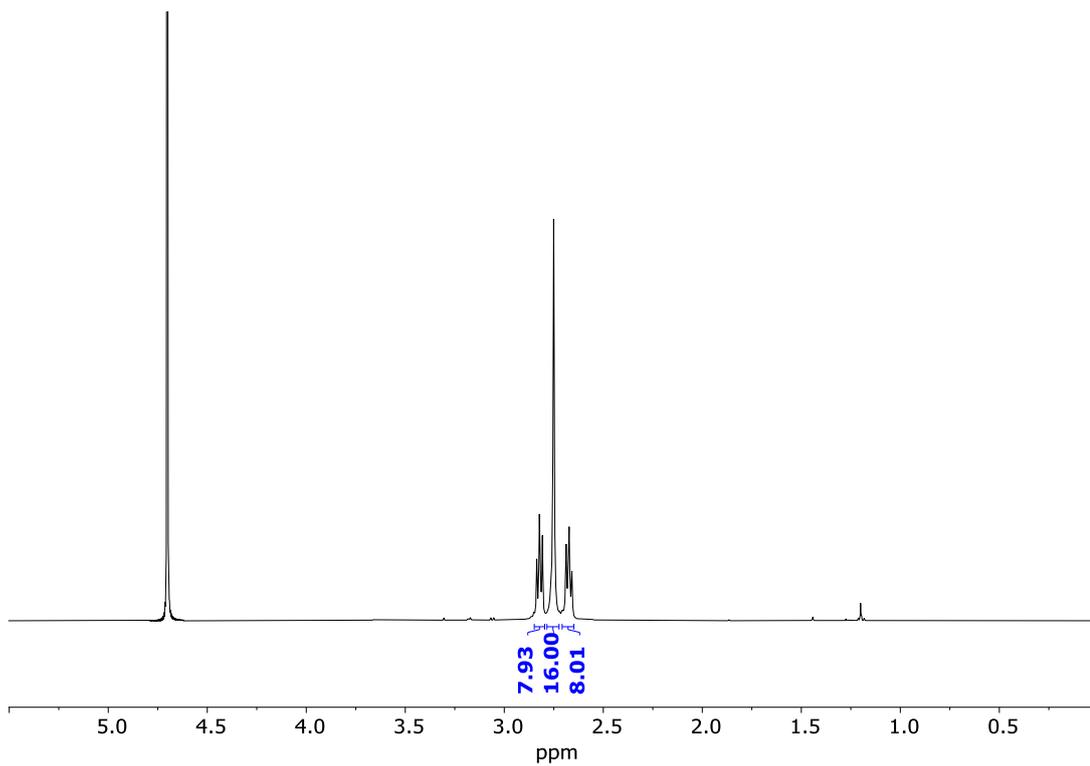


Figura A.5.3: spettro ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) del DO4NH₂ a pH 7.5.

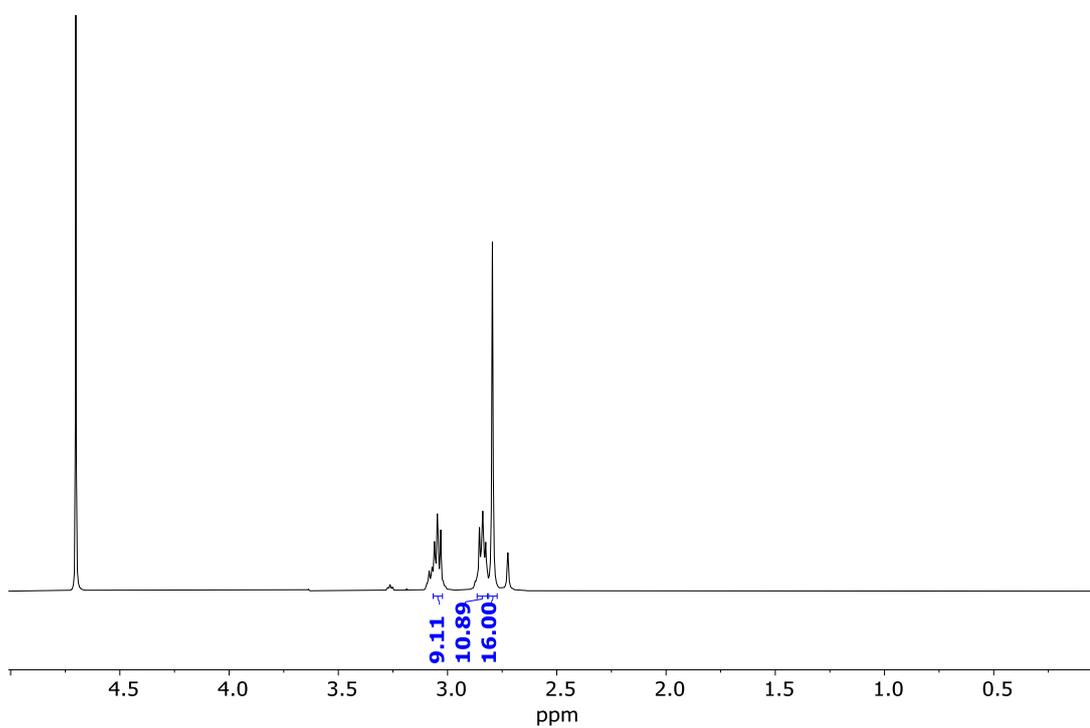


Figura A.5.4: spettro ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) del DO4NH₂ dopo passaggio in resina a scambio ionico.

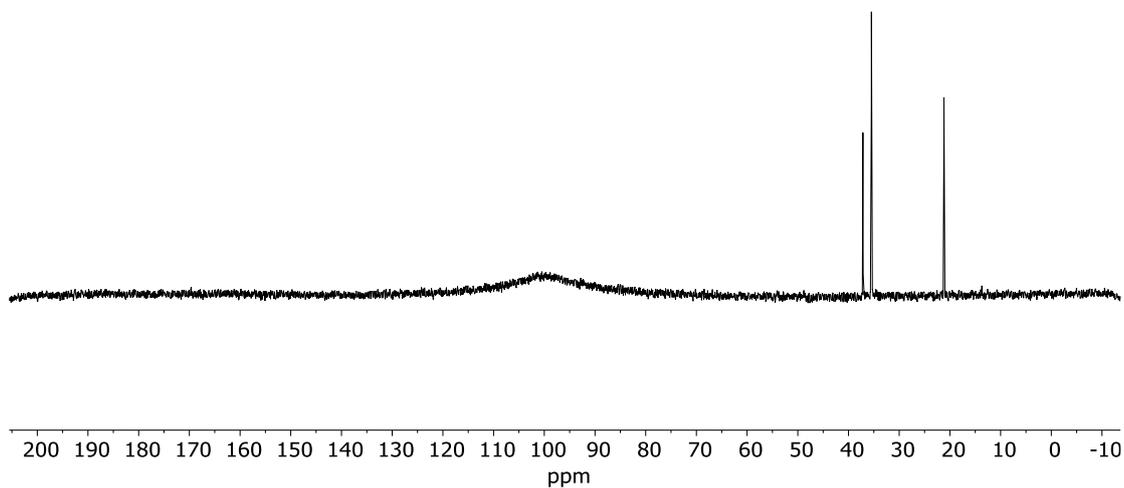


Figura A.5.5: spettro ^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O) del DO4NH_2 a pH 7.

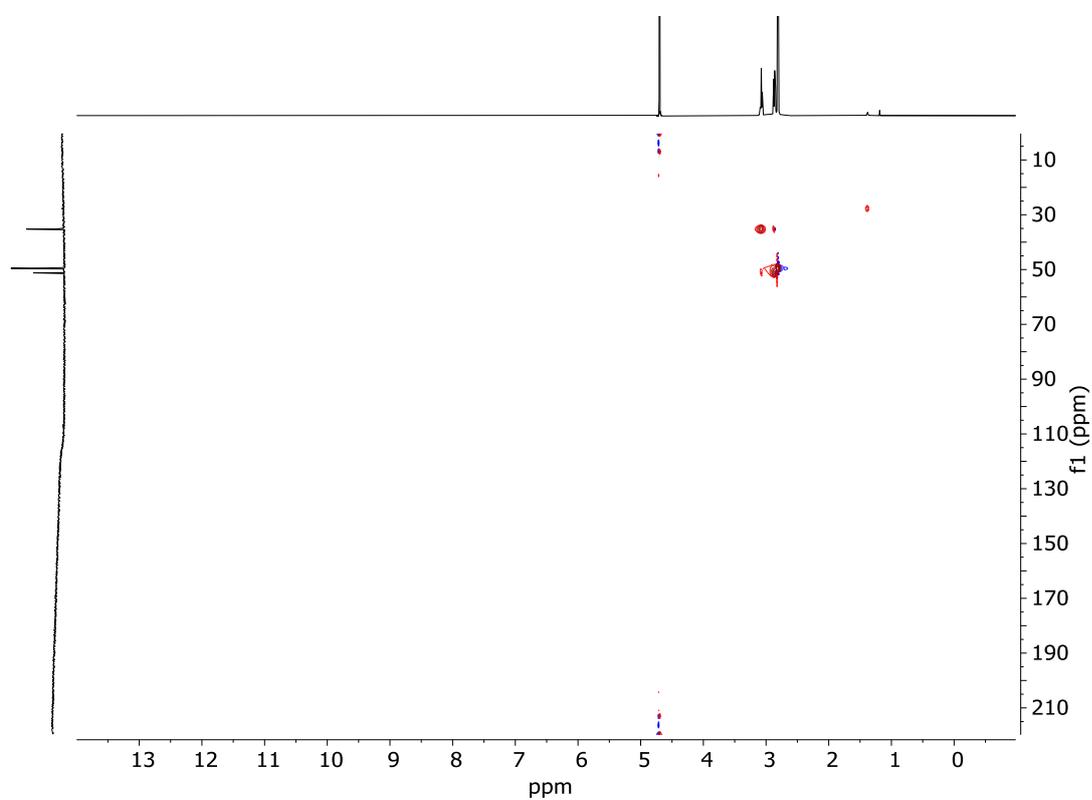


Figura A.5.6: spettro HSQC (500 MHz, D_2O) del DO4NH_2 a pH 7.

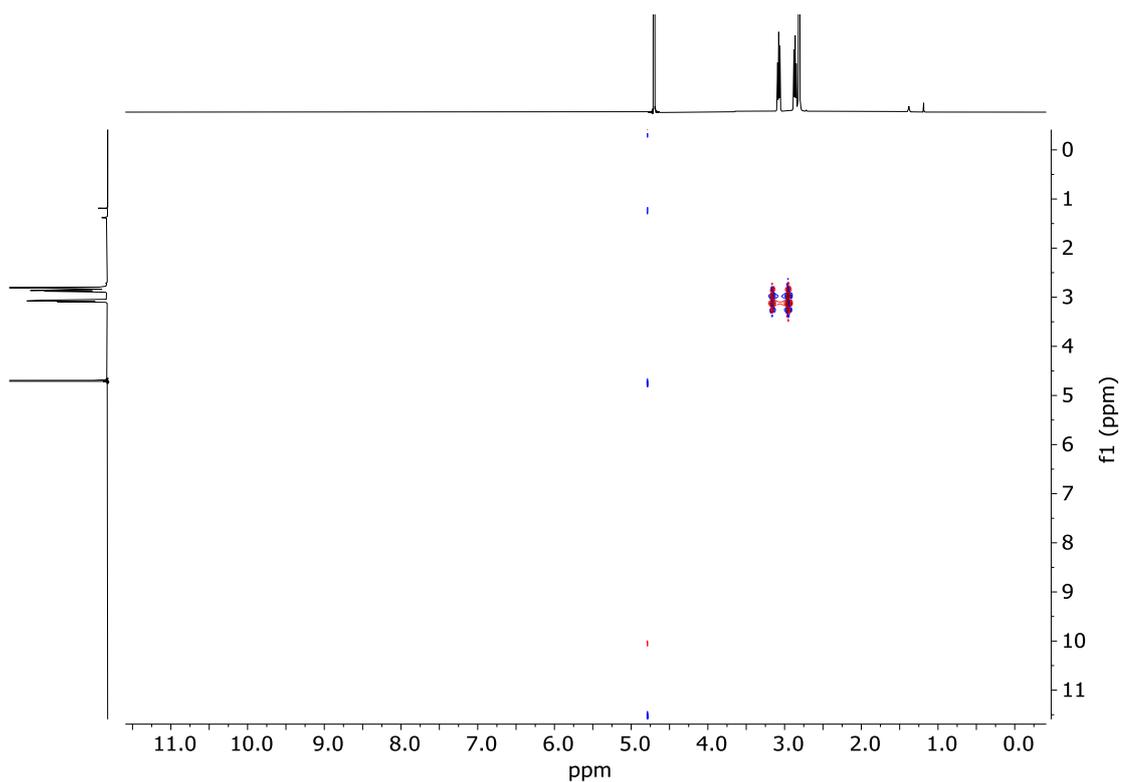


Figura A.5.7: spettro COSY (500 MHz, D₂O) del DO₄NH₂ a pH 7.

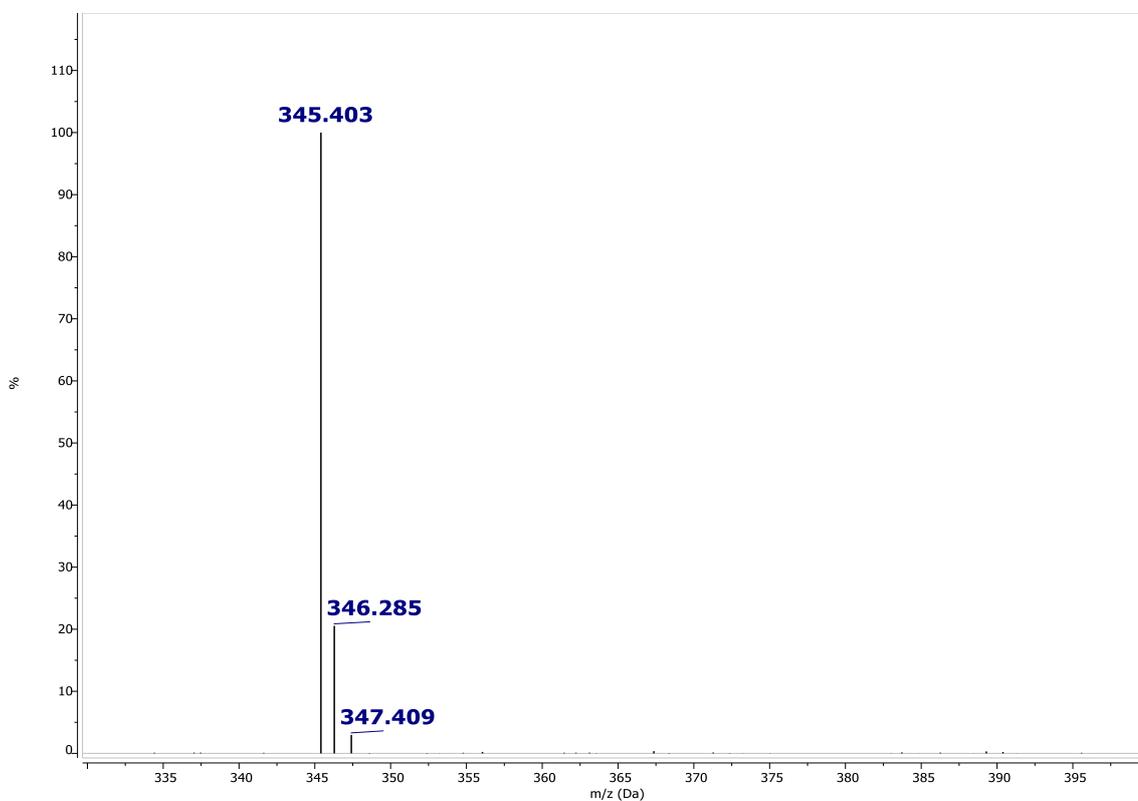


Figura A.5.8: spettro di massa DO₄NH₂. m/z calcolato: 344.54, trovato: 345.403.

A.6 Caratterizzazioni metil 6-(clorometil) picolinato (18)

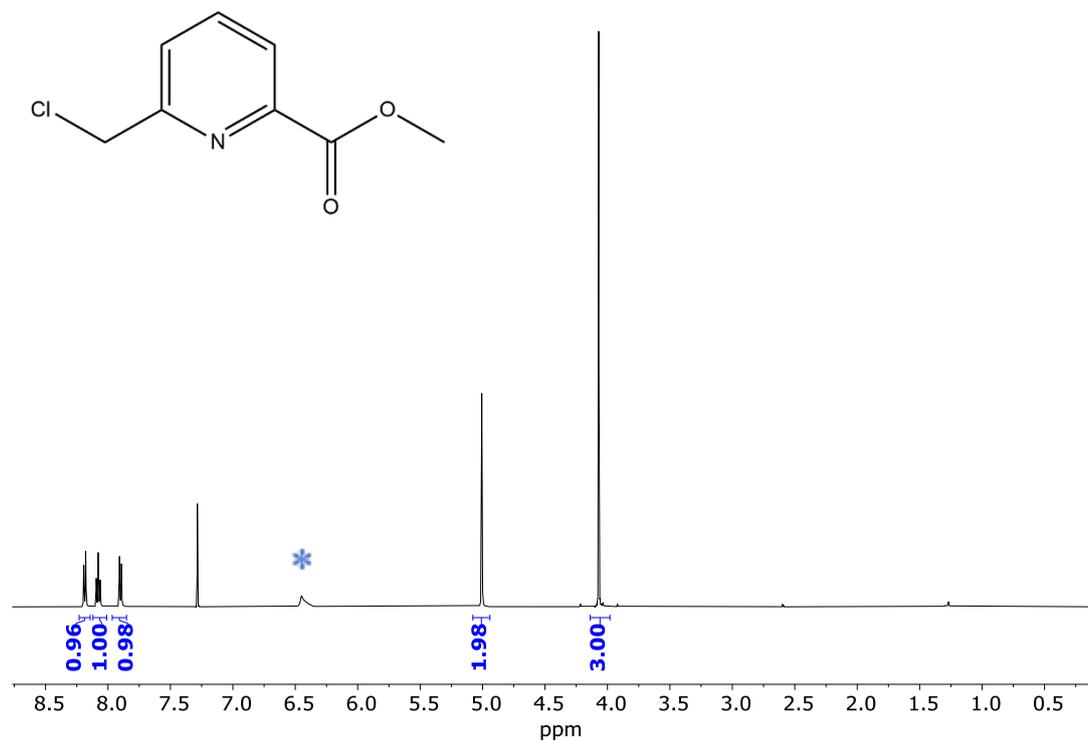


Figura A.6.1: spettro $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 18. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

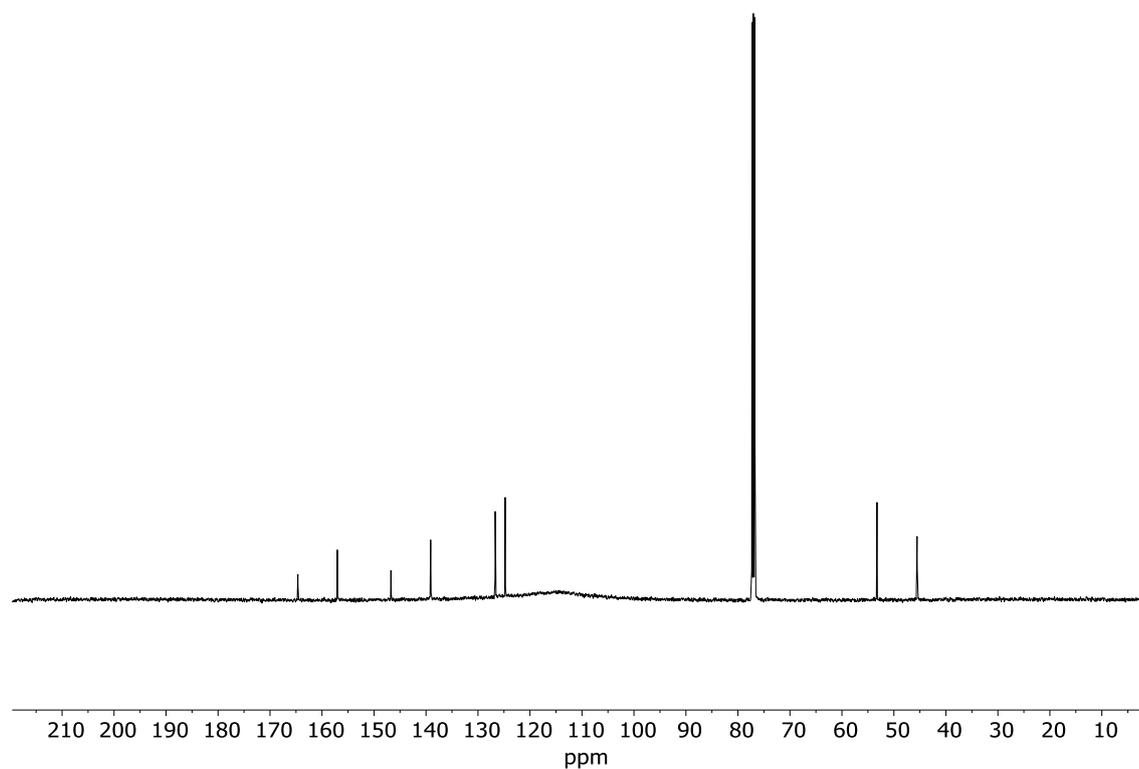


Figura A.6.2: spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 18.

A.7 Caratterizzazioni tetraetile (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo))bis(fosfonato) (19)

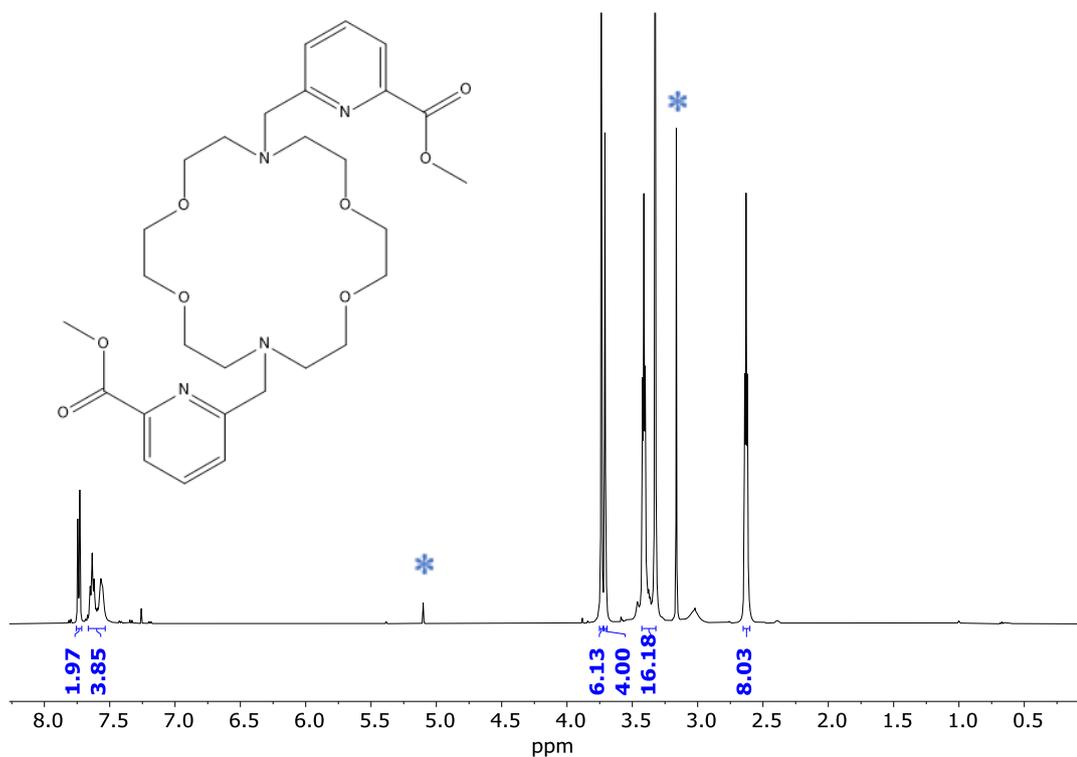


Figura A.7.1: spettro ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) del composto 19. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

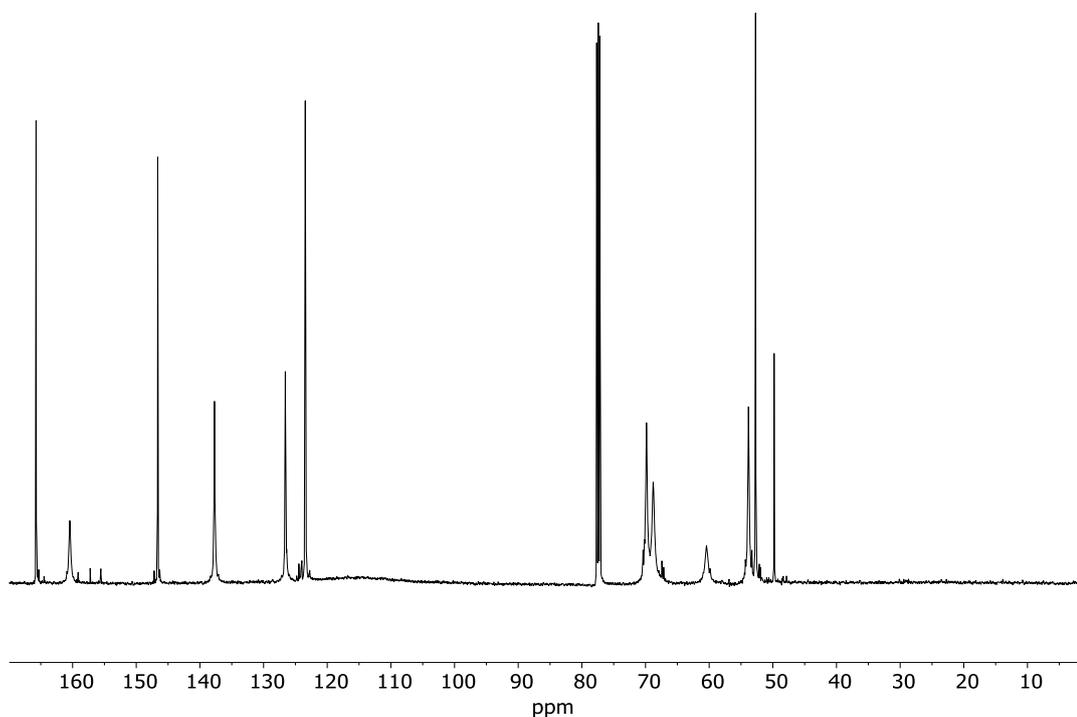


Figura A.7.1: spettro ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) del composto 19.

A.8 Caratterizzazioni acido 6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecan-7,16-diolo) bis(metilene))dipicolinico (macropa)

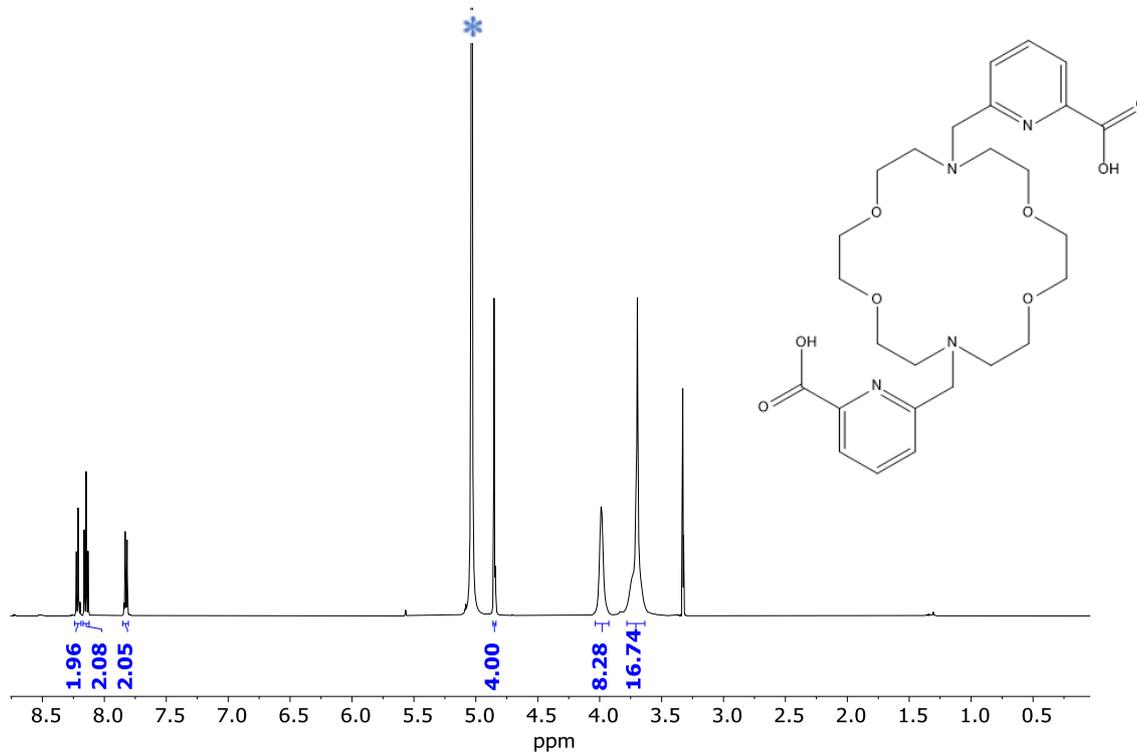


Figura A.8.1: spettro $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) del macropa.

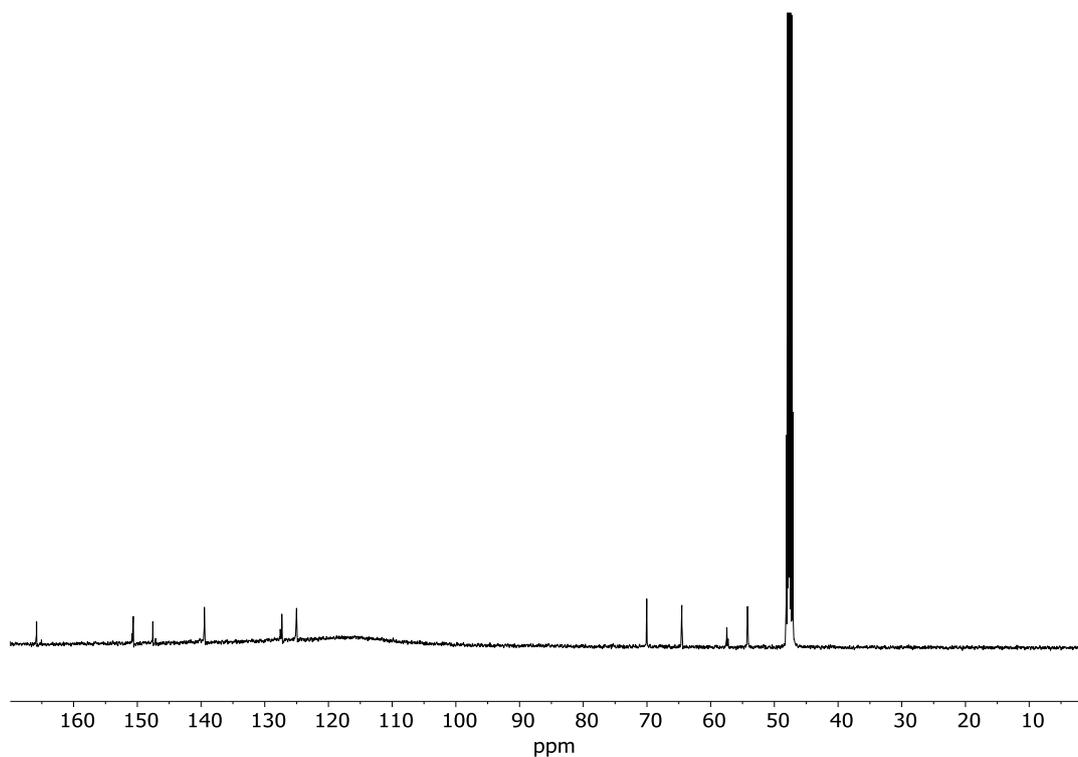


Figura A.8.2: spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD) del macropa.

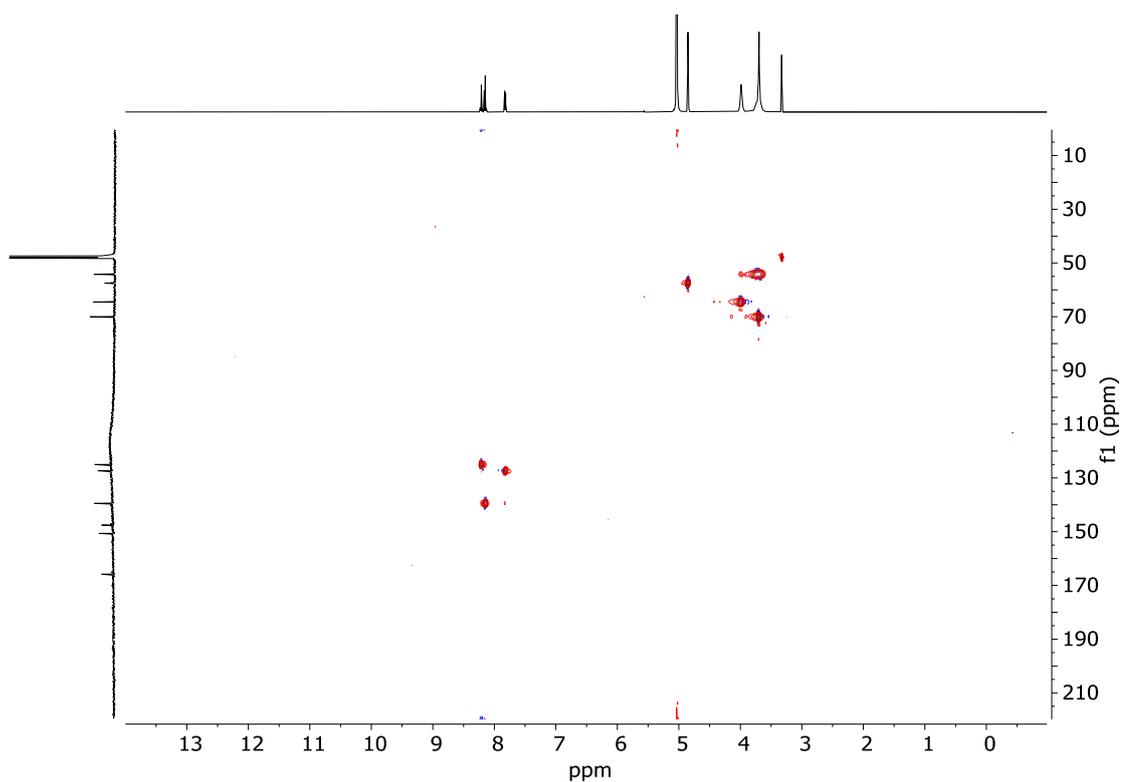


Figura A.8.3: spettro HSQC (500 MHz, MeOD) del macropa.

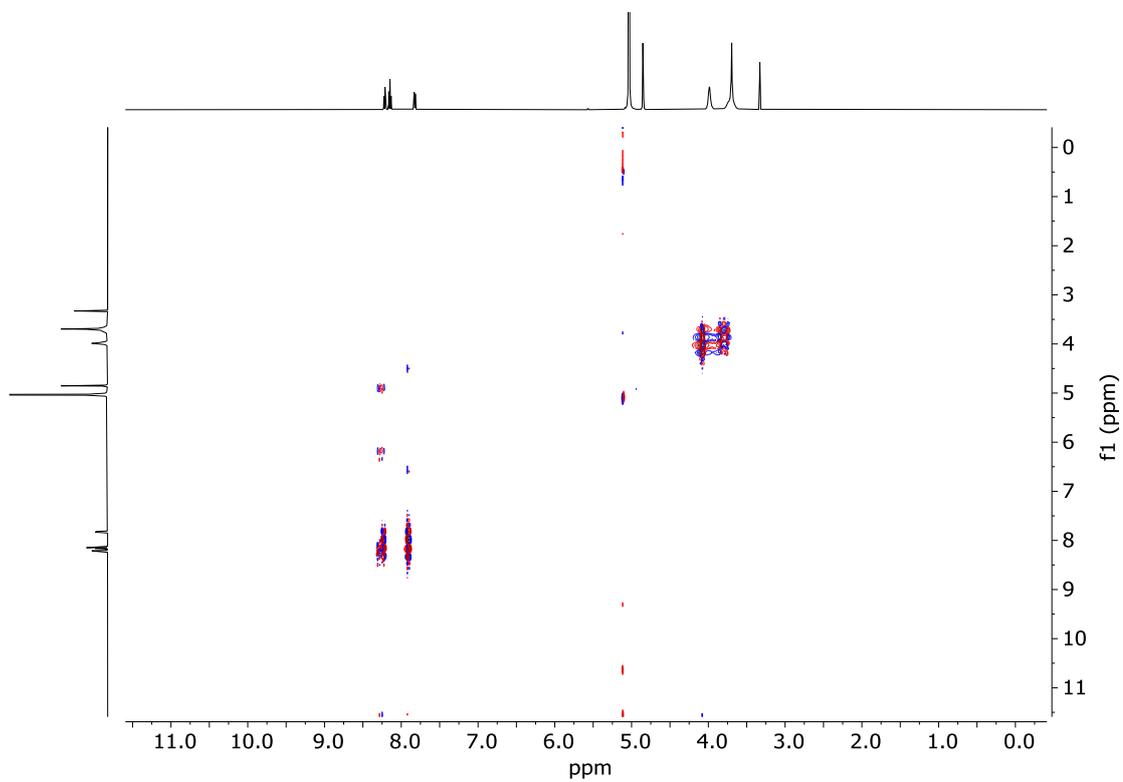


Figura A.8.3: spettro COSY (500 MHz, MeOD) del macropa.

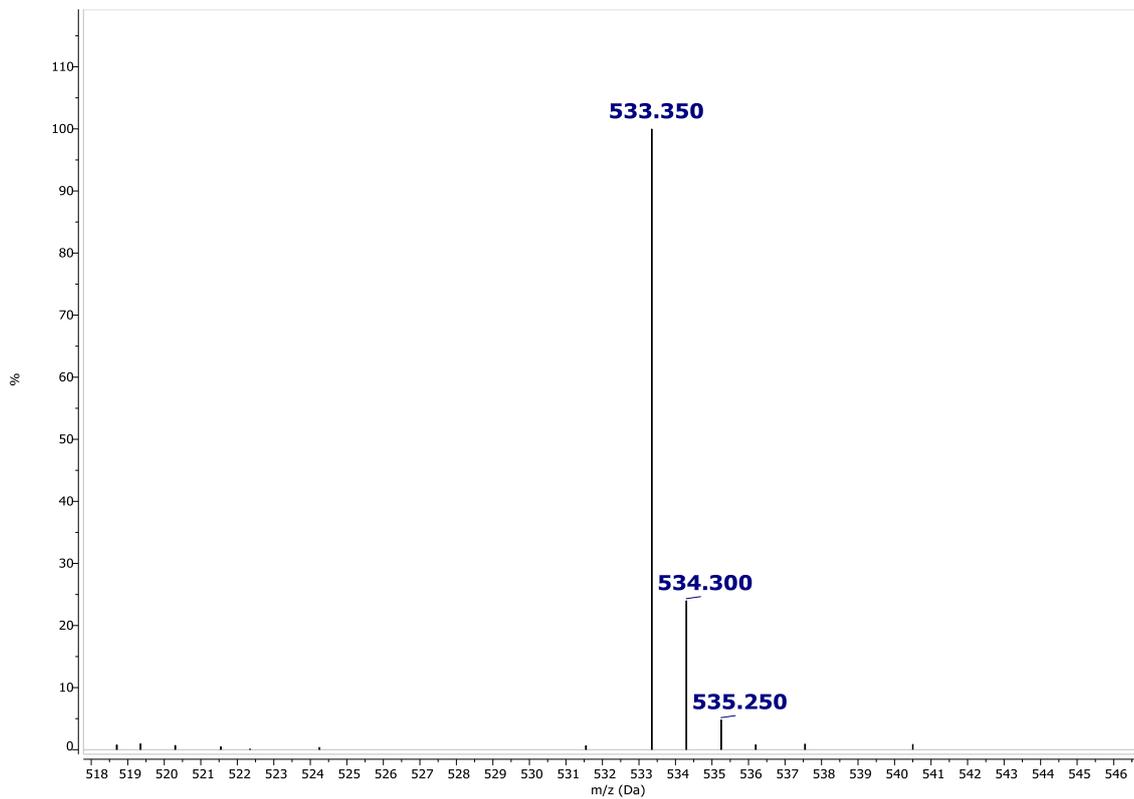


Figura A.8.4: spettro di massa del macropa. m/z calcolato: 532.59, trovato: 533.350.

A.9 Caratterizzazioni N-ossido di 2-(clorometil) piridina (20)

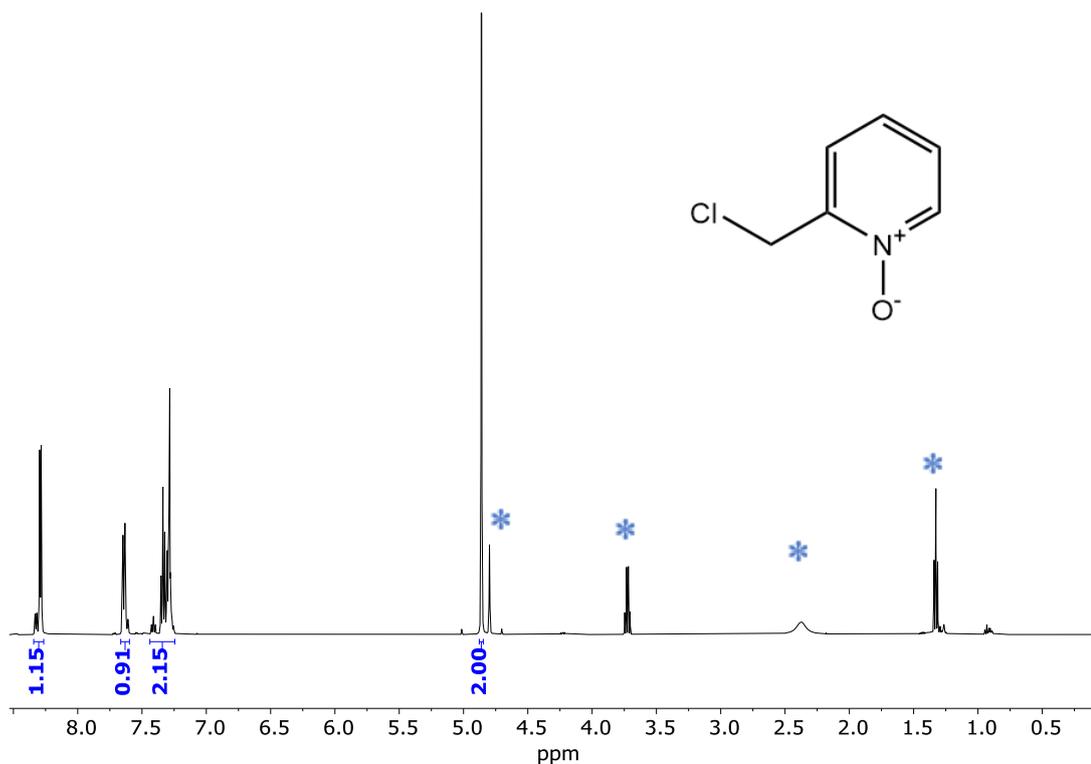


Figura A.9.1: spettro $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 20. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

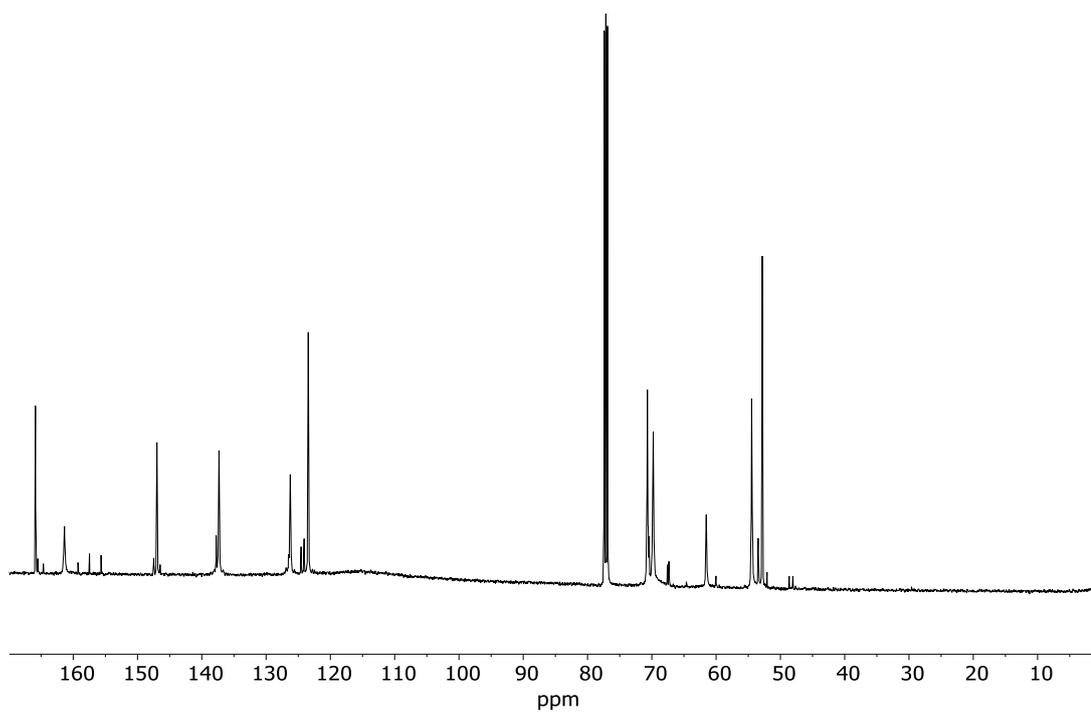


Figura A.9.2: spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) del composto 20.

A.10 Caratterizzazioni dietil 6-clorometilpiridina-2-fosfonato (21)

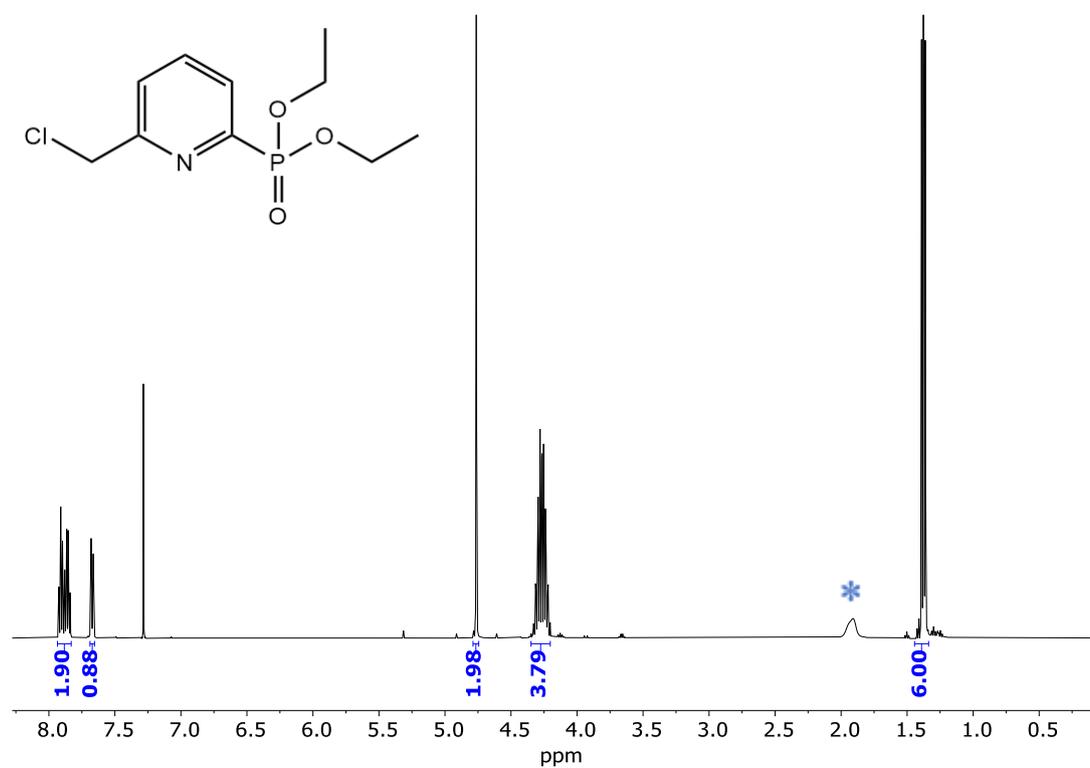


Figura A.10.1: spettro ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) del composto 21.

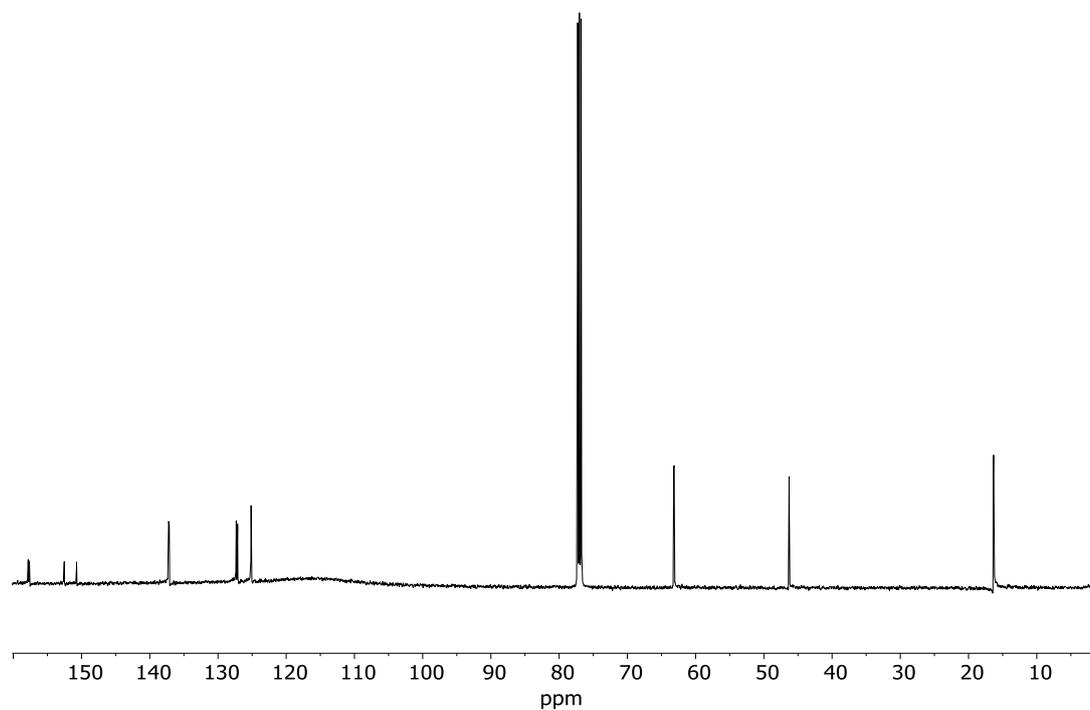


Figura A.10.2: spettro ¹³C-MNR (500 MHz, CDCl₃) del composto 21.

A.11 **Caratterizzazioni** **tetraetile** **(6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diolo)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diolo))bis(fosfonato)**
(22)

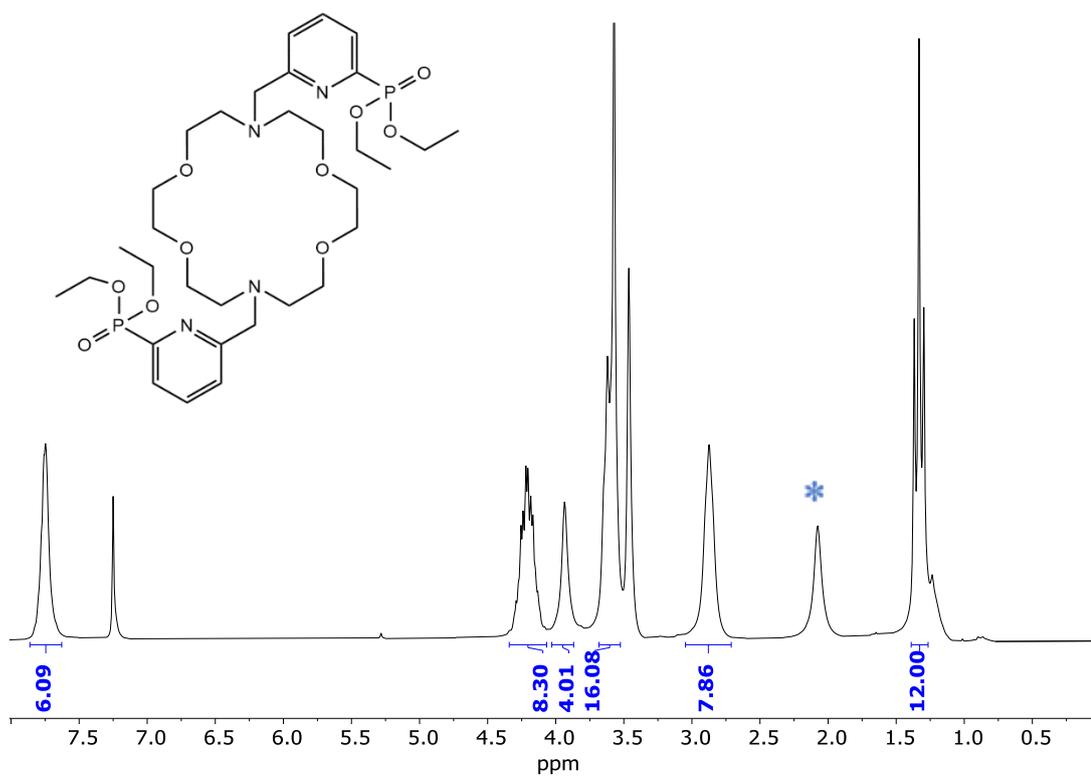


Figura A.11.1: spettro ¹H-MNR (500 MHz, CDCl₃) del composto 22.

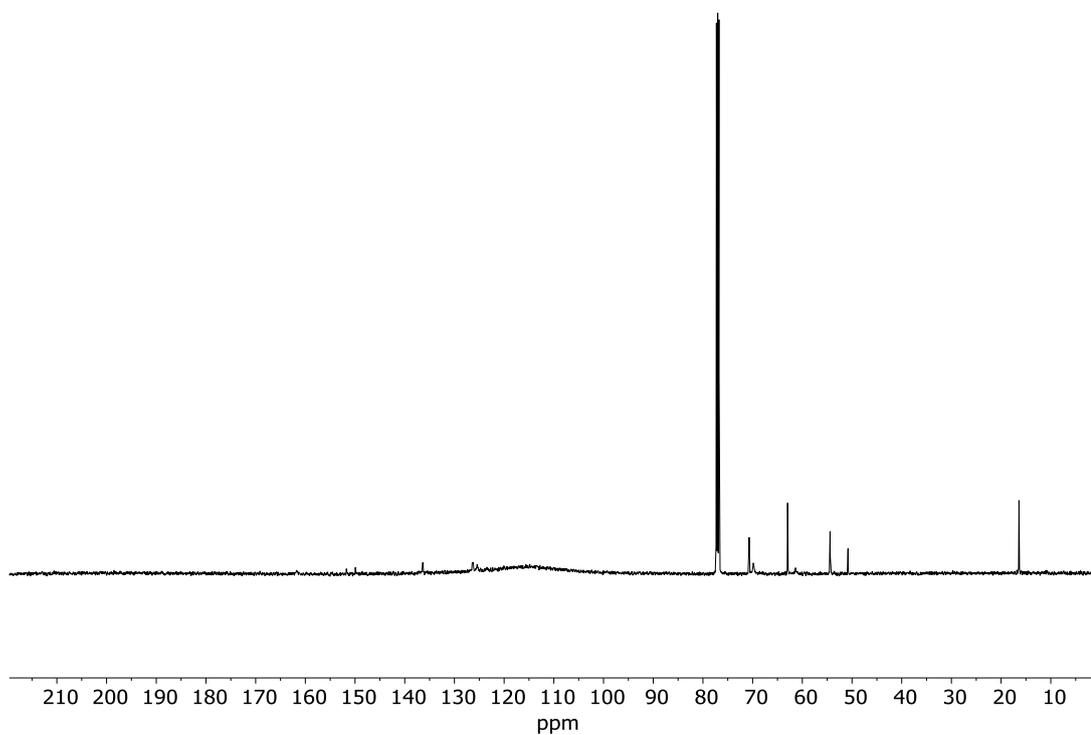


Figura A.11.2: spettro ¹³C-MNR (500 MHz, CDCl₃) del composto 22.

A.12 Caratterizzazioni acido (6,6'-((1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacicloctadecano-7,16-diol)bis(metilene))bis(piridina-6,2-diol))difosfonico (macrofosfo)

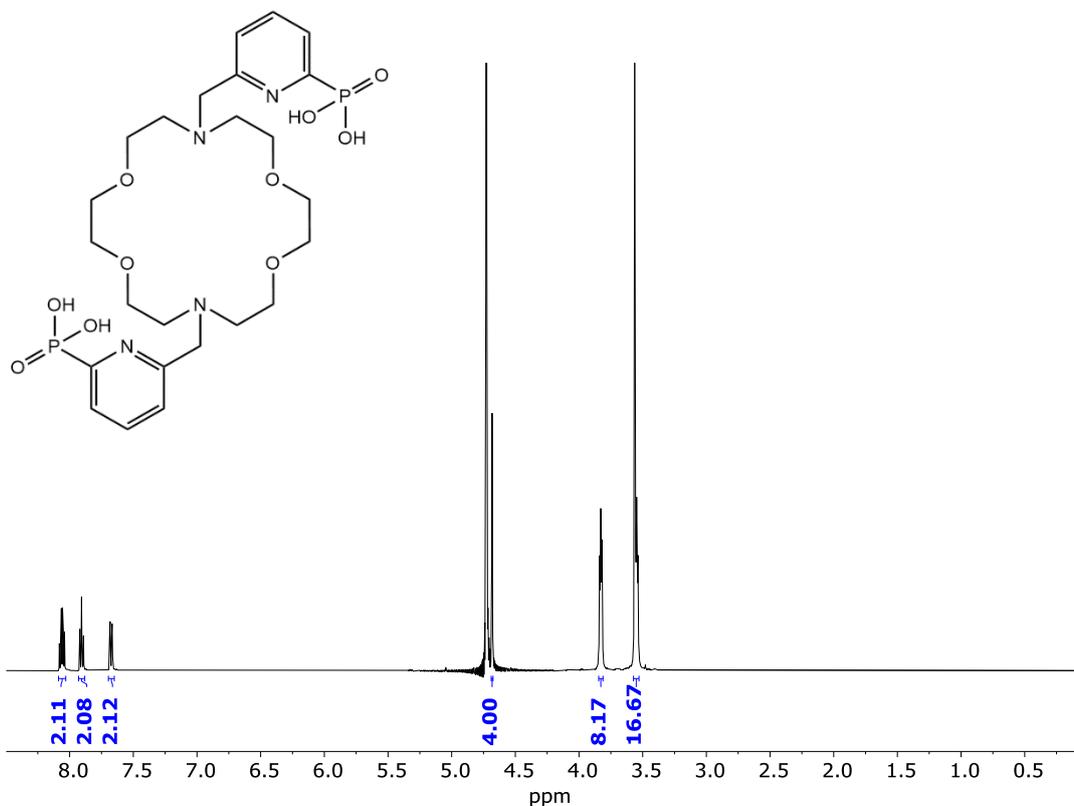


Figura A.12.1: spettro ¹H-MNR (500 MHz, D₂O) del macrofosfo a pH autogeno.

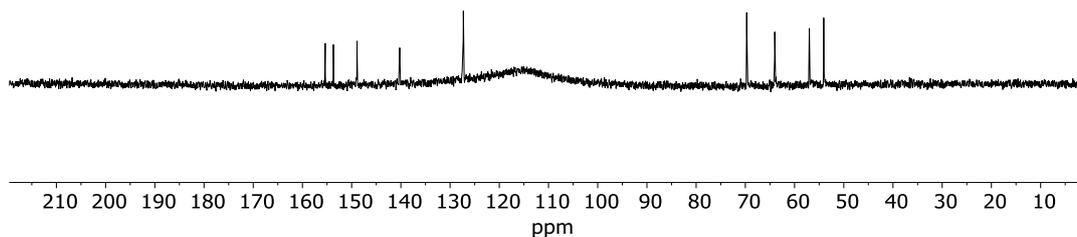


Figura A.12.2: spettro ¹³C-MNR (126 MHz, D₂O) del macrofosfo a pH autogeno.

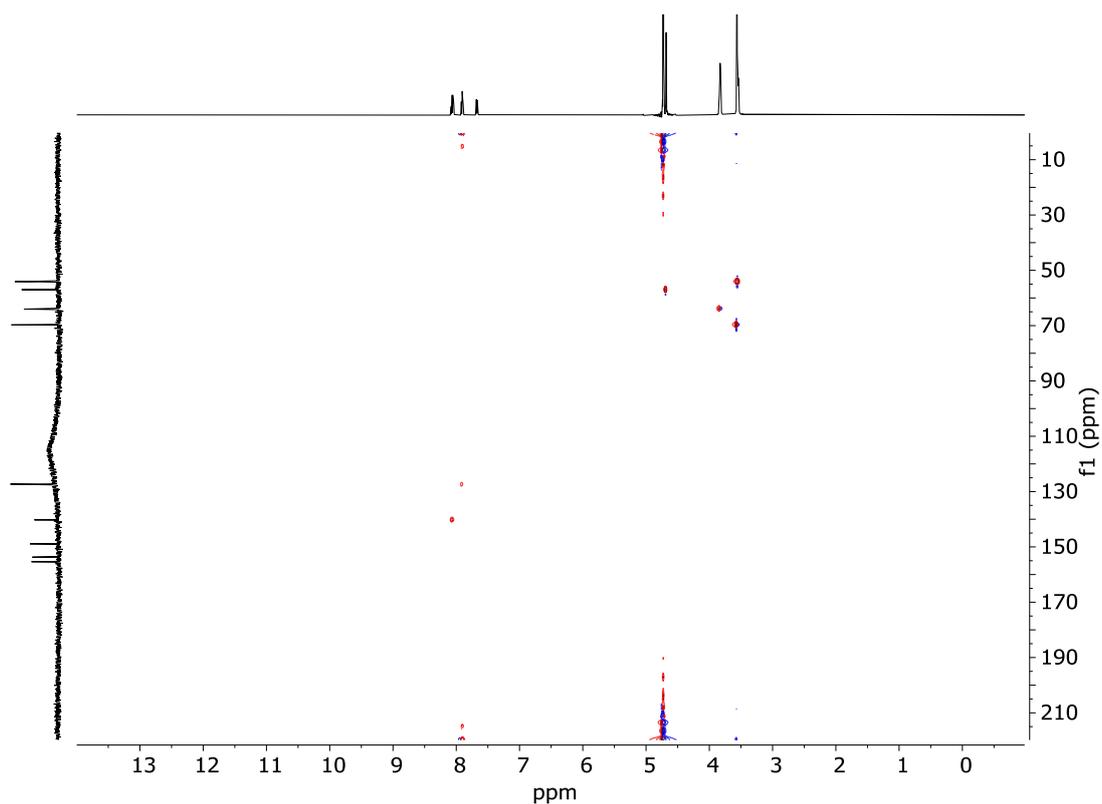


Figura A.12.3: spettro HSQC (500 MHz, D₂O) del macrophospho a pH autogeno.

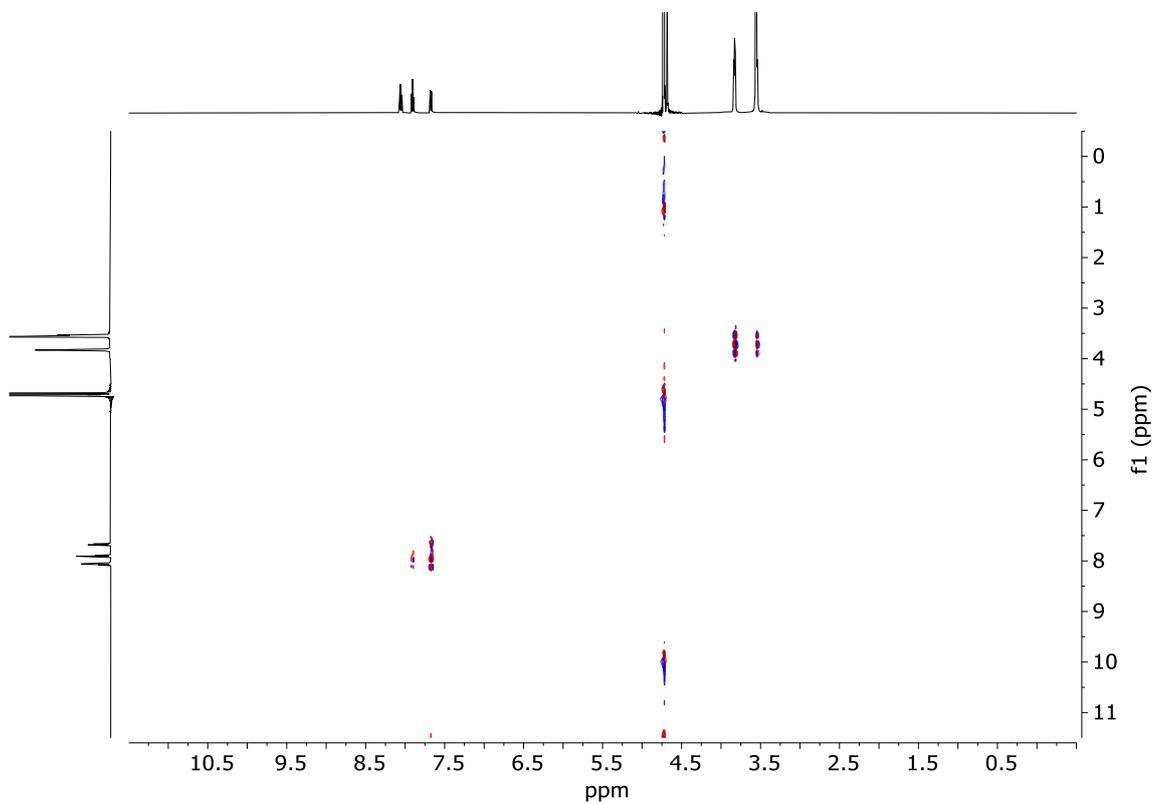


Figura A.12.4: spettro COSY (500 MHz, D₂O) del macrophospho a pH autogeno.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Boschi, Alessandra, and Petra Martini. "Metal-Based Radiopharmaceuticals in Inorganic Chemistry." *Molecules* 28.5 (2023): 2290.
- [2] Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999;99(9):2269-2292. doi:10.1021/cr9804386
- [3] Vermeulen, Koen, et al. "Design and challenges of radiopharmaceuticals." *Seminars in nuclear medicine*. Vol. 49. No. 5. WB Saunders, 2019.
- [4] Pryma, Daniel A., and Susan J. Mandel. "Radioiodine therapy for thyroid cancer in the era of risk stratification and alternative targeted therapies." *Journal of Nuclear Medicine* 55.9 (2014): 1485-1491.
- [5] Kostelnik, Thomas I, and Chris Orvig. "Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy." *Chemical reviews*. 119, no. 2 (2019): 902–956.
- [6] Boros, Eszter, et al. "Coordination chemistry and ligand design in the development of metal based radiopharmaceuticals." *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry* (2014): 47-7
- [7] van Grieken, R. and de Bruin, M.. "Nomenclature for radioanalytical chemistry (IUPAC Recommendations 1994)" *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, no. 12, 1994, pp. 2513-2526
- [8] De Bruin, M. "Glossary of terms used in nuclear analytical chemistry (Provisional)." *Pure and Applied Chemistry* 54.8 (1982): 1533-1554.

- [9] Boros, Eszter, and Alan B. Packard. "Radioactive transition metals for imaging and therapy." *Chemical reviews* 119.2 (2018): 870-901.
Poschl, Michael, and Leo ML Nollet, eds. *Radionuclide concentrations in food and the environment*. CRC Press, 2006
- [10] Bailey, D. L., et al. "Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students. Endorsed by: American Association of Physicists in Medicine (AAPM), Asia–Oceania Federation of Organizations for Medical Physics (AFOMP), Australasian College of Physical Scientists and Engineers in Medicine (ACPSEM), European Federation of Organisations for Medical Physics (EFOMP), Federation of African Medical Physics Organisations (FAMPO), World Federation of Nuclear Medicine and Biology (WFNMB)." (2014).
- [11] Qaim, Syed M. "Nuclear data relevant to the production and application of diagnostic radionuclide." *Radiochimica Acta* 89.4-5 (2001): 223-334
- [12] L'Annunziata, Michael F. *Radioactivity: introduction and history, from the quantum to quarks*. Elsevier, 2016.
- [13] Imam, Seyed K. "Molecular nuclear imaging: the radiopharmaceuticals." *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 20.2 (2005): 163-172.
- [14] Salvadori, Piero A., Elena Filidei, and Assuero Giorgetti. "Positron-Emitting Radiopharmaceuticals." *Nuclear Medicine Textbook: Methodology and Clinical Applications* (2019): 57-98.
- [15] Alauddin, Mian M. "Positron emission tomography (PET) imaging with ¹⁸F-based radiotracers." *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2.1 (2012): 55.

- [16] Wells, R. Glenn. "Instrumentation in molecular imaging." *Journal of Nuclear Cardiology* 23 (2016): 1343-1347.
- [17] Nonnekens, Julie, et al. "²¹³Bi-labeled prostate-specific membrane antigen-targeting agents induce DNA double-strand breaks in prostate cancer xenografts." *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 32.2 (2017): 67-73.
- [18] Saha, Gopal B., and Gopal B. Saha. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. Vol. 6. New York: Springer, 2004.
- [19] Ramogida, Caterina F., and Chris Orvig. "Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy." *Chemical Communications* 49.42 (2013): 4720-4739.
- [20] Romer, A., et al. "Somatostatin-based radiopeptide therapy with [¹⁷⁷Lu-DOTA]-TOC versus [⁹⁰Y-DOTA]-TOC in neuroendocrine tumours." *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 41 (2014): 214-222.
- [21] Speer, Tod W. *Targeted radionuclide therapy*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [22] Srivastava, Suresh C. "Paving the way to personalized medicine: production of some promising theragnostic radionuclides at Brookhaven National Laboratory." *Seminars in nuclear medicine*. Vol. 42. No. 3. WB Saunders, 2012.
- [23] Koziorowski, Jacek, and James Ballinger. "Theragnostic radionuclides: A clinical perspective." *QJ Nucl. Med. Mol. Imaging* 65 (2021): 306-314
- [24] Seidl, Christof. "Radioimmunotherapy with α -particle-emitting radionuclides." *Immunotherapy* 6.4 (2014): 431-458.
- [25] Price, Eric W., and Chris Orvig. "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals." *Chemical Society Reviews* 43.1 (2014): 260-290.

- [26] Heppeler, A., et al. "Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with superb tumour-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy." *Chemistry—A European Journal* 5.7 (1999): 1974-1981.
- [27] Wadas, Thaddeus J., et al. "Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease." *Chemical reviews* 110.5 (2010): 2858-2902.
- [28] Weller, M., Overton, T., Rourke, J., Armstrong, F.: *Inorganic Chemistry*, 7th Ed., Oxford University Press, Oxford, UK (2018), p. 237.
- [29] McMurry, John, and Robert C. Fay. "General chemistry: Atoms first." (No Title) (2010).
- [30] Pearson, Ralph G. "Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles." *Journal of Chemical Education* 45.9 (1968): 581.
- [31] Pearson, Ralph G. "Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories." *Journal of Chemical Education* 45.10 (1968): 643.
- [32] Okoye, Nkemakonam C., et al. "Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications." *Radiochimica Acta* 107.9-11 (2019): 1087-1120
- [33] Maecke, H. R., Riesen, A., Ritter, W.: The molecular structure of indium-DTPA. *J. Nucl. Med.* **30**, 1235 (1989).
- [34] Olsen, John O., et al. "Somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors with indium-111 pentetretotide (Octreoscan)." *Seminars in nuclear medicine*. Vol. 25. No. 3. WB Saunders, 1995.

- [35] Han, Misop, and Alan W. Partin. "Current clinical applications of the ¹¹¹In-capromab pendetide scan (ProstaScint® Scan, Cyt-356)." *Reviews in urology* 3.4 (2001): 165.
- [36] Lattuada, Luciano, et al. "The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents." *Chemical Society Reviews* 40.5 (2011): 3019-3049.
- [37] Carrasquillo, Jorge A., et al. "Similarities and differences in ¹¹¹In-and ⁹⁰Y-labeled 1B4M-DTPA antiTac monoclonal antibody distribution." *Journal of Nuclear Medicine* 40.2 (1999): 268-276.
- [38] Carrasquillo, Jorge A., et al. "Similarities and differences in ¹¹¹In-and ⁹⁰Y-labeled 1B4M-DTPA antiTac monoclonal antibody distribution." *Journal of Nuclear Medicine* 40.2 (1999): 268-276.
- [39] Camera, Luigi, et al. "Comparative biodistribution of indium-and yttrium-labeled B3 monoclonal antibody conjugated to either 2-(p-SCN-Bz)-6-methyl-DTPA (1 B4M-DTPA) or 2-(p-SCN-Bz)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (2B-DOTA)." *European journal of nuclear medicine* 21 (1994): 640-646.
- [40] Wiseman, Gregory A., et al. "Phase I/II ⁹⁰Y-Zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy dosimetry results in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma." *European journal of nuclear medicine* 27 (2000): 766-777.
- [41] Wiseman, Gregory A., et al. "Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin™ radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma." *Critical reviews in oncology/hematology* 39.1-2 (2001): 181-194.

- [42] Camera, Luigi, et al. "Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies." *Journal of nuclear medicine* 35.5 (1994): 882-889.
- [43] Brechbiel, Martin W., and Otto A. Gansow. "Synthesis of C-functionalized trans-cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acids for labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 α -particle emitter." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 9 (1992): 1173-1178.
- [44] Van de Watering, Floor CJ, et al. "Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients." *BioMed research international* 2014 (2014).
- [45] Deri, Melissa A., et al. "PET imaging with ^{89}Zr : from radiochemistry to the clinic." *Nuclear medicine and biology* 40.1 (2013): 3-14.
- [46] Eisenwiener, Klaus-Peter, Pia Powell, and Helmut R. Mäcke. "A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 10.18 (2000): 2133-2135.
- [47] Chappell, Lara L., et al. "Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes ^{203}Pb and ^{212}Pb ." *Nuclear medicine and biology* 27.1 (2000): 93-100.
- [48] Dutta, Jyotibon, et al. "A Facile synthesis of NODASA-functionalized peptide." *Synlett* (2016): 1685-1688.
- [49] Eisenwiener, Klaus-Peter, et al. "NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with $^{67/68}\text{Ga}$ and ^{111}In for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors." *Bioconjugate chemistry* 13.3 (2002): 530-541.

- [50] Rylova, Svetlana N., et al. "The somatostatin receptor 2 antagonist ^{64}Cu -NODAGA-JR11 outperforms ^{64}Cu -DOTA-TATE in a mouse xenograft model." *PLoS One* 13.4 (2018): e0195802.
- [51] Ghosh, Sukhen C., et al. "Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for ^{64}Cu -labeled immunoconjugates." *Nuclear medicine and biology* 42.2 (2015): 177-183.
- [52] Chong, Hyun-Soon, et al. "Efficient synthesis and evaluation of bimodal ligand NETA." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18.11 (2008): 3436-3439.
- [53] Chong, Hyun-soon, et al. "Synthesis and biological evaluation of novel macrocyclic ligands with pendent donor groups as potential yttrium chelators for radioimmunotherapy with improved complex formation kinetics." *Journal of medicinal chemistry* 45.16 (2002): 3458-3464.
- [54] Kang, Chi Soo, et al. "Synthesis and preclinical evaluation of bifunctional ligands for improved chelation chemistry of ^{90}Y and ^{177}Lu for targeted radioimmunotherapy." *Bioconjugate chemistry* 23.9 (2012): 1775-1782.
- [55] Kang, Chi Soo, et al. "Synthesis and evaluation of a new bifunctional NETA chelate for molecular targeted radiotherapy using ^{90}Y or ^{177}Lu ." *Nuclear medicine and biology* 42.3 (2015): 242-249.
- [56] Kang, Chi Soo, et al. "Preclinical evaluation of NETA-based bifunctional ligand for radioimmunotherapy applications using ^{212}Bi and ^{213}Bi : radiolabeling, serum stability, and biodistribution and tumor uptake studies." *Nuclear medicine and biology* 40.5 (2013): 600-605.

- [57] Woodin, Katrina S., et al. "Kinetic inertness and electrochemical behavior of copper (II) tetraazamacrocyclic complexes: Possible implications for in vivo stability." (2005): 4829-4833.
- [58] Boswell, C. Andrew, et al. "Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes." *Journal of medicinal chemistry* 47.6 (2004): 1465-1474.
- [59] Bass, Laura A., et al. "In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver." *Bioconjugate chemistry* 11.4 (2000): 527-532.
- [60] Ramogida, Caterina F., et al. "H₂ CHX dedpa and H₄ CHX octapa □ Chiral Acyclic Chelating Ligands for ^{67/68}Ga and ¹¹¹In Radiopharmaceuticals." *Inorganic Chemistry* 54.4 (2015): 2017-2031.
- [61] Price, Eric W., et al. "H₄octapa: an acyclic chelator for ¹¹¹In radiopharmaceuticals." *Journal of the American Chemical Society* 134.20 (2012): 8670-8683.
- [62] Price, Eric W., et al. "H₄octapa-trastuzumab: versatile acyclic chelate system for ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu imaging and therapy." *Journal of the American Chemical Society* 135.34 (2013): 12707-12721.
- [63] Notni, Johannes, and Hans-Jürgen Wester. "A practical guide on the synthesis of metal chelates for molecular imaging and therapy by means of click chemistry." *Chemistry—A European Journal* 22.33 (2016): 11500-11508.
- [64] Altai, Mohamed, et al. "Pretargeted imaging and therapy." *Journal of Nuclear Medicine* 58.10 (2017): 1553-1559.
- [65] Beck-Sickinger, Annette G., and Irfan U. Khan. "Targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones as radiopharmaceuticals." *Anti-Cancer Agents in*

Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents) 8.2 (2008): 186-199.

- [66] Weinberg, R. A., and Douglas Hanahan. "The hallmarks of cancer." *Cell* 100.1 (2000): 57-70.
- [67] Ciavarella, Sabino, et al. "Targeted therapies in cancer." *BioDrugs* 24 (2010): 77-88.
- [68] Hennrich, Ute, and Martina Benešová. "[⁶⁸Ga] Ga-DOTA-TOC: the first FDA-approved ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical for PET imaging." *Pharmaceuticals* 13.3 (2020): 38.
- [69] Correia, Joao DG, et al. "Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy." *Dalton Transactions* 40.23 (2011): 6144-6167.
- [70] Ruzza, Paolo, and Andrea Calderan. "Radiolabeled peptide-receptor ligands in tumor imaging." *Expert Opinion on Medical Diagnostics* 5.5 (2011): 411-424.
- [71] De Graaf, Albert J., et al. "Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation." *Bioconjugate chemistry* 20.7 (2009): 1281-1295.
- [72] Ting, Gann, Chih-Hsien Chang, and Hsin-Ell Wang. "Cancer nanotargeted radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy." *Anticancer research* 29.10 (2009): 4107-4118.
- [73] Hamoudeh, Misara, et al. "Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer." *Advanced drug delivery reviews* 60.12 (2008): 1329-1346.

- [74] Younes, C., Raphaël Boisgard, and Bertrand Tavitian. "Labelled oligonucleotides as radiopharmaceuticals: pitfalls, problems and perspectives." *Current pharmaceutical design* 8.16 (2002): 1451-1466.
- [75] Olafsen, Tove, and Anna M. Wu. "Antibody vectors for imaging." *Seminars in nuclear medicine*. Vol. 40. No. 3. WB Saunders, 2010.
- [76] Knowles, Scott M., and Anna M. Wu. "Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology." *Journal of Clinical Oncology* 30.31 (2012): 3884.
- [77] Knowles, Scott M., and Anna M. Wu. "Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology." *Journal of Clinical Oncology* 30.31 (2012): 3884.
- [78] Welch, Michael J., Craig J. Hawker, and Karen L. Wooley. "The advantages of nanoparticles for PET." *Journal of Nuclear medicine* 50.11 (2009): 1743-1746.
- [79] Blower, Philip J., Jason S. Lewis, and Jamal Zweit. "Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine." *Nuclear medicine and biology* 23.8 (1996): 957-980.
- [80] Florimonte, Luigia, Luca Dellavedova, and Lorenzo Stefano Maffioli. "Radium-223 dichloride in clinical practice: a review." *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 43 (2016): 1896-1909.
- [81] Deshayes, Emmanuel, et al. "Radium 223 dichloride for prostate cancer treatment." *Drug design, development and therapy* (2017): 2643-2651.
- [82] Henriksen, Gjermund, et al. "Significant antitumor effect from bone-seeking, α -particle-emitting ^{223}Ra demonstrated in an experimental skeletal metastases model." *Cancer research* 62.11 (2002): 3120-3125.

- [83] Henriksen, Gjermund, et al. "223Ra for endoradiotherapeutic applications prepared from an immobilized 227Ac/227Th source." *Radiochimica Acta* 89.10 (2001): 661-666.
- [84] Henriksen, Gjermund, et al. "Targeting of osseous sites with α -emitting 223Ra: comparison with the β -emitter 89Sr in mice." *Journal of Nuclear Medicine* 44.2 (2003): 252-259.
- [85] Bruland, Øyvind S., et al. "High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the α -emitter 223Ra: adjuvant or alternative to conventional modalities." *Clinical cancer research* 12.20 (2006): 6250s-6257s.
- [86] Cessna, J. T., and B. E. Zimmerman. "Standardization of radium-223 by liquid scintillation counting." *Applied Radiation and Isotopes* 68.7-8 (2010): 1523-1528.
- [87] Lassmann, Michael, and Dietmar Nosske. "Dosimetry of 223 Ra-chloride: dose to normal organs and tissues." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 40 (2013): 207-212.
- [88] Nilsson, Sten, et al. "First clinical experience with α -emitting radium-223 in the treatment of skeletal metastases." *Clinical cancer research* 11.12 (2005): 4451-4459.
- [89] Donnelly, Paul S. "The role of coordination chemistry in the development of copper and rhenium radiopharmaceuticals." *Dalton Transactions* 40.5 (2011): 999-1010.
- [90] Blower, Philip J., Jason S. Lewis, and Jamal Zweit. "Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine." *Nuclear medicine and biology* 23.8 (1996): 957-980.

- [91] Anderson, Carolyn J., et al. "Radiotherapy, toxicity and dosimetry of copper-64-TETA-octreotide in tumor-bearing rats." *Journal of Nuclear Medicine* 39.11 (1998): 1944-1951.
- [92] Heroux, Katie J., et al. "The long and short of it: the influence of N-carboxyethyl versus N-carboxymethyl pendant arms on in vitro and in vivo behavior of copper complexes of cross-bridged tetraamine macrocycles." *Dalton Transactions* 21 (2007): 2150-2162.
- [93] Henriksen, Gjermund, Per Hoff, and Roy H. Larsen. "Evaluation of potential chelating agents for radium." *Applied radiation and isotopes* 56.5 (2002): 667-671.
- [94] Parker, Christopher, et al. "Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 369.3 (2013): 213-223.
- [95] Ychou, M., et al. "A phase III randomised trial of LV5FU2+ irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802)." *Annals of oncology* 20.4 (2009): 674-680.
- [96] Sara Franchi, *tesi di dottorato, Università di Padova, in corso di svolgimento.*
- [97] Abou DS, Thiele NA, Gutsche NT, Villmer A, Zhang HW, Woods JJ, Baidoo KE, Escorcía FE, Wilson JJ, Thorek DLJ, Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand. *Chem. Sci.* 2021, 12, 3733-3742.
- [98] Mato-Iglesias, Marta, et al. "Lanthanide complexes based on a 1, 7-diaza-12-crown-4 platform containing picolinate pendants: a new structural entry for the design of magnetic resonance imaging contrast agents." *Inorganic chemistry* 47.17 (2008): 7840-7851.
- [99] Chrystal, Ewan JT, Lynda Couper, and David J. Robins. "Synthesis of a key intermediate in the diaminopimelate pathway to L-lysine: 2, 3, 4, 5-tetrahydrodipicolinic acid." *Tetrahedron* 51.37 (1995): 10241-10252.

- [100] Dian Francesco, *sintesi di un nuovo chelante azamacrociclico con relativa caratterizzazione in vitro per la determinazione delle pka*, Università di Padova, 2021/2022.
- [101] Salaam, Jérémy, et al. "Formation of mono-and polynuclear luminescent lanthanide complexes based on the coordination of preorganized phosphonated pyridines." *Inorganic Chemistry* 57.10 (2018): 6095-6106.