

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO  
**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**  
TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SINTESI DI NUOVI CHELANTI AZAMACROCICLICI RIGIDIFICATI IMPIEGABILI NELLA  
TERAPIA MIRATA CON ARGENTO-111**

**RELATORE:** CH.MO PROF. VALERIO DI MARCO

**CORRELATORE:** CH.MO PROF. FABRIZIO MANCIN

**CONTRORELATORE:** CH.MA PROF.SSA CRISTINA MARZANO

**LAUREANDA:** SILVIA POZZO

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 RADIOFARMACI	1
1.2 RADIONUCLIDE	3
1.2.1 Radionuclidi diagnostici	4
1.2.2 Radionuclidi terapeutici	6
1.2.3 Radionuclidi teranostici	8
1.2.4 Emivita	9
1.2.5 Produzione	10
1.3 MOLECOLA DIREZIONANTE	12
1.4 LINKER	14
1.5 CHELANTE BIFUNZIONALE	15
1.5.1 Chelanti Aciclici	15
1.5.2 Chelanti Ciclici	17
1.6 ARGENTO-111 ( <sup>111</sup> Ag)	19
1.6.1 Chelanti bifunzionali per Argento-111	20
<b>2. SCOPO</b>	<b>21</b>
<b>3. TENTATIVI SINTETICI DEI CHELANTI AZAMACROCICLICI</b>	<b>23</b>
3.1 SINTESI DALLA LETTERATURA	23
3.2 ALCHILAZIONE DIRETTA DAL COMPOSTO 2	26
3.2.1 Alchilazione diretta dal composto 2 con 2-cloro-metiletilsulfuro	26
3.2.2 Alchilazione diretta dal composto 2 con 1,2-dibromoetano	28
3.2.3 Alchilazione diretta dal composto 2 con etil-2-iodoacetato	30
3.3 SOSTITUZIONE DIRETTA	31
3.3.1 Formazione di un complesso con il silicio	31
3.3.2 Formazione di un ponte meno rigido	33
3.4 UTILIZZO DI ALTRI GRUPPI PROTETTORI	36
3.4.1 Utilizzo del benzilcloroformiato come gruppo protettore	37
3.4.2 Utilizzo dello Fmoc come gruppo protettore	37
3.4.3 Utilizzo del Boc come gruppo protettore	38
3.5 VIA SINTETICA PARTENDO DA TACN E ACIDO IMMINODIACETICO	39
3.6 SINTESI DEL 4,11-BIS(2-(METILTIO)ETIL)-1,4,8,11-TETRAAZOBICICLO[6.6.2]ESADECANO	41

<b>4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE</b>	43
<b>5. PARTE SPERIMENTALE</b>	45
5.1 MATERIALI	45
5.2 STRUMENTAZIONE	45
5.3 PROCEDURE SINTETICHE	46
5.3.1 Sintesi di decaidro-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilene (2a)	46
5.3.2 Sintesi di dodecaidro-3a,5a,8a,10a-tetraazapirene (2b)	47
5.3.3 Sintesi benzil ioduro	48
5.3.4 Sintesi 2a,6a-dibenzildodecaidro-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilene -2a,6a-diio (3a)	49
5.3.5 Sintesi (10br,10cr)-Dodecaidro-3a,8a-bis(fenilmetil)-3a,5a,8a,10a-tetraazapirenio diioduro monoidrato (3a,H <sub>2</sub> O) (3b)	50
5.3.6 Sintesi 4,10-dibenzil-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano (4a)	51
5.3.7 Sintesi di 4,11-dibenzil-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (4b)	52
5.3.8 Sintesi di 8a-(2-(metiltio)etil)decaidro-1H-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilene-8°-io	53
5.3.9 Sintesi di 1,4,8,11-tetraazatriciclo[9.3.1.14,8]esadecano (10)	54
5.3.10 Sintesi di 1,8-bis-(benzil)-4,11-diazoniatriciclo[9.3.1.14,8]esadecano dibromuro (11)	55
5.3.11 Sintesi di 1,8-bis-(benzil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (12)	56
5.3.12 Sintesi di 1,8-dibenzil-4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (13)	57
5.3.13 Sintesi di dibenzil 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14a)	58
5.3.14 Sintesi dibis((9H-fluorene-9-il)metil) 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14b)	59
5.3.15 Sintesi di di-tert-butile 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14c)	60

5.3.16	Sintesi di dibenzil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15a)	61
5.3.17	Sintesi di di-tert-butil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15c)	62
5.3.18	Sintesi di 1,7-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (16)	63
5.3.19	Sintesi di dietil 2,2'-azandiildiacetato (17)	64
5.3.20	Sintesi di dietil 2,2'-((2-(metiltio)etil)azandiil)diacetato (18)	65
5.3.21	Sintesi di acido 2,2'-((2-(metiltio)etil)azandiil)diacetico (19)	66
5.3.22	Sintesi di di-tert-butil 1,4,7-triazonane-1,4-dicarbossilato (21)	67
5.3.23	Sintesi di di-tert-butil 7-(2-(metiltio)etil)-1,4,7-triazonane-1,4-dicarbossilato (22)	68
5.3.24	Sintesi di 1-(2-(metiltio)etil)-1,4,7-triazonano (23)	69
5.3.25	Sintesi di 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabiciclo [6.6.2]esadecano	70
	<b>APPENDICE</b>	<b>71</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>

## INDICE DELLE FIGURE

<b>Figura 1.1</b>	Numero di radiofarmaci approvati per l'uso clinico dagli anni '90 al 2018 (Figura tratta da Aifa - <a href="https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf">https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf</a> ).	1
<b>Figura 1.2</b>	Nome delle specialità medicinali a base di radiofarmaci introdotti nel mercato fino al 2018. Tra parentesi viene indicato il radionuclide incorporato nel radiofarmaco. In grigio sono indicati quelli commercializzati prima del 2010, in blu quelli introdotti successivamente. (Figura tratta da Aifa - <a href="https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf">https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf</a> ).	3
<b>Figura 1.3</b>	Tecnica SPECT (sopra) e PET (sotto); (Figura tratta da Caterina F. Romogida, 2013).	5
<b>Figura 1.4</b>	Relazione tra emivita del radionuclide e obiettivo diagnostico o terapeutico; (Figura tratta da Koen Vermolen, 2019).	9
<b>Figura 1.5</b>	Rappresentazione di una facility SPES-ISOL. (Figura tratta dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare; ( <a href="https://web.infn.it/TechTransfer/images/Brevetti_panoramica/Schede_download/Radionuclidi_IT.pdf">https://web.infn.it/TechTransfer/images/Brevetti_panoramica/Schede_download/Radionuclidi_IT.pdf</a> )).	12
<b>Figura 1.6</b>	Alcuni esempi di linker utilizzabili in radiofarmaci (figura tratta da Shuang Liu, 2008.).	14
<b>Figura 1.7</b>	Struttura chimica di DTPA ed EDTA.	16
<b>Figura 1.8</b>	Strutture chimiche dei derivati del DTPA.	16
<b>Figura 1.9</b>	Strutture chimiche degli scaffold più utilizzati per la sintesi di chelanti bifunzionali.	17
<b>Figura 1.10</b>	Strutture chimiche di NOTA, DOTA, TETA e loro derivati "costrained".	17
<b>Figura 1.11</b>	Strutture dei chelanti bifunzionali per metalli soft fino ad ora considerati.	20
<b>Figura 2.1</b>	Nuove molecole proposte come chelanti per Ag-111.	21
<b>Figura 3.1</b>	Via sintetica riportata in letteratura da Gary R. Wesiman, 1996.	23
<b>Figura 3.2</b>	Via sintetica inizialmente progettata. In rosso vi sono indicate le reazioni tentate ma non riuscite.	24

<b>Figura 3.3</b>	Via sintetica modificata al secondo passaggio per tentare una sostituzione diretta con la catena laterale di interesse. In rosso le reazioni provate ma non venute.	26
<b>Figura 3.4</b>	Spettri di massa della miscela di reazione, dopo 1 giorno (sx), dopo 2 giorni (dx) dopo 3 giorni (basso). In rosso è riquadrato il picco di quello che si pensa essere il composto 8, in viola il picco relativo al composto mono-coniugato.	27
<b>Figura 3.5</b>	In nero è riportato il classico meccanismo di attacco da parte del 2-clorometiletilsulfuro. In verde è rappresentato il meccanismo alternativo da noi ipotizzato che porta alla formazione del composto 8.	28
<b>Figura 3.6</b>	Figura tratta da Ernest L. Eliel, 1975.	28
<b>Figura 3.7</b>	Via sintetica progettata, con l'utilizzo, come catena alchilante, il dibromoetano. In rosso le reazioni provate e non riuscite.	29
<b>Figura 3.8</b>	Struttura dei possibili polimeri che si formano dalla reazione.	30
<b>Figura 3.9</b>	Via sintetica alternativa alchilando con etil-2-bromoacetato. In rosso le reazioni provate ma non venute.	30
<b>Figura 3.10</b>	Figura tratta da Annaig Roignant, 1995. Viene mostrata la struttura del complesso formatosi tra cyclen e metil-tricloro-silano con le due forme mesomeriche che lo possono descrivere.	31
<b>Figura 3.11</b>	Via sintetica progettata con l'uso del metil-tridoro-silano. In rosso le reazioni provate ma non riuscite.	32
<b>Figura 3.12</b>	Formazione di un ponte meno rigidificante e tentativo di successiva alchilazione. In rosso la reazione provata ma non riuscita.	33
<b>Figura 3.13</b>	Nuova via sintetica progettata a partire da quella riportata dal Brevetto EP 2 476 683 A2	33
<b>Figura 3.14</b>	Primo tentativo di debenzilazione, seguendo la procedura riportata da Gary R. Weisman.	34
<b>Figura 3.15</b>	Secondo tentativo di debenzilazione per transfer di idrogeno.	35
<b>Figura 3.16</b>	Nuova via sintetica progettata usando diversi gruppi protettori. In rosso le reazioni provate e non riuscite.	36
<b>Figura 3.17</b>	Reazioni di deprotezione tentate, ma non riuscite, sulla molecola 15a.	37
<b>Figura 3.18</b>	Nuovo disegno retrosintetico con diverse disconnessioni.	39
<b>Figura 3.19</b>	Sintesi presa da Yuji Miyahara, 1999.	39
<b>Figura 3.20</b>	Nuova via sintetica progettata partendo da TACN e acido iminodiacetico.	39
<b>Figura 3.21</b>	Sintesi del 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazobicyclo[6.6.2]esadecano.	41

## INDICE DELLE TABELLE

<b>Tabella 1</b>	Radionuclidi impiegati nell'imaging con la tecnica SPECT e alcune loro caratteristiche (Tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019).	4
<b>Tabella 2</b>	Radionuclidi impiegati nell'imaging con la tecnica PET e alcune loro caratteristiche (tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019).	4
<b>Tabella 3</b>	Radionuclidi più comunemente impiegati in terapia e alcune loro caratteristiche. (Tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019).	6
<b>Tabella 4</b>	Radionuclidi teranostici impiegabili sia per l'imaging che per la successiva terapia. (tratto da Suresh C. Srivasta, 2013).	8
<b>Tabella 5</b>	Elenco di coppie di radionuclidi teranostici. (tratto da Suresh C. Srivasta, 2013).	8

## RIASSUNTO

Il presente lavoro di tesi è stato svolto all'interno del progetto ISOLPHARM-Ag il cui scopo è produrre radiofarmaci a base di Ag-111 *carrier free* impiegabili in medicina nucleare. Il progetto è coordinato a livello nazionale da INFN-LNL (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare – Laboratori Nazionali di Legnaro – PD), e vede la collaborazione dei Dipartimenti di Scienze Chimiche, Scienze Farmaceutiche ed Ingegneria Meccanica dell'Università degli Studi di Padova.

Tra i radionuclidi che potranno essere prodotti dalla facility ISOL, Ag-111 è uno dei più promettenti per la *radionuclide target therapy* in campo oncologico, poiché presenta delle favorevoli caratteristiche di decadimento (emettitore  $\beta^-$  con un'emivita media di 7.45 giorni, energia media di 360 keV, bassa percentuale di  $\gamma$  emissione ed una media penetrazione nei tessuti, pari a 1.8 mm) che lo rendono adatto come agente teranostico.

Per la realizzazione di un radiofarmaco clinicamente rilevante è anche essenziale selezionare un appropriato chelante bifunzionale. Questo, infatti, è deputato da una parte a coordinare stabilmente il radionuclide di interesse, e dall'altra a fungere da punto di legame per il *linker* che a sua volta lega la molecola direzionante incaricata di trasportare selettivamente il radiofarmaco nel sito tumorale. Il complesso che si forma tra chelante e radiometallo deve presentare una elevata stabilità termodinamica e inerzia cinetica, in modo da evitare effetti collaterali in tessuti sani dovuti ad un rilascio prematuro del metallo *in vivo*.

Poiché l'argento-111 non è ancora implementato nella corrente pratica clinica, non vi sono disponibili per esso chelanti bifunzionali. Pochi anni fa il gruppo di ricerca di chimica analitica del Dipartimento di Scienze Chimiche ha proposto e sintetizzato un derivato del cyclen tetraalchilato con 2-metiltilio-etile, e poi ne ha studiato le interazioni con Ag(I) sia a "freddo" (col metallo non radioattivo) che a "caldo" (col metallo radioattivo), e sebbene i complessi formati siano molto stabili, *in vivo* si è riscontrato il rilascio del radiometallo entro poche ore dalla sua somministrazione nel circolo sanguigno.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare nuovi chelanti *cyclen e cyclam based* che potessero aumentare la stabilità (termodinamica e/o cinetica) del complesso anche *in vivo*. Le molecole proposte sono due: 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano (CB-DO2S) e 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (CB-TE2S).

Per quanto riguarda il CB-TE2S, esso è stato ottenuto con una resa del 48% attraverso una sintesi a due passaggi: si ha una prima attivazione del 2-cloro-etilmetilsulfuro a ioduro e una successiva alchilazione del cb-cyclam, reso disponibile commercialmente dalla Chematech. Tale composto è stato caratterizzato tramite spettroscopia NMR (spettro del protone, del carbonio e spettri bidimensionali HSQC e COSY) e tramite analisi di massa.

Per quanto riguarda invece il CB-DO2S non è ancora stato possibile trovare una via sintetica in grado di portare al prodotto desiderato. Sono state proposte e testate numerose vie sintetiche, ed alcune di esse sembrano promettenti per la sintesi del composto finale operando poche modifiche rispetto alle procedure finora proposte.



## ABSTRACT

This thesis work was carried out within the ISOLPHARM-Ag project whose purpose is to produce carrier-free Ag-111-based radiopharmaceuticals that can be used in nuclear medicine. The project is coordinated at the national level by INFN-LNL (National Institute of Nuclear Physics - National Laboratories of Legnaro - PD) and sees the collaboration of the Departments of Chemical Sciences, Pharmaceutical Sciences, and Mechanical Engineering of the University of Padua.

Among the radionuclides that can be produced by the ISOL facility, Ag-111 is one of the most promising for target radionuclide therapy in oncology, as it has favorable decay characteristics (emitter  $\beta^-$  with an average half-life of 7.45 days, energy average of 360 keV, low percentage of  $\gamma$  emission and an average in tissues, equal to 1.8 mm) which makes it suitable as a theranostic agent.

For the fabrication of a clinically relevant radiopharmaceutical, it is also essential to select an appropriate bifunctional chelator. This is delegated on the one hand to stably coordinate the radionuclide of interest, and on the other to act as a binding point for the linker which in turn binds the directing molecule in charge of selectively transporting the radiopharmaceutical to the tumor site. The complex formed between the chelator and the radiometal must have high thermodynamic stability and kinetic inertia, to avoid side effects in healthy tissues due to a premature release of the metal in vivo.

Since silver-111 is not yet implemented in current clinical practice, there are no bifunctional chelators available for it. A few years ago, the analytical chemistry research group of the Department of Chemical Sciences proposed and synthesized a derivative of cyclen tetraalkylated with 2-methylthio-ethyl, and then studied its interactions with Ag (I) both in "cold" (cold non-radioactive metal) and "hot" (with the radioactive metal) and although the complexes formed are very stable, in vivo the release of the radiometal was found within a few hours of its administration into the bloodstream.

This thesis aimed to synthesize new cyclen and cyclam based chelators that could increase the stability (thermodynamic and/or kinetics) of the complex even in vivo. The proposed molecules are two: 4,10-bis (2- (methylthio) ethyl) -1,4,7,10-tetraazabicyclo [5.5.2] tetradecane (CB-DO2S) and 4,11-bis (2- (methylthio) ethyl) -1,4,8,11-tetraazabicyclo [6.6.2] hexadecane (CB-TE2S).

As for CB-TE2S, it was obtained with a yield of 48% through a two-step synthesis: there is a first activation of 2-chloro-ethyl-methyl sulfide to iodide and subsequent alkylation of CB-cyclam, made available commercially from Chematech. This compound was characterized by NMR spectroscopy (proton and carbon spectrum and two-dimensional HSQC and COZY spectra) and by mass analysis.

As far as CB-DO2S is concerned, it has not yet been possible to find a synthetic way capable of leading to the desired product. Numerous synthetic routes have been proposed and tested, and some of them appear promising for the synthesis of the final compound by making a few changes concerning the procedures proposed so far.



# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 RADIOFARMACI

Il radiofarmaco è una preparazione medicinale contenente uno o più isotopi radioattivi (radionuclidi). A differenza degli altri medicinali, l'attività farmacologica dei radiofarmaci non è dovuta al principio attivo, bensì al decadimento radioattivo, quindi all'emissione di radiazione, da parte del radionuclide. I radiofarmaci vengono utilizzati nell'ambito della medicina nucleare sia a scopo diagnostico che terapeutico.

Il loro principale campo di impiego è sicuramente quello oncologico. Il cancro è ancora oggi una delle cause più frequenti di morte nella popolazione, con oltre 7,6 milioni di morti l'anno, e si stima che nel 2030 il numero annuale di decessi arriverà a 13,1 milioni [Cancer Fact Sheet no. 297, 2012]. Questa tendenza può essere diminuita con una diagnosi precoce e un trattamento già nei primi stadi della malattia e, proprio da questo punto di vista, i radiofarmaci offrono un'ottima opportunità in quanto, come vedremo più avanti, sono in grado di individuare la malattia in maniera non invasiva e successivamente di operare una terapia mirata al sito tumorale.

Negli ultimi anni, inoltre, è stato ampliato l'utilizzo dei radiofarmaci in nuovi campi come nel trattamento del dolore osseo metastatico, nell'ablazione del midollo osseo e nella sinoviectomia radioattiva.

### Radiofarmaci: stato dell'arte

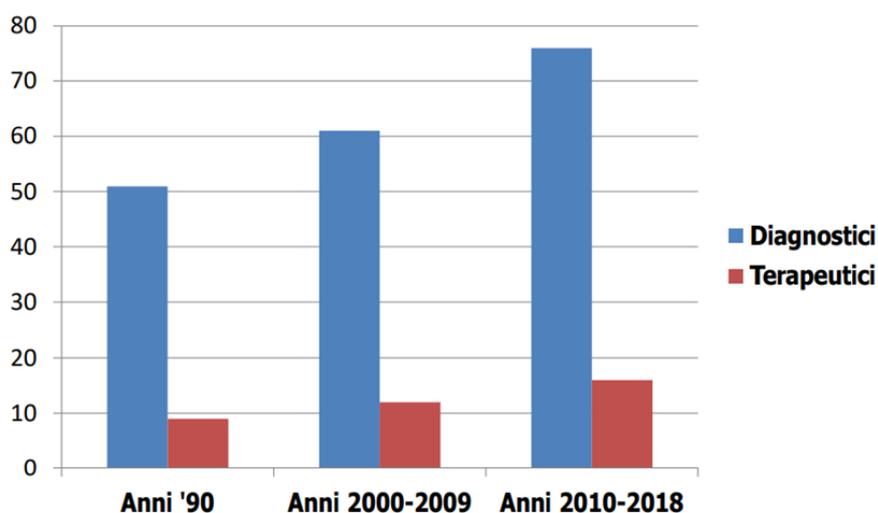


Figura 1.1: numero di radiofarmaci approvati per l'uso clinico dagli anni '90 al 2018 (Figura tratta da Aifa - [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18\\_Medicina\\_Nucleare\\_stato\\_arte\\_e\\_sfide\\_future.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf))

L'utilizzo di radiofarmaci è attualmente ancora molto limitato. Ad esempio, nel 2017 essi rappresentavano solo lo 0,5% del mercato mondiale totale di farmaci (circa 1000 miliardi di dollari). In generale, dunque, essi presentano ancora un limitato potenziale di mercato, e considerato che il costo del loro sviluppo è comparabile a quello dei farmaci tradizionali, il loro *business model* risulta abbastanza complesso [Koen Vermeulen, 2019].

Un dettaglio più approfondito del loro sviluppo degli ultimi trent'anni è rappresentato in Figura 1.1; si delineano due aspetti principali: solo un numero limitato di nuovi radiofarmaci è stato introdotto nel mercato, e i radiofarmaci per uso diagnostico sono molto più numerosi di quelli per uso terapeutico. Il minore avanzamento dei radiofarmaci in campo terapeutico può essere spiegato dal fatto che per questi è necessario un *targeting* molto più accurato del radionuclide che deve essere limitato solo nell'area di interesse [Bhattacharyya S., 2011]. In Figura 1.2 sono riportati i nominativi dei medicinali introdotti in commercio fino al 2018.

La ricerca biomedica condotta in questi ultimi anni ha permesso di ottenere notevoli miglioramenti soprattutto per quanto riguarda molecole direzionanti quali anticorpi, proteine, peptidi e una grande varietà di "molecole intelligenti", limitando quindi grandemente il danneggiamento di tessuti e organi *off-target* [Suresh C. 2011]. Si viene così a delineare la possibilità di una terapia mirata con radionuclidi che, nell'era della medicina di precisione, ha portato anche le grandi industrie farmaceutiche a sostenere degli ingenti investimenti in questo settore. Date queste premesse, è probabile che nei prossimi anni si avrà una notevole crescita di mercato dei radiofarmaci.

Un radiofarmaco *target*-specifico può essere diviso in quattro parti: molecola direzionante, *linker*, radionuclide e chelante bifunzionale.

## 1.2 RADIONUCLIDE

Il radionuclide è l'elemento del radiofarmaco responsabile dell'emissione di radiazioni ionizzanti e dunque responsabile dell'attività diagnostica e/o terapeutica del composto.

I radionuclidi sono elementi caratterizzati da un eccesso di energia nucleare che può essere dovuto ad un nucleo particolarmente pesante ( $Z > 83$ , dove  $Z$  è il numero di protoni presenti nel nucleo), ad uno squilibrio nella proporzione tra protoni e neutroni, oppure all'essere in uno stato energetico metastabile che li porterà quindi ad un decadimento radioattivo [Nicotra, 2018].

Sebbene ormai siano conosciuti più di 2300 nuclidi naturalmente instabili (mentre 280 sono stabili o comunque hanno un'emivita maggiore di  $10^{24}$  anni), la maggior parte di essi viene prodotta artificialmente bombardando un nuclide stabile con particelle nucleari, principalmente neutroni, protoni, deuteroni, particelle alfa e gamma.

Tra i radiofarmaci, ve ne sono una parte che incorporano isotopi non-metallici (molecole organiche); oggi, tuttavia, tendono ad essere proposti preferibilmente i radiofarmaci a base di radionuclidi metallici in quanto offrono una vastissima gamma di proprietà nucleari differenti, una ricca chimica di coordinazione, diversi metodi di produzione ed una buona disponibilità.

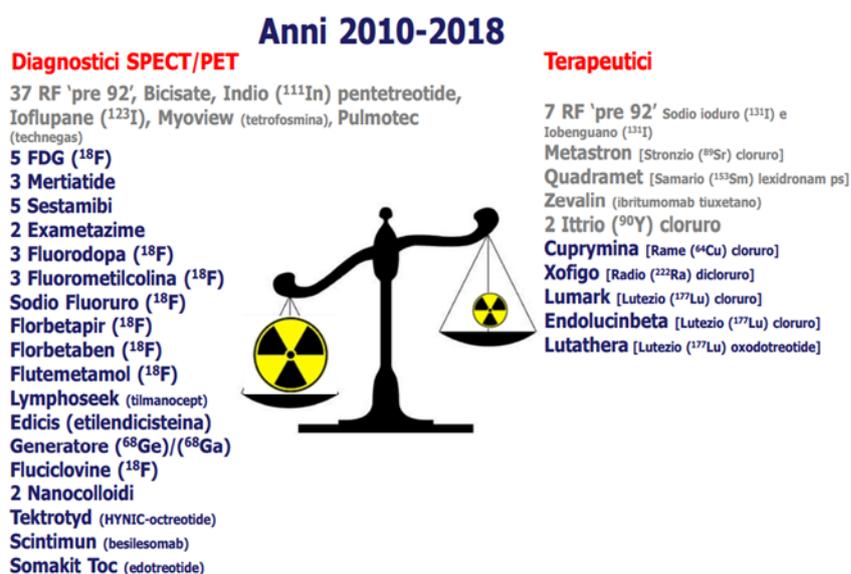


Figura 1.2: nome delle specialità medicinali a base di radiofarmaci introdotti nel mercato fino al 2018. Tra parentesi viene indicato il radionuclide incorporato nel radiofarmaco. In grigio sono indicati quelli commercializzati prima del 2010, in blu quelli introdotti successivamente. (Figura tratta da Aifa - [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18\\_Medicina\\_Nucleare\\_stato\\_arte\\_e\\_sfide\\_future.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1180150/2018-05-18_Medicina_Nucleare_stato_arte_e_sfide_future.pdf))

Il radionuclide più adatto è scelto in base alle proprietà più adatte al particolare scopo terapeutico o diagnostico che si vuole raggiungere, e valutandone sia le proprietà fisiche (come il tipo di decadimento, l'energia della radiazione e l'emivita) che gli aspetti produttivi (in particolare i costi, la disponibilità e la purezza).

Il tipo di decadimento permette una prima distinzione tra radionuclidi diagnostici, terapeutici e teranostici.

## 1.2.1 Radionuclidi diagnostici

I radionuclidi diagnostici permettono di diagnosticare una malattia (quali tumori, trombosi, infezioni, anomalie renali o epatiche, disordini neurologici o cardiaci), di valutarne il grado di avanzamento, di monitorare l'efficacia di un trattamento o di condurre studi di dosimetria per un successivo uso di un radionuclide terapeutico nello stesso paziente. Un elenco di radionuclidi diagnostici utilizzati fino al 2019 sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1: Radionuclidi impiegati nell'imaging con la tecnica SPECT e alcune loro caratteristiche (Tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019).

Radionuclide	T <sub>1/2</sub>	Nuclear Reaction	Mode of Decay*	Decay Product	Energy (MeV)	Average Range of β <sup>+</sup> in H <sub>2</sub> O (mm)
<sup>11</sup> C	20.4 min	<sup>14</sup> N(p,α) <sup>11</sup> C	β <sup>+</sup> (100%)	<sup>11</sup> B	0.960 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	1.2
<sup>13</sup> N	10.0 min	<sup>16</sup> O(p,α) <sup>13</sup> N	β <sup>+</sup> (100%)	<sup>13</sup> C	1.199 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	1.8
<sup>15</sup> O	2.0 min	<sup>14</sup> N(d,n) <sup>15</sup> O	β <sup>+</sup> (100%)	<sup>15</sup> N	1.732 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	3.0
<sup>18</sup> F	109.8 min	<sup>18</sup> O(p,n) <sup>18</sup> F <sup>20</sup> Ne(d,α) <sup>18</sup> F	β <sup>+</sup> (97%) EC (3%)	<sup>18</sup> O	0.634 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	0.6
<sup>64</sup> Cu	12.7 h	<sup>64</sup> Ni(p,n) <sup>64</sup> Cu	β <sup>+</sup> + EC (61%) β <sup>-</sup> (39%)	<sup>64</sup> Ni <sup>64</sup> Zn	0.653 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 0.3293-1.675 0.5794	0.7
<sup>68</sup> Ga	67.6 min	<sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga-generator	β <sup>+</sup> (89%) EC (11%)	<sup>68</sup> Zn	1.899 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 0.227-2.821	3.5
<sup>76</sup> Br	16.0 h	<sup>76</sup> Se(p,n) <sup>76</sup> Br	β <sup>+</sup> (55%) EC (45%)	<sup>76</sup> Se	3.382 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 0.599	
<sup>82</sup> Rb	1.3 min	<sup>82</sup> Sr/ <sup>82</sup> Rb-generator	β <sup>+</sup> (100%)	<sup>82</sup> Kr	3.378 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	7.1
<sup>86</sup> Y	14.7 h	<sup>86</sup> Sr(p,n) <sup>86</sup> Y	β <sup>+</sup> (32%) IT (68%) β <sup>+</sup> (23%) EC (77%)	<sup>86</sup> Sr <sup>89m</sup> Y	1.221, 1.545, 1.988 0.433-1.920 0.902 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 0.909	1.9, 2.8, 3.7
<sup>89</sup> Zr	3.3 days	<sup>89</sup> Y(p,n) <sup>89</sup> Zr	β <sup>+</sup> (26%) EC (74%)	<sup>89m</sup> Y	0.902 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 0.909	1.3
<sup>124</sup> I	4.2 days	<sup>124</sup> Te(p,n) <sup>124</sup> I	β <sup>+</sup> (26%) EC (74%)	<sup>124</sup> Te	2.138, 1.535 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> ) 602	4.4, 2.8
<sup>152</sup> Tb	17.5 h	<sup>143</sup> Nd( <sup>12</sup> C,5n) <sup>152</sup> Tb <sup>144</sup> Nd( <sup>12</sup> C,4n) <sup>152</sup> Tb <sup>145</sup> Nd( <sup>12</sup> C,3n) <sup>152</sup> Tb Spallation on Ta <sup>‡</sup>	β <sup>+</sup> (17%) EC (83%)	<sup>152</sup> Gd	2.9678 (β <sup>+</sup> E <sub>max</sub> )	

\*Abundance in %, EC, electron capture, IT, isomeric transition.

<sup>‡</sup>= proton-induced spallation on Tantalum.

Tabella 2: Radionuclidi impiegati nell'imaging con la tecnica PET e alcune loro caratteristiche (tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019).

Radionuclide	T <sub>1/2</sub>	Nuclear Reaction	Mode of Decay*	Decay Product	Energy (keV)**
<sup>67</sup> Ga	3.26 d	<sup>67</sup> Zn(p,n) <sup>67</sup> Ga <sup>68</sup> Zn(p,2n) <sup>67</sup> Ga	EC (100%)	<sup>67</sup> Zn	93
<sup>67</sup> Cu	3 d	<sup>68</sup> Zn(γ,p) <sup>67</sup> Cu	β <sup>-</sup> (100%) γ (52%)	<sup>67</sup> Zn	185
<sup>99m</sup> Tc	6.06 h	<sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc-generator	IT (89%)	<sup>99</sup> Tc	140
<sup>111</sup> In	2.83 d	<sup>111</sup> Cd(p,n) <sup>111</sup> In <sup>112</sup> Cd(p,2n) <sup>111</sup> In	EC (100%)	<sup>111</sup> Cd	245
<sup>123</sup> I	13.2 h	<sup>123</sup> Xe/ <sup>123</sup> I generator <sup>124</sup> Xe(p,pn) <sup>123</sup> I	EC (100%)	<sup>123</sup> Te	159
<sup>153</sup> Sm	47 h	<sup>152</sup> Sm(n, γ) <sup>153</sup> Sm	β <sup>-</sup> (100%) γ (29%)	<sup>63</sup> Eu	103
<sup>159</sup> Gd	20 h	TNB on Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	γ (11.4%)	<sup>159</sup> Tb	363

\*abundance in %, EC, electron capture, IT, internal transition, TNB, thermal neutron bombardment.

\*\*Energy of main γ-ray emitted.

Essi vengono somministrati in bassissime dosi, in un intervallo tra i  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M, e sfruttano il principio del *tracer principle*, secondo il quale un tracciante deve essere presente ad una concentrazione talmente bassa da non perturbare il sistema che sta valutando [Boros, 2021]. Quindi è anche sottinteso che i radionuclidi a scopo diagnostico non sono usati e non devono essere usati per ottenere effetti farmacologici.

Le tecniche di *radio-imaging* che vengono comunemente utilizzate nella medicina nucleare sono due: la SPECT (single-photon emission computed tomography) e quella più recente denominata PET (positron emission tomography); esse richiedono l'uso di radionuclidi con caratteristiche di emissione differenti, rispettivamente elencati in Tabella 1 e 2. Le due tecniche sono schematicamente visualizzate in Figura 1.3.

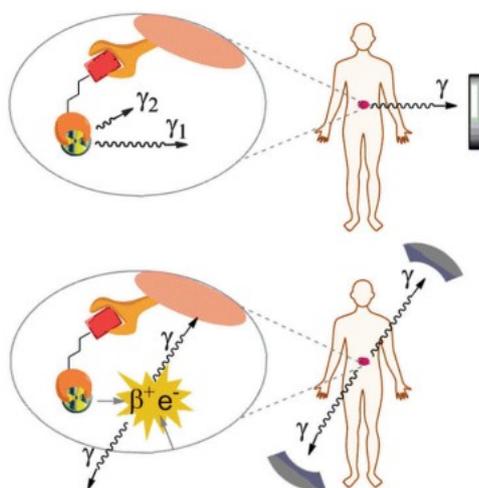


Figura 1.3: Tecnica SPECT (sopra) e PET (sotto); figura tratta da Caterina F. Romogida, 2013

## SPECT

La tecnica SPECT, che è stata utilizzata prima della PET, richiede l'utilizzo di un isotopo che emetta radiazioni gamma che vengono raccolte da una camera di rivelazione permettendo quindi di ricostruire un'immagine 3D dell'organo/zona corporea da cui ha avuto origine la radiazione.

Le camere di rivelazione per radiazioni gamma che sono disponibili in commercio sono state progettate per essere sensibili solo a radiazioni di un'energia compresa tra i 100 e i 250 KeV. Se quindi la radiazione gamma emessa dal radioisotopo è al di fuori di questa finestra di energia, l'immagine che ne risulterà non sarà di sufficiente qualità. Ciò implica che i radionuclidi diagnostici utilizzabili per la SPECT devono avere un'energia di decadimento compresa in questo intervallo.

La risoluzione spaziale ottenibile con questa tecnica è pari a 8-10 mm, e la sua sensibilità permette di rivelare concentrazioni dell'ordine del nano molare.

## PET

La tecnica PET prevede che il radionuclide emetta una particella  $\beta^+$ . Una volta emesso, il positrone percorre una breve distanza prima di collidere con un elettrone generando 2 fotoni gamma aventi un'energia di 511 keV, che muovendosi in direzioni opposte (circa 180°) colpiscono la serie circolare di rivelatori [Flora L., 2011]. Se i due rivelatori vengono colpiti simultaneamente (entro un'incertezza di coincidenza pari a 5-15 ns), si genera un segnale che, inviato all'unità di rielaborazioni delle immagini, restituisce una rappresentazione 3D dell'organo/distretto corporeo da cui avviene l'emissione della particella  $\beta^+$ .

La PET presenta delle caratteristiche migliori rispetto alla SPECT, arrivando ad una risoluzione di circa 2-4 mm e ad una sensibilità nell'ordine delle picomoli. Per questo, negli ultimi anni la ricerca è soprattutto focalizzata verso nuovi e migliori radio-metalli  $\beta^+$ -emettitori.

### 1.2.2 Radionuclidi terapeutici

I radionuclidi terapeutici sono utilizzati allo scopo di curare o controllare malattie o anche come cure palliative contro alcuni tipi di dolore. Il campo in cui vengono maggiormente utilizzati è quello oncologico, dove questi radionuclidi, una volta raggiunto il sito tumorale, sono deputati a distruggere le cellule cancerogene tramite l'emissione di radiazione. Un elenco di radionuclidi diagnostici utilizzati fino al 2013 è riportato in Tabella 3.

Tabella 3: Radionuclidi più comunemente impiegati in terapia e alcune loro caratteristiche. (Tabella tratta da Koen Vermeulen, 2019)

Radionuclide	T <sub>1/2</sub>	Main Emissions*	Production
<sup>225</sup> Ac	10 d	$\alpha$	<sup>229</sup> Th/ <sup>225</sup> Ac generator
<sup>223</sup> Ra	11.4 d	$\alpha$	<sup>227</sup> Ra/ <sup>223</sup> Ra generator
<sup>213</sup> Bi	45.6 min	$\alpha, \beta^-, \gamma$	<sup>225</sup> Ac/ <sup>213</sup> Bi generator
<sup>211</sup> At	7.2 h	$\alpha, EC$	Cyclotron <sup>209</sup> Bi( $\alpha, 2n$ ) <sup>211</sup> At
<sup>90</sup> Y	64 h	$\beta^-$	Nuclear reactor <sup>90</sup> Zr(n,p) <sup>90</sup> Y
<sup>177</sup> Lu	6.6 d	$\beta^-$	Nuclear reactor <sup>176</sup> Lu(n, $\gamma$ ) <sup>177</sup> Lu
<sup>67</sup> Ga	78 h	EC	<sup>67</sup> Zn(p,n) <sup>67</sup> Ga <sup>68</sup> Zn(p,2n) <sup>67</sup> Ga
<sup>99m</sup> Tc	6 h	IT	<sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc-generator
<sup>111</sup> In	67 h	EC	<sup>111</sup> Cd(p,n) <sup>111</sup> In <sup>112</sup> Cd(p,2n) <sup>111</sup> In

\*EC, electron capture; IT, internal conversion.

L'obiettivo terapeutico può essere raggiunto attraverso tre meccanismi differenti:

1. Una volta che la radiazione ionizzante colpisce l'acqua presente in tutte le cellule, si vengono a generare delle specie radicaliche libere (radicali idrossilici) che a loro volta danneggiano in modo irreparabile diversi componenti delle cellule quali fosfolipidi, DNA, RNA, proteine, causando così la morte della cellula stessa;
2. La diretta interazione della radiazione ionizzante con il DNA porta alla rottura del singolo filamento o di entrambi. Il primo evento sarebbe da evitare in quanto la singola rottura è più facilmente riparabile e, durante il processo di riparazione operato dalla cellula, si potrebbero creare mutazioni nella stessa. La rottura di entrambi i filamenti è quella auspicabile perché di difficile riparazione e quindi porta più efficacemente alla morte della cellula colpita.
3. *L'effetto abscopal* è raro ma può avvenire durante il trattamento di un tumore metastatico tramite la radioterapia: le cellule del sistema immunitario, stimolate dalle radiazioni, si attivano contro altre cellule cancerogene distanti dal sito del tumore primario irradiato (quindi contro metastasi distali). [Koen Vermeulen, 2019]

Indipendentemente dal meccanismo, l'effetto terapeutico si ottiene utilizzando radionuclidi che emettano particelle  $\beta^-$ , particelle  $\alpha$ , oppure *elettroni Auger*. Questi tipi di decadimenti, a differenza di quelli prodotti dai radionuclidi diagnostici, sono caratterizzati da radiazioni non penetranti che quindi permettono di ottenere una dose localizzata solo nel tessuto malato. I decadimenti  $\beta^-$ ,  $\alpha$ , e *Auger* si differenziano in base alla distanza che possono percorrere *in vivo* e in base ad un'altra caratteristica fisica intrinseca della radiazione che è la LET<sup>1</sup> (*linear energy transfer*).

Le particelle  $\beta^-$  sono caratterizzate da una bassa LET ( $\sim 0,2$  keV/ $\mu\text{m}$ ), e depositano la loro energia attraverso un'area relativamente elevata di tessuti. Possono perciò danneggiare cellule che si trovano ad una certa distanza (da circa 10 a 1000 diametri cellulari) rispetto a dove il radionuclide è stato deposto, anche grazie al *Cross fire effect* che si produce quando una particella, interagendo con la materia, ne genera altre che a loro volta possono colpire le cellule circostanti. Queste loro caratteristiche le rendono particolarmente adatte a trattare tumori di medie o grandi dimensioni oppure tumori poco vascolarizzati. Chiaramente, il principale svantaggio che deriva dal loro utilizzo è che, se anche ben direzionate verso il sito tumorale, sono in grado di danneggiare i tessuti sani circostanti.

Le particelle  $\alpha$  sono invece caratterizzate da un'alta LET ( $\sim 100$  keV) e dissipano la loro energia non molto distante da dove si sono depositate. Sono per questo più efficaci nel trattare piccoli tumori/metastasi localizzati ed omogenei. Tuttavia, sebbene esplicano la loro funzione in un'area molto localizzata (fino ad una distanza di 2-10 diametri cellulari), esse possono risultare tossiche quando il radionuclide in questione decade ad altri nuclei a loro volta alfa emittenti. Infatti, la *recoil energy* che si viene a creare in seguito al decadimento del radionuclide è in grado di rompere legami chimici, rilasciando radionuclidi figli. Questi, non essendo più legati alla molecola direzionante, possono ridistribuirsi in modo incontrollato nei tessuti vicini, danneggiandoli.

Gli elettroni Auger sono caratterizzati da una LET intermedia rispetto a quella delle particelle  $\alpha$  e  $\beta$  (4-26 keV), ma hanno il più piccolo intervallo d'azione, pari a pochi nanometri (diametro sub-cellulare).

---

<sup>1</sup> LET: è la quantità di energia che viene trasferita dalla radiazione ionizzante ai tessuti; è tipicamente espressa in kiloelettronvolt per micrometro di lunghezza della traccia nel tessuto (keV  $\mu\text{m}^{-1}$ ).

Essi sono quindi efficaci solo quando riescono ad essere localizzati esattamente nel nucleo, ma hanno il grande vantaggio di causare effetti collaterali trascurabili.

### 1.2.3 Radionuclidi teranostici

Una nuova ed interessante possibilità che sta sviluppandosi negli ultimi anni è quella dell'utilizzo di radionuclidi teranostici, cioè di un isotopo in grado di emettere radiazioni utili sia per l'*imaging*, sia per scopi terapeutici. Il loro utilizzo permetterebbe di condurre prima un *imaging* a bassa concentrazione e ricavare le utili informazioni pre-terapia, quali la biodistribuzione, la dosimetria, gli organi o tessuti critici e la massima dose tollerata dall'individuo, e successivamente condurre la radioterapia con lo stesso radionuclide a più elevata concentrazione.

Idealmente, quindi, il miglior agente teranostico dovrebbe essere un singolo radionuclide in grado di emettere radiazioni utili sia per l'*imaging* che per la successiva terapia; i radionuclidi che sono noti presentare queste proprietà sono riassunti in Tabella 4. Come seconda possibilità, si potrebbe usare una coppia di radionuclidi, o meglio due isotopi dello stesso elemento, uno come agente diagnostico e per condurre tutti gli studi pre-terapia, e il secondo come agente terapeutico; le coppie radionuclidiche utilizzabili a questo scopo sono riassunte in Tabella 5. Vi sono tuttavia due problematiche che rendono questa seconda scelta meno vantaggiosa. Innanzitutto, sebbene due isotopi abbiano le stesse caratteristiche chimiche e fisiche, potrebbero dover essere sottoposti a due metodi di produzione completamente diversi. Come vedremo dopo più in dettaglio, questo potrebbe portare ad avere impurezze diverse che ne cambiano l'attività specifica. In secondo luogo, l'emivita dei radionuclidi deputati all'*imaging* è solitamente molto breve e non consente lo studio, nella pre-terapia, della biodistribuzione e la dosimetria a lungo termine, entrambi importanti per la successiva cura.

Tabella 4: Radionuclidi teranostici impiegabili sia per l'*imaging* che per la successiva terapia. (tratto da Suresh C. Srivasta, 2013)

Radionuclide	T <sub>1/2</sub> (days)	Principal $\gamma$ energy for imaging, KeV(%)	Therapeutic particle(s) (avg. energy, KeV, % abundance)
Scandium-47	3.35	159 (68)	$\beta^-$ (162)
Copper-67	2.58	186 (40)	$\beta^-$ (141)
Gallium-67	3.26	93, 184, 296 (40, 24, 22)	15 Auger, 0.04–9.5 keV, 572 % 10 C.E., 82–291 keV, 30 %
Indium-111	2.80	171, 245 (91, 94)	6 Auger, 0.13–25.6 keV, 407 % 12 C.E., 144–245 keV, 21 %
Tin-117m	14.00	159 (86)	8 C.E. (141 keV avg., 114 %)
Iodine-123	13.3 h	159 (83)	12 Auger, 23–30.4 keV, 1371 % 7 C.E., 0.014–32 keV, 17 %
Iodine-131	8.0	365 (82)	$\beta^-$ (181)
Samarium-153	1.94	103 (30)	$\beta^-$ (280)
Astatine-211	7.2 h	79 (21)	$\alpha$ (5867, 42 %)
Bismuth-213	46 min	441 926)	$\beta^-$ (425); $\alpha$ (98 %, from Tl-209 daughter, 2 % from Bi-213)

Tabella 5: Elenco di coppie di radionuclidi teranostici. (tratto da Suresh C. Srivasta, 2013)

Radionuclide pair imaging/therapeutic	T <sub>1/2</sub> (days)	Imaging positron, KeV (%)	Therapeutic particle(s) (avg. energy, KeV)
Scandium-44/Scandium-47	3.97/3.35	$\gamma \pm 511$ (99.9%)	$\beta^-$ (162)
Copper-64/Copper-67	0.53/2.6	$\gamma \pm 511$ (38%)	$\beta^-$ (141)
Gallium-68/Gallium-67	68 min/3.26	$\gamma \pm 511$ (176%)	15 Auger, 0.04–9.5 keV, 572 % 10 C.E., 82–291 keV, 30 %
Yttrium-86/Yttrium-90	0.61/2.7	$\gamma \pm 511$ (35%)	$\beta^-$ (935)
Iodine-124/Iodine-131	4.2/8.0	$\gamma \pm 511$ (38%)	$\beta^-$ (181)

## 1.2.4 Emivita

L'emivita di un radionuclide utilizzabile a scopo radiofarmaceutico deve essere innanzitutto sufficientemente lunga da permettere la sintesi del radio-coniugato e successivamente comparabile alla farmacocinetica *in vivo* della molecola direzionante, ovvero deve essere abbastanza lunga da permettere al composto di localizzarsi nel sito *target*. Infatti, se l'emivita risultasse troppo breve, la maggior parte dell'emissione di radiazione avverrebbe in siti non *target*, portando ad effetti tossici collaterali. Come regola generale, dunque, se si utilizzano molecole direzionanti che impiegano un lungo tempo a localizzarsi nel sito interesse (come gli anticorpi monoclonali) il radionuclide dovrà avere un'emivita altrettanto lunga; viceversa, se la *target-molecola* si localizza rapidamente (piccole molecole organiche) allora anche l'emivita del radionuclide dovrà essere breve.

Un altro aspetto che definisce l'emivita ottimale di un radionuclide è legato allo scopo, diagnostico o terapeutico, di utilizzo del radiofarmaco. I radionuclidi utilizzati a scopo diagnostico dovrebbero avere un'emivita molto breve, ovvero appena sufficiente per raggiungere i siti *target* in modo da limitare la dose di radiazioni al paziente e alle persone a lui vicine. Al contrario, i radionuclidi utilizzati a scopo terapeutico, dovrebbero presentare delle emivite più lunghe perché l'emissione di radiazione per un tempo prolungato nel sito di interesse comporta un più efficiente danneggiamento delle cellule maligne; inoltre, l'emivita lunga favorisce la localizzazione della maggior parte della radiazione contro il sito *target*, considerato il tempo necessario alla molecola direzionante per raggiungere il sito stesso. La Figura 1.4 riporta alcuni grafici che relazionano l'emivita del radionuclide e la farmacocinetica del radiofarmaco.

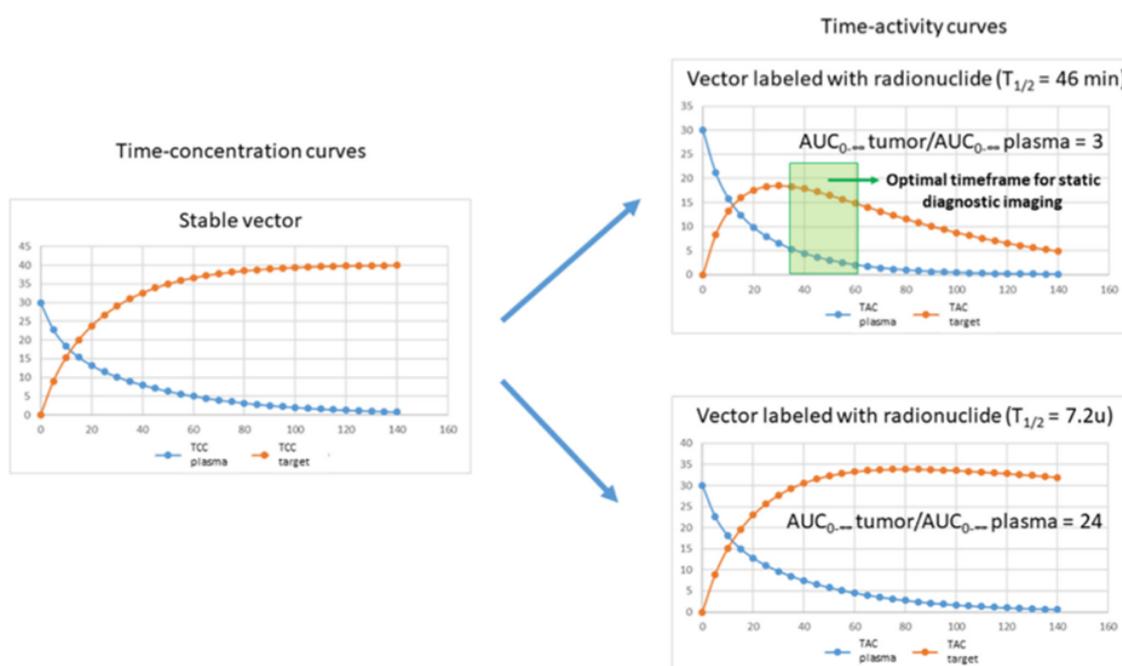


Figura 1.4: Relazione tra emivita del radionuclide e obiettivo diagnostico o terapeutico (figura tratta da Koen Vermolen, 2019).

### 1.2.5 Produzione

La produzione dei radionuclidi rappresenta un passaggio fondamentale e ancora, a volte, limitante nella messa in commercio di nuovi e promettenti radiofarmaci con proprietà terapeutiche, diagnostiche o teranostiche. Non sempre, infatti, i processi produttivi disponibili per sintetizzare un radionuclide sono sufficientemente semplici, impiegabili su larga scala e a basso costo. Inoltre, il radionuclide prodotto deve presentare due proprietà: attività specifica e purezza radionuclidica.

L'attività specifica ( $S$ ) rappresenta la radioattività per unità di massa dell'elemento e viene generalmente espressa in Bq/grammo (Bq: bequerel che è il numero di disintegrazioni nell'unità di tempo di nuclei radioattivi), come:

$$S = \lambda N = \frac{1}{\tau} \frac{NA}{M}$$

Una bassa attività specifica implica che il radionuclide di interesse è diluito con suoi isotopi stabili, definiti *carrier*, che non hanno rilevanza né in campo terapeutico né in campo diagnostico. La presenza di elevate quantità di *carrier* (o isotopo *cold*) può far sì che questo competa per il recettore sovraespresso nelle cellule tumorali, saturandolo prematuramente. Questo inevitabilmente porta ad una riduzione dell'efficacia terapeutica del radiofarmaco. È quindi importante che il radionuclide possieda un'alta attività specifica: un nuclide con questa caratteristica viene anche definito *carrier-free*.

La purezza radionuclidica viene espressa come il rapporto tra la radioattività del radionuclide desiderato e quella totale della preparazione farmaceutica. Infatti, durante il processo di produzione, o anche in quello di purificazione, possono rimanere tracce di altri radionuclidi, diversi da quello di interesse. Questo deve essere quanto più possibile evitato, soprattutto se le impurezze sono radioisotopi a lunga emivita, in quanto esporrebbe il paziente ad una quantità di radiazione eccessiva e non necessaria.

Attualmente i metodi di produzione di radionuclidi più comunemente usati prevedono l'utilizzo di un reattore nucleare oppure di un ciclotrone.

Nei reattori nucleari la produzione di radioisotopi può avvenire attraverso tre reazioni differenti: *neutron capture*, *neutron capture* seguita da decadimento, e fissione. La prima presenta il vantaggio di essere semplice ed avere buone rese, ma in genere i radionuclidi ottenuti presentano una bassa attività specifica in quanto il prodotto radioattivo non può essere separato dal *target*. L'attività specifica può essere migliorata se, in seguito al *neutron capture*, si viene a creare un radioisotopo intermedio che poi decade a quello di interesse. In questo caso *target* e radioisotopo di interesse possono essere separati chimicamente portando ad una maggiore purezza del composto finale. Nella fissione, infine, un *target* (solitamente costituito da elementi pesanti della tavola periodica, tra cui il più utilizzato è U-235) viene bombardato con neutroni che penetrando nei nuclei atomici generano un nucleo più pesante altamente eccitato. Esso, tornando in uno stato più stabile, si separa in due frammenti più leggeri, generalmente di massa diversa. Attraverso questo metodo possono essere prodotti numerosi radionuclidi di interesse medico, tra cui  $^{99}\text{Mo}$  (che decade poi a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  molto utilizzato nell'*imaging*),  $^{131}\text{I}$  e  $^{133}\text{Xe}$ .

L'utilizzo dei ciclotroni è solitamente preferito a quello dei reattori, sia perché sono maggiormente disponibili (ne sono presenti in molti ospedali), sia perché permettono una produzione un po' più efficiente e a minor costo. Inoltre, l'attività specifica del radionuclide risulta spesso migliore rispetto a quella ottenibile mediante reattori.

I ciclotroni prevedono l'utilizzo di particelle cariche quali protoni, deuteroni o particelle di elio, le quali vengono accelerate attraverso l'uso di elevati campi magnetici e colpiscono i nuclei di atomi presenti nel *target*, generando così dei prodotti radioattivi *proton-rich*.

Anche il ciclotrone presenta tuttavia delle limitazioni non molto differenti da quelle del reattore nucleare, in quanto i costi restano elevati, sono prodotte grandi quantità di scorie radioattive, e poi vanno considerate anche la laboriosità dei metodi di purificazione e la possibile produzione di contaminanti.

Oggigiorno la ricerca in fisica nucleare è molto attiva per definire e sviluppare nuovi metodi di produzione che superino le limitazioni prima viste. Tra questi nuovi metodi, uno dei più promettenti è studiato anche a livello nazionale dall'INFN- LNL (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare - Laboratori Nazionali di Legnaro), in collaborazione coi Dipartimenti di Scienze Chimiche, di Scienze del Farmaco e di Ingegneria Meccanica dell'Università degli Studi di Padova. Il metodo proposto è parte del progetto SPES (*Selective Production of Exotic Species*) volto alla produzione di fasci di ioni radioattivi (*Radioactive Ion Beam*, RIB) caratterizzati da alta attività specifica e purezza radionuclidica, e si basa sulla tecnica ISOL (*Isotope- separation online*), ovvero sulla separazione degli isotopi in linea. Tale separazione ha luogo subito dopo la produzione ed è basata sulla massa, permettendo la separazione del radionuclide di interesse da tutti i suoi isotopi stabili, e portando così ad un'elevatissima attività specifica. Va tenuto presente che in questa fase possono co-eluire contaminanti isobarici che però, avendo proprietà chimico-fisiche differenti, possono essere separati successivamente attraverso metodi chimici tradizionali.

In particolare, nella *facility* SPES-ISOL in fase di costruzione a Legnaro si avrà l'induzione di reazioni nucleari attraverso il bombardamento di un *target* di materiale fissile (a seconda del materiale di cui è composto possono essere prodotti sia radionuclidi *proton-rich* che *neutron-rich*) da parte di un fascio di protoni a bassa energia accelerato da un ciclotrone. Gli atomi radioattivi prodotti, grazie all'elevata temperatura (2000 °C) e all'alto vuoto, vengono evaporati e indirizzati verso una sorgente di ioni. In questa sede i radioisotopi vengono ionizzati allo stato 1+ e accelerati, formando un RIB. Il fascio attraversa un separatore di massa (*Wien Filter*), in cui un campo elettrico stabile e uno magnetico variabile permette di deviare tutti gli isotopi di massa non desiderata. Il fascio isobarico così ottenuto viene impiantato in un *target* secondario, posto alla fine della linea da vuoto. Esso viene infine trasferito all'unità radiochimica, dove andrà incontro alla purificazione chimica. La Figura 5 riporta schematicamente un apparato SPES-ISOL.

Mediante tecnica ISOL si possono produrre sia radioisotopi tradizionali (cioè producibili anche con le altre tecniche viste prima), sia radioisotopi innovativi di interesse terapeutico e/o diagnostico che ancora non sono stati mai presi in considerazione. All'interno quindi del progetto SPES si è quindi avviato il progetto ISOLPHARM volto alla produzione di radionuclidi impiegabili nella medicina nucleare con elevatissima purezza radionuclidica e attività specifica, attraverso i RIB prodotti nella *facility* ISOL che sarà presente all'INFN.

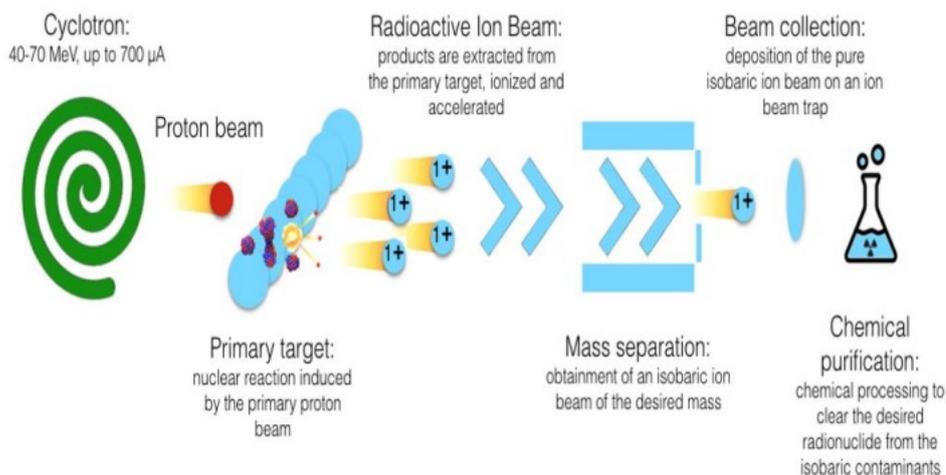


Figura 1.5: Rappresentazione di una facility SPES-ISOL. (Figura tratta dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, [https://web.infn.it/TechTransfer/images/Brevetti\\_panoramica/Schede\\_download/Radionuclidi\\_IT.pdf](https://web.infn.it/TechTransfer/images/Brevetti_panoramica/Schede_download/Radionuclidi_IT.pdf)).

### 1.3 MOLECOLA DIREZIONANTE

La molecola direzionante (*targeting agent*, o *targeting molecule*) è un componente fondamentale del radio-coniugato, dato che è la parte deputata a far accumulare il composto nel tessuto/organo di interesse, cioè solitamente le cellule tumorali.

La molecola direzionante, a seconda delle caratteristiche del tumore, può essere disegnata in modo da accumularsi selettivamente nel tessuto malato attraverso due modalità diverse:

1. *Targeting attivo*: in questo caso la biomolecola si lega ad un recettore o ad un antigene espresso nelle cellule tumorali. Ovviamente ciò è possibile solo se l'antigene/recettore è presente sulla superficie delle cellule ed è sufficientemente sovra-espresso rispetto ai tessuti sani vicini; inoltre, la biomolecola si deve legare in modo specifico e con un'elevata affinità.
2. *Targeting passivo*: in questo caso si sfrutta una caratteristica che possiedono esclusivamente i tumori solidi, cioè l'effetto EPR (*enhanced permeability and retention*). Le cellule tumorali sono note essere caratterizzate da un'elevata velocità di crescita e replicazione, e per questo la formazione dei vasi sanguigni non risulta mai completa. Lungo le pareti vengono quindi lasciate delle fenestrazioni, non presenti nei vasi sanguigni dei tessuti sani, attraverso cui il radio coniugato di grandi dimensioni può passare e localizzarsi selettivamente solo nel sito tumorale, non riuscendo ad extra-vasare in altre aree. Inoltre, all'interno delle masse tumorali non si sviluppa il sistema linfatico; dunque, una volta che il radiofarmaco è extravasato, si accumula all'interno del tessuto malato non potendo in alcun modo essere drenato.

Le molecole direzionanti possono essere anticorpi monoclonali, frammenti di anticorpi, peptidi, proteine, piccole molecole organiche o nanoparticelle. Ognuna di queste possiede caratteristiche chimico-fisiche diverse che le rendono più o meno adatte a direzionare diversi tipi di radionuclidi e localizzarli in diversi tipi di tumori.

**ANTICORPI MONOCLONALI:** sono delle proteine, caratterizzate da un alto peso molecolare (circa 150 kDa) e da una elevatissima affinità e specificità per l'antigene di riferimento. Sebbene queste ultime due caratteristiche siano molto positive, il loro elevato peso molecolare ne preclude tuttavia un utilizzo molto ampio. Infatti, l'escrezione renale risulta impedita per la loro grande dimensione, per cui i radiofarmaci basati su anticorpi monoclonali possono subire un meccanismo di *re-uptake* mediato da recettori per la parte costante, e risultano circolare nel sangue per diversi giorni prima di riuscire a localizzarsi selettivamente al livello del tumore. Questo porta alla necessità di utilizzare un radio nuclide con una lunga emivita, la qual cosa, almeno a livello diagnostico, sarebbe preferibile evitare. Inoltre, le lunghe emivite comportano che anche i tessuti sani siano sottoposti ad esposizione alla radiazione, e ciò accade sia a livello diagnostico che terapeutico.

Oggi giorno vi sono comunque quattro radiofarmaci approvati dall'FDA e presenti in commercio che contengono un anticorpo monoclonale come molecola direzionante (Bexxar con  $^{131}\text{I}$ , Zevalin a base di  $^{90}\text{Y}$ , ProstaScinta con  $^{111}\text{In}$  come radionuclide, e un ultimo basato su  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).

**FRAMMENTI DI ANTICORPI:** l'avanzamento nel campo dell'ingegneria proteica ha portato alla realizzazione di frammenti di anticorpi monoclonali di varie dimensioni. Quella che viene sempre mantenuta è la parte variabile dell'anticorpo monoclonale che è deputata al riconoscimento e al legame selettivo con un'alta affinità con l'antigene/recettore, mentre gli altri domini possono essere o meno presenti a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche desiderabili. In generale, più il frammento è piccolo, minore sarà l'emivita del composto nel sangue. Per questa loro caratteristica i frammenti di anticorpi sono adatti ad un accoppiamento con un radio nuclide a breve emivita e ad un utilizzo soprattutto in ambito diagnostico.

**PEPTIDI:** i peptidi presentano un peso molecolare relativamente molto ridotto, hanno una rapida localizzazione nel sito *target* e una ridotta emivita nel circolo sanguigno. Un'altra caratteristica favorevole che si verifica spesso è l'internalizzazione nella cellula *target*: ciò permette così una lunga ritenzione della radioattività nelle cellule tumorali. Questa caratteristica potrebbe essere molto interessante per radiometalli che emettono elettroni Auger o per radioisotopi che emettono diverse particelle  $\alpha$ . I peptidi, inoltre, sono facilmente sintetizzabili sia manualmente (sintesi in fase solida), sia con sintetizzatori automatici. Infine, per diminuire la velocità di degradazione, si possono introdurre delle modifiche nella sequenza amminoacidica che li rendano meno attaccabili dalle numerose peptidasi presenti nel sangue (ad esempio sono stati considerati l'introduzione di D-amminoacidi, oppure l'uso di peptidi ciclici).

L'unico problema evidenziato dal loro utilizzo è l'*uptake* e la ritenzione a livello renale, che diventa particolarmente preoccupante nel caso della radioterapia perché può portare a radio-nefrotossicità.

**PICCOLE MOLECOLE ORGANICHE:** molecole come amminoacidi, acidi grassi o nucleosidi, tutte di dimensioni molto piccole, sono in grado di attraversare la membrana plasmatica e quindi di internalizzare il radionuclide nella cellula. Di conseguenza esse sono utili se unite a radioisotopi che hanno un'alta LET. In più, tali molecole possono potenzialmente attraversare la barriera ematoencefalica e quindi intervenire su tumori localizzati nel cervello.

**NANOPARTICELLE:** queste molecole sfruttano l'effetto EPR per localizzarsi nel sito tumorale. Esse, infatti, date le loro grandi dimensioni riescono ad extra-vasare solo attraverso i vasi sanguigni "immaturi" presenti nella massa tumorale. Per operare un *target* ancora più fine, sulla loro superficie possono essere coniugate alcune delle altre biomolecole viste prima.

## 1.4 LINKER

Il *linker* è solitamente costituito da una piccola catena a basso peso molecolare e viene posto tra la molecola direzionante e il chelante bifunzionale. Alcune molecole utilizzabili come *linker* sono visualizzate in Figura 1.6. Il *linker* ha essenzialmente due scopi. Innanzitutto, esso deve allontanare tra di loro la molecola direzionante e il chelante, per minimizzare le perturbazioni reciproche dell'una sull'altra struttura sia in termini di forma che di dimensione. Si cerca così di evitare di diminuire l'affinità della molecola direzionante per il suo recettore/antigene e/o di diminuire la capacità del chelante di complessare efficacemente il radio-metallo. In, secondo luogo il *linker* può anche modificare le proprietà di idrofilicità/lipofilità del radiofarmaco, per facilitare la biodistribuzione e l'eliminazione del radio-complesso, e quindi per migliorare la farmacocinetica ed in particolare il rapporto tessuto *target*/tessuti sani.

Ad esempio, una piccola catena idrocarburica può essere utilizzata come *linker* per aumentare la lipofilità del radiofarmaco, e in questo caso aumenta anche la probabilità che esso riesca a superare le membrane cellulari o la barriera ematoencefalica; oppure si può considerare un piccolo peptide per, al contrario, aumentare l'idrofilicità e facilitare così la solubilità in acqua o migliorare la *clearance* renale; oppure ancora, come *linker* può essere usata una corta catena di PEG in modo da diminuire l'*uptake* da parte degli epatociti. Possono anche essere usati *linker* carichi positivamente (in questo caso si ha un maggiore accumulo a livello del cuore) o negativamente (si aumenta la *clearance* renale); infine, un'interessante possibilità è quella di selezionare *linker* in grado di essere degradati selettivamente nel sito tumorale.

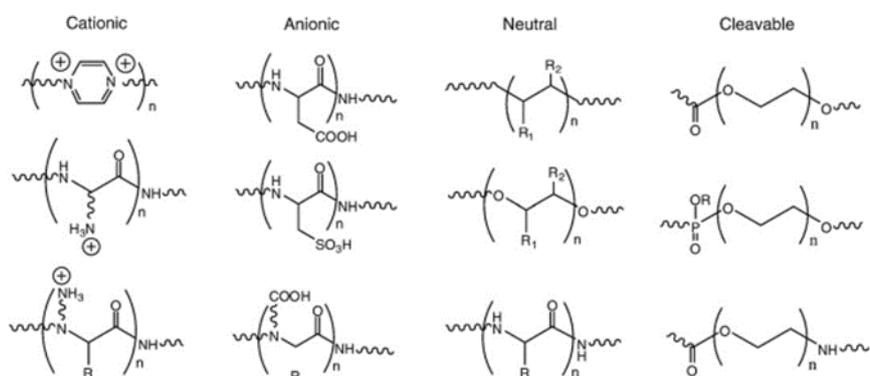


Figura 1.6: Alcuni esempi di linker utilizzabili in radiofarmaci (figura tratta da Shuang Liu, 2008.).

## 1.5 CHELANTE BIFUNZIONALE

Il chelante bifunzionale (*bifunctional chelator*, BFC) è la parte del radiofarmaco deputata da una parte a coordinare stabilmente il radionuclide e dall'altra ad offrire un gruppo funzionale utile al legame con il *linker* che a sua volta è legato alla molecola direzionante.

La scelta di un BFC è essenziale per mantenere il radionuclide coordinato al radiofarmaco durante la terapia o la diagnosi, e quindi a ottenere l'efficacia clinica voluta.

Il BFC deve presentare tre proprietà.

1. Il complesso che si forma con il radio-metallo di interesse deve essere termodinamicamente molto stabile. La scelta del chelante migliore deve quindi essere fatta considerando primariamente lo stato di ossidazione del metallo e le sue caratteristiche di coordinazione. In generale è noto che ioni metallici definiti *hard* (dalla teoria acido-base *hard-soft* di Pearson) vengono meglio chelati da leganti che possiedono donatori *hard*, come ossigeno e azoto, mentre ioni metallici classificati come *soft* vengono preferibilmente coordinati da donatori *soft* come lo zolfo o il fosforo. La stabilità termodinamica dei complessi tra ione metallico e chelante viene misurata mediante titolazioni potenziometriche e/o spettroscopiche (UV-visibile e/o NMR).
2. Il complesso che si forma con il radio-metallo di interesse deve anche (o in alternativa) avere un'elevata inerzia cinetica *in vivo*. Si deve infatti considerare che il radiofarmaco, una volta iniettato nel circolo sanguigno, subisce una forte diluizione (raggiungendo concentrazioni dell'ordine medio di  $10^{-10}$  M), per cui la reazione di complessamento tende a spostarsi verso i reagenti (metallo e chelanti liberi); inoltre, nel sangue sono presenti molti altri ioni metallici che potrebbero competere con il chelante, e molti altri leganti, come le proteine, albumina e transferrina, che sono degli ottimi chelanti per i metalli. Se la stabilità termodinamica del complesso non è sufficiente in queste condizioni, può intervenire l'inerzia cinetica a impedire un prematuro distacco del radionuclide prima che il radiofarmaco stesso arrivi al sito *target*.
3. Infine, la reazione di complessamento tra il chelante e il radiometallo dovrebbe avere un'alta resa, cioè essere pressoché quantitativa e rapida nelle condizioni operative di preparazione del radiofarmaco (*radiolabeling*). La rapidità, in particolare, è richiesta per non "sprecare" l'emivita del radio-metallo. La reazione deve anche poter avvenire in ambiente acquoso e in condizioni di reazioni blande, includendo tra queste una temperatura bassa, in modo da permettere l'uso, per esempio, di anticorpi o proteine come molecole direzionanti, e dovrebbe aver luogo mediante un semplice mescolamento dei reattivi, in modo da poter essere eseguita anche in ambito ospedaliero.

I chelanti generalmente utili nella produzione di radiofarmaci possono essere suddivisi in due grandi categorie: i chelanti ACICLICI, *open chain*, e quelli CICLICI, *close chain*.

### 1.5.1 Chelanti aciclici

I chelanti aciclici sono solitamente caratterizzati da una elevata cinetica di coordinazione con il radio-metallo di interesse, rendendoli quindi particolarmente adatti per radioisotopi aventi una breve



## 1.5.2 Chelanti ciclici

Questa categoria di leganti mostra un'inerzia cinetica più elevata rispetto ai composti ciclici e, per tale motivo, sono oggi i composti maggiormente studiati.

In questa famiglia di leganti, quelli più interessanti sono basati essenzialmente su tre poliazomacrocicli: l'1,4,7-triazaciclononano (TACN), l'1,4,7,10-tetraazaciclododecano (cyclen) e l'1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (cyclam), mostrati in Figura 8. Tutti sono stati poi variamente sostituiti e modificati per dare origine a diversi BFC adatti a coordinare metalli differenti, in particolar modo i lantanidi e i metalli di transizione. L'attacco di diversi sostituenti può avvenire o a livello degli azoti (la maggior parte delle volte) o sui carboni del macrociclo.

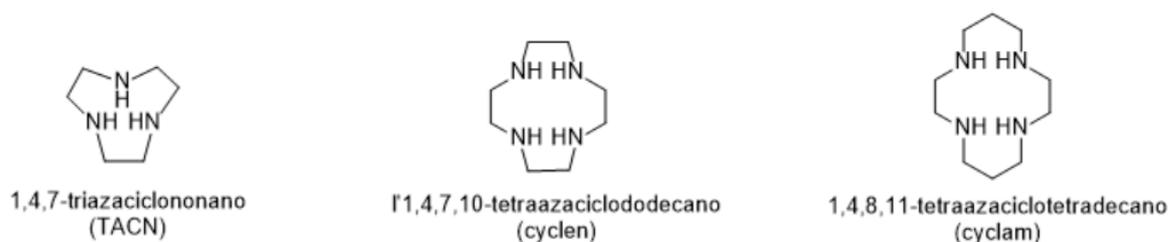


Figura 1.9: strutture chimiche degli scaffold più utilizzati per la sintesi di chelanti bifunzionali.

### NOTA, DOTA, TETA

Tra i gruppi funzionali considerati si possono menzionare gruppi fosfonici, fosfinici, alcolici, amminici, acetamidici, alchilici e arilici. Tuttavia, i poliazomacrocicli più noti e utilizzati sono quelli in cui tutti gli azoti del ciclo sono stati alchilati con l'acido acetico. Si vengono quindi a formare gli acidi 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico (NOTA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA) e 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetico (TETA), mostrati in Figura 1.10, che possono quasi essere considerati come dei *gold standard* per il complessamento di diversi radiometalli.

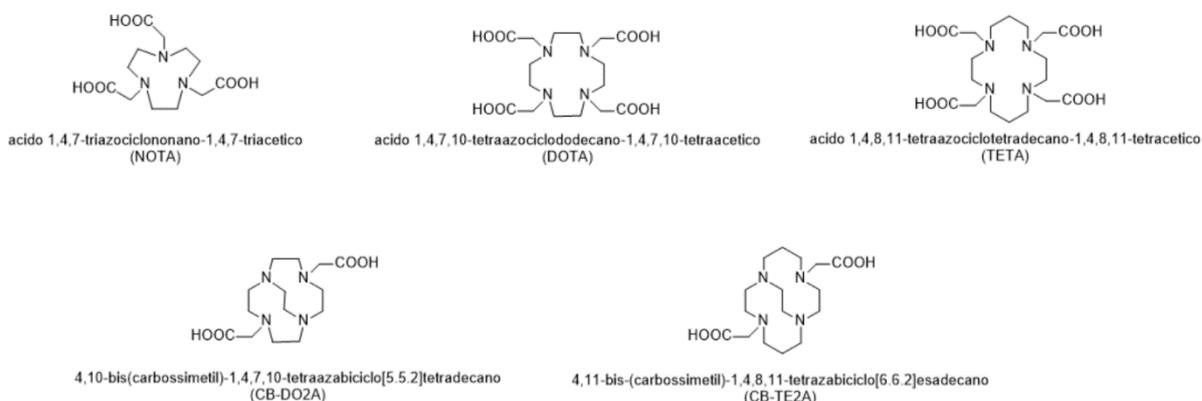


Figura 1.10: strutture chimiche di NOTA, DOTA, TETA e loro derivati "constrained".

Come già accennato per il DTPA, il NOTA, il DOTA e il TETA potrebbero già essere considerati bifunzionali in quanto uno degli acidi carbossilici è utilizzabile per la coniugazione con il *linker*; tuttavia, la maggior parte delle volte si preferisce inserire un ulteriore gruppo funzionale (o nel carbonio in alfa al carbonile, o in uno dei carboni del macro-ciclo) che servirà poi da attacco al *linker*, mantenendo in tal modo inalterati i siti di coordinazione del metallo.

Tali chelanti risultano particolarmente efficaci nella coordinazione di metalli hard quali  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ , molto utilizzati sia in campo diagnostico che terapeutico, attraverso gli azoti del macrociclo e gli ossigeni dei carbossilici. Tuttavia, nonostante i complessi formati risultino avere una elevata stabilità termodinamica *in vitro*, *in vivo* essi mostrano ancora una bassa inerzia cinetica che porta ad una notevole perdita del radiometallo. Questo fenomeno è stato verificato in particolare nel caso del  $^{64}\text{Cu}$ , che è un radiometallo di notevole interesse in medicina nucleare, ed è attualmente molto studiato per applicazioni radiofarmaceutiche. Si è verificato che vi sono due fenomeni che concorrono all'instabilità *in vivo* dei complessi di  $^{64}\text{Cu}$ : innanzitutto, lo ione metallico, che è presente nel radiofarmaco allo stato di ossidazione (II), una volta entrato nel circolo sanguigno può andare incontro a riduzione a rame (I) che non viene più adeguatamente coordinato; in secondo luogo, soprattutto a livello del fegato, esso può subire una transchelazione da parte della superossido dismutasi (SOD), proteina abbondantemente presente nel fegato ma anche nei reni e nei globuli rossi. Per ovviare a questi problemi, si è pensato di introdurre una maggiore rigidità nel legante, sintetizzando e studiando due derivati, rispettivamente del cyclen e del cyclam: 4,10-bis(carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano (CB-DO2A) e 4,11-bis-(carbossimetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (CB-TE2A). Si è potuto dimostrare che la demetallazione del  $^{64}\text{Cu}$  avviene in misura minore quando il rame è coordinato dai leganti rigidificati CB-DO2A e CB-TE2A che non quando è legato al DOTA; il CB-TE2A, in particolare, è quello che ha dimostrato le proprietà migliori [Morten Persson, 2013]. Inoltre, sono anche stati condotti degli esperimenti voltammetrici da cui è emerso che mentre il rame nei complessi Cu-DOTA e Cu-CB-DO2A subisce una riduzione irreversibile, quello presente nel complesso Cu-CB-TE2A viene invece ridotto in maniera quasi-reversibile. Questo indica che il prodotto di riduzione, il complesso di Cu(I), non demetalla, ovvero il CB-TE2A è in grado di riadattarsi e coordinare efficacemente anche il rame ridotto [Katrina S. Woodin, 2005].

Il CB-TE2A si è anche dimostrato il composto più efficace in grado di diminuire il fenomeno della transchelazione. Studi di metabolismo condotti su fegato di topo hanno mostrato che la maggiore resistenza alla transchelazione da parte del CB-TE2A è maggiormente evidente dopo 20 ore dall'iniezione, in quanto mentre  $^{64}\text{Cu}$ -TETA, a questo punto, è dissociato al 90%, il rame derivante da  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A è legato a proteine (SOD o metallotioneine) solo al  $24 \pm 7\%$  [C. Andrew Boswell, 2003].

Si è cercato anche di comprendere il ruolo che giocano i sostituenti sugli azoti, piuttosto che quello del ponte etilenico, sull'inerzia e la stabilità termodinamica complessiva del chelante. Un recente studio del 2021 [Evan Le Long, 2021] dimostra che i sostituenti sugli azoti sono maggiormente implicati nella stabilizzazione della coordinazione anche del rame (I), mentre l'elevata inerzia cinetica è da attribuire per la maggior parte al ponte etilenico.

Infine, sono stati studiati anche derivati del cyclen e del cyclam aventi un ponte propilenico anziché etilenico (tre atomi di carbonio a collegare i due azoti non vicinali, anziché due); tuttavia, il ponte propilenico non ha dimostrato possedere le stesse proprietà positive del ponte etilenico, in quanto gli studi di biodistribuzione *in vivo* hanno evidenziato una scarsa inerzia cinetica [Antoinette Y. Odendaal, 2011].

Lo svantaggio dei leganti rigidificati è che la velocità di formazione del complesso BFC-metallo in condizioni di *radiolabeling* diminuisce. Ciò rende necessario l'utilizzo di condizioni di complessamento più estreme, quali elevate temperature (intorno ai 90 °C) e tempi di reazione più lunghi. Per tali motivi CB-DO2A e CB-TE2A non sono utilizzabili in radio-coniugati in cui la molecola direzionante voglia essere un anticorpo monoclonale o una proteina.

In generale, si deve anche considerare che tutti i BFC finora menzionati sono ottimamente adatti al legame con ioni metallici di tipo *hard* o *borderline*, cioè coi radiometalli finora usati o proposti per l'utilizzo in radiofarmaci (lantanidi, gallio, indio, rame). Però, lo stesso non può dirsi per ioni metallici *soft*, come  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , e altri; se infatti è vero che al momento non esistono radiofarmaci basati su questi metalli, è anche vero che numerosi radionuclidi di ioni metallici *soft* stanno suscitando un crescente interesse in ambito radiofarmaceutico. Tra questi radionuclidi innovativi vi è l'argento-111 ( $^{111}\text{Ag}$ ) [Marianna Tosato, 2020].

## 1.6 Argento-111 ( $^{111}\text{Ag}$ )

L'argento-111 ( $^{111}\text{Ag}$ ) può essere tradizionalmente prodotto mediante reattore nucleare usando un *target* di palladio arricchito isotopicamente ( $^{110}\text{Pd}$ ) che, irradiato con neutroni, produce  $^{111}\text{Pd}$  che a sua volta decade ad  $^{111}\text{Ag}$ . Tuttavia, si ha anche una reazione collaterale di cattura elettronica che porta alla formazione di  $^{109}\text{Pd}$  che decadendo, produce  $^{109}\text{Ag}$ , isotopo stabile che diminuisce l'attività specifica del radionuclide di interesse. Inoltre, il costo di produzione è molto elevato (in particolare a causa del costo del *target*), e ciò ha di fatto sostanzialmente impedito l'utilizzo del radionuclide a livello biomedico. In particolare, la letteratura mostra solo due applicazioni. Nel 2008  $^{111}\text{Ag}$  è stato proposto nella radio-sinoviectomia per il trattamento dell'artrite reumatoide, mostrando buoni risultati, e altrettanto utile si è dimostrato nel 2015 nello studiare la biodistribuzione di antimicrobici a base di argento.

Il campo terapeutico in cui  $^{111}\text{Ag}$  appare maggiormente promettente è quello oncologico. Esso è un  $\beta^-$  emettitore con un'emivita media (7,45 giorni) e un'energia di 360 KeV che corrisponde ad una penetrazione media nei tessuti (1.8 mm). Il suo decadimento produce anche una co-emissione di raggi  $\gamma$  a bassa energia; questo potrebbe permettere simultaneamente alla terapia, un monitoraggio della dose iniettata tramite SPECT *imaging*. Tale proprietà emissive sono promettenti e rendono  $^{111}\text{Ag}$  un buon candidato per la emergente tecnica della *radionuclide-targeted-therapy*.

Si è calcolato che la facility in costruzione a Legnaro nell'ambito del progetto SPES è in grado di produrre  $^{111}\text{Ag}$  con ottime rese e in forma *carrier-free*. Gli isotopi dell'argento possono infatti essere eliminati durante la separazione di massa, e l'unico contaminante isobarico prodotto dal processo ( $^{111}\text{Cd}$ ) può essere rimosso attraverso metodi chimici di separazione. [Valerio Di Marco, Marianna Tosato, Sonia Nardella et al., 2020]. Al momento attuale, quindi, l'unico ostacolo che si frappone all'impiego di  $^{111}\text{Ag}$  come radiofarmaco è essenzialmente la disponibilità di un BFC in grado di chelare lo ione  $\text{Ag(I)}$ .

### 1.6.1 Chelanti bifunzionali per Argento-111

In letteratura, fino a pochissimi anni fa, non erano descritti dei BFC adatti a scopo radiofarmaceutico per l'argento-111, in quanto appunto si tratta di un radionuclide nuovo. L'unico composto proposto in letteratura è apparso in un articolo piuttosto datato (1997) del professor Mäcke [Gyr, 1997], il quale ha sintetizzato e studiato un derivato del cyclen con quattro catene laterali tioeterree (Figura 1.11), l'1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraetilmetilsolfuro (DO4S). Da questa pubblicazione è emerso come DO4S sia in grado di formare complessi termodinamicamente molto stabili con  $\text{Ag}^+$  in una miscela 1:1 acqua: metanolo; l'analisi strutturale ha evidenziato che solo due dei quattro zolfi presenti nella molecola, e in particolare gli zolfi in posizione "trans", sono coinvolti nella coordinazione del metallo. Il nostro gruppo di ricerca ha ripreso tale composto, affiancando ad esso una serie di altri derivati simili (Figura 1.11), nei quali si è ridotto il numero di atomi di zolfo oppure si è variata la dimensione della catena poliazamacrociclica. Sono state ricavate le costanti termodinamiche di complessamento con  $\text{Ag}^+$  e la geometria dei complessi risultanti in soluzioni completamente acquose [Marianna Tosato, 2020]. Gli studi condotti hanno dimostrato che i complessi sono molto stabili; la stabilità più elevata è stata ottenuta per il composto DO4S4Me, che è un analogo del DO4S nel quale sono stati introdotti quattro gruppi metilici nel *backbone* del cyclen, facendo diventare chirali i carboni a cui sono legati; la stabilità più elevata è attribuibile ad una maggiore rigidità causata dai metili, la quale a sua volta induce una pre-organizzazione delle catene laterali che favorisce il complessamento del metallo; tuttavia, la stabilità dei complessi  $\text{Ag}^+$ -DO4S4Me è solo di poco maggiore rispetto a quella dei complessi con DO4S (circa mezzo ordine di grandezza); questo fatto, unito ad una sintesi che per DO4S è molto semplice (monostadio), mentre per DO4S4Me è estremamente laboriosa (circa 20 passaggi sintetici), ha fatto sì che DO4S venisse considerato il chelante più adatto per  $\text{Ag}^+$ .

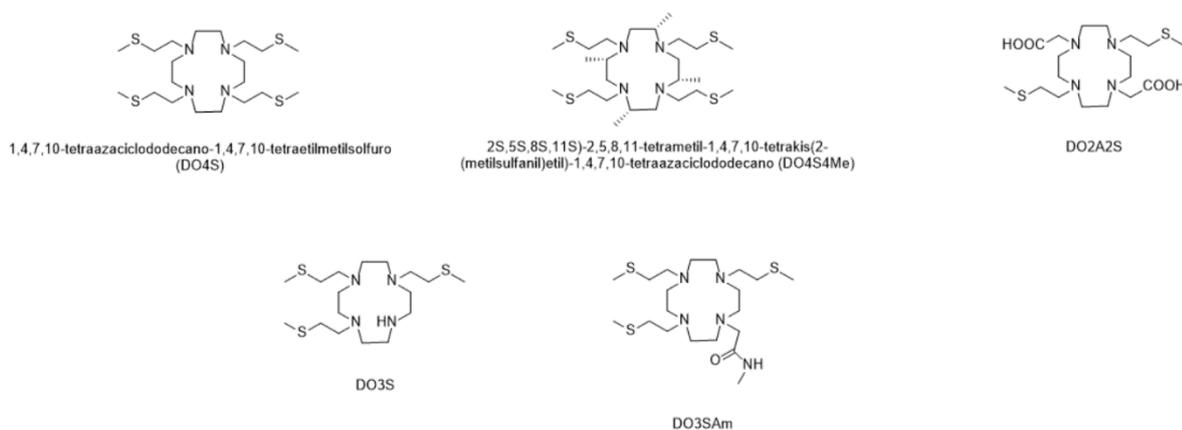


Figura 1.11: strutture dei chelanti bifunzionali per metalli soft fino ad ora considerati.

Sono stati quindi condotti degli studi di radiomarcatura e stabilità in siero dei complessi tra DO4S e  $[\text{Ag}^{111}]\text{Ag}^+$ , dai quali si è evidenziato da un lato che DO4S complessa lo ione metallico in condizioni blande (quantitativamente anche a temperatura ambiente), ma anche che il complesso finale non risulta molto stabile nel sangue: l'emivita sembra essere di poche ore [M. Tosato, V. Di Marco, et al., paper in preparation].

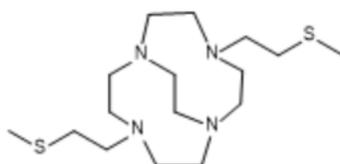
## CAPITOLO 2

### SCOPO

Tra i molti radiometalli che sono in esame per una possibile applicazione in campo terapeutico e/o diagnostico, l'Ag-111 sta suscitando un notevole interesse grazie alle sue favorevoli proprietà di decadimento, che tra l'altro ne possono consentire l'utilizzo anche come radionuclide teranostico.

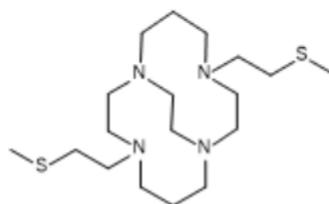
Il chelante che per il momento è risultato migliore, in termini di stabilità termodinamica, nel coordinare  $^{111}\text{Ag(I)}$  è il DO4S descritto nell'introduzione. Tuttavia, nel sangue esso ha dimostrato di possedere un'inerzia cinetica solo modesta che, presumibilmente, non lo rende un chelante ideale per tale radiometallo.

Il presente lavoro di tesi si propone lo scopo di sintetizzare nuovi chelanti in grado di formare con  $\text{Ag}^+$  complessi maggiormente stabili *in vivo* rispetto al DO4S. Le molecole prese qui in esame sono il 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano (CB-DO2S) e il 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (CB-TE2S), e sono mostrate nella Figura 2.1.



4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano

CB-DO2S



4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano

CB-TE2S

Figura 2.1: nuove molecole proposte come chelanti per Ag-111

Queste molecole si differenziano dai chelanti come DO4S in quanto contengono un gruppo etilenico a ponte tra due azoti opposti (CB = *cross-bridged*), e il numero di catene solforate passa da quattro a due.

La proposta di questi chelanti è basata soprattutto su numerosi studi di letteratura condotti sul rame-64, che hanno mostrato come l'introduzione del ponte etilenico sui derivati del cyclen e soprattutto del cyclam diminuisca notevolmente la perdita di radiometallo nel sangue e nei siti *off-target*. In particolare, CB-TE2A è più volte risultato maggiormente efficace rispetto al suo derivato non CB (TETA) nel prevenire il fenomeno della transchelazione e di stabilizzare meglio anche il complesso con il rame(I) (metallo che tra l'altro risulta molto simile per proprietà chimico-fisiche all'argento(I)). Tale effetto è stato attribuito all'aumentata rigidità dei derivati CB rispetto a quelli non-CB, ed è ritenuto essere soprattutto cinetico piuttosto che termodinamico, cioè, l'introduzione del ponte rende i complessi soprattutto più inerti piuttosto che maggiormente stabili.

I composti studiati in letteratura, come il CB-TE2A, non sono chelanti ideali per Ag(I) dato che contengono solo gruppi coordinanti *bordeline* o *hard* come l'azoto e l'ossigeno; per migliorare la prevedibile affinità nei confronti di tale ione metallico, si è considerato di inserire delle catene solforate sugli anelli dei composti in esame, catene che già nel caso di DO4S si sono rivelate fondamentali per migliorare la stabilità dei complessi, ottenendo appunto i due composti mostrati in Figura 2.1.

È possibile che passando da DO4S (quattro catene solforate) a CB-DO2S e CB-TE2S (due catene solforate) possa aversi una certa riduzione della stabilità termodinamica, che tuttavia è attesa essere comunque modesta, poiché gli studi cristallografici condotti sul complesso  $Ag^+$ -DO4S hanno dimostrato che lo ione metallico viene coordinato solo da due catene solforate poste di fronte, non da tutte e quattro; e nei due composti in esame tali catene sono in effetti preservate.

Poiché i composti di Figura 2.1 sono nuovi, non sono disponibili commercialmente, né è nota una procedura per la loro sintesi. Scopo di questo lavoro di tesi è quindi la messa a punto di un metodo di sintesi, e poi l'applicazione di tale metodo per la preparazione di CB-DO2S e CB-TE2S, da poter poi in seguito studiare nelle loro interazioni con  $^{111}Ag(I)$ .

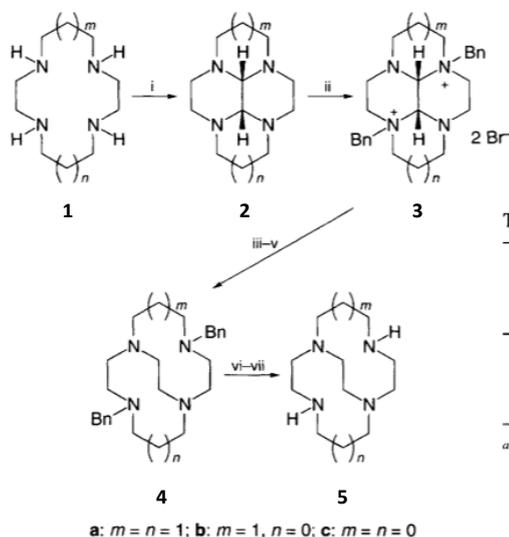
# CAPITOLO 3

## TENTATIVI SINTETICI DEI CHELANTI AZAMACROCICLICI

### 3.1 SINTESI DALLA LETTERATURA

Sebbene la struttura dei leganti CB-D02S e CB-TE2S che ci si proponeva di sintetizzare possa apparire sulla carta relativamente semplice, la loro sintesi presenta diverse difficoltà intrinseche. La prima è più rilevante problema è la necessità di funzionalizzare in modo asimmetrico i gruppi amminici dei composti di partenza, il cyclen ed il cyclam. La seconda è data proprio dall'introduzione del ponte, infatti è ragionevole attendersi che la rigidificazione del legante in una struttura biciclica possa portare a molecole rese meno stabili per l'impossibilità di assumere le conformazioni più stabili.

Data la notevole somiglianza delle molecole desiderate con il CB-DO2A e il CB-TE2A (cfr. Figura 1.9), la prima procedura sintetica esplorata è stata ispirata da protocolli descritti in letteratura per la loro realizzazione. La strategia di sintesi individuata prevedeva quindi di sintetizzare il composto 5 (Figura 3.1) come descritto [Gary R. Weisman, 1996] e successivamente procedere con l'alchilazione dei due azoti rimasti secondari con 2-clorometiletilsolfo (Figura 3.2).



**Scheme 1 Reagents and conditions:** i, 40% aq. glyoxal, MeCN; ii, excess BnBr, MeCN, room temp., 3–21 days; iii, excess NaBH<sub>4</sub>, 95% EtOH, room temp., 4–16 days; iv, 3 mol dm<sup>-3</sup> HCl, then remove EtOH; v, KOH, H<sub>2</sub>O, PhH; vi, H<sub>2</sub> (1 atm.), 10% Pd/C, HOAc, room temp; vii, HOAc removal, then KOH, H<sub>2</sub>O, PhH

**Table 1** Yields of purified products from Scheme 1

		Yields (%)			
<i>m</i>	<i>n</i>	2	3	4	5
a	1	72–93	75–93	83–96	72–96
b	1	33–56 <sup>a</sup>	78–99	64–98	47–70
c	0	63–79	69–96	87–99	50–83

<sup>a</sup> After chromatography.

Figura 3.1: via sintetica riportata in letteratura da Gary R, Wesiman, 1996

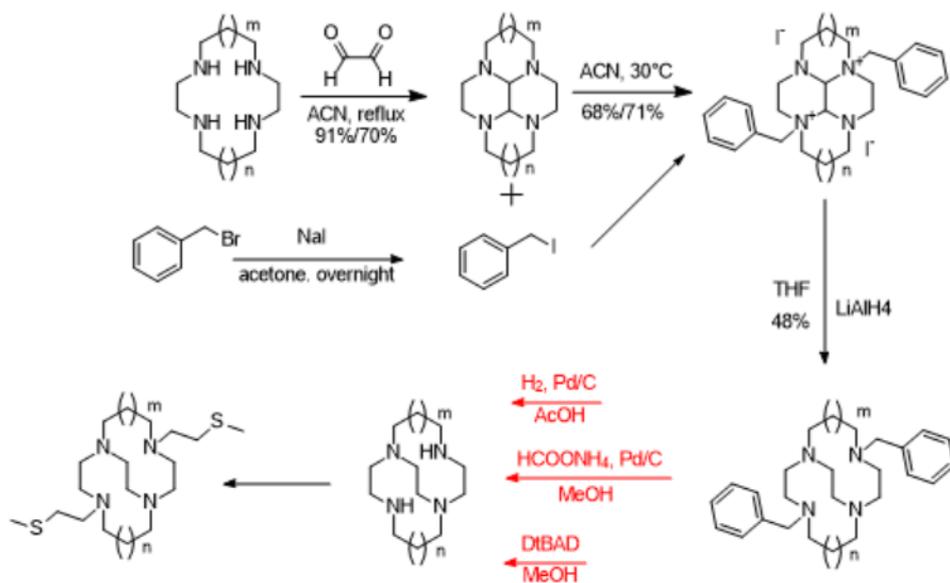


Figura 3.2: via sintetica inizialmente progettata. In rosso vi sono indicate le reazioni tentate ma non riuscite.

Il passaggio prevedeva la condensazione del glicosale con i poliazamacrocicli cyclen e cyclam per dare i composti 2. La reazione è stata eseguita utilizzando le condizioni riportate in letteratura, che prevedevano l'uso di acetonitrile come solvente a temperatura ambiente, ed il prodotto desiderato è stato ottenuto con rese del 91% per  $n,m=0$  e del 70% per  $n,m=1$ .

Per quanto riguarda invece, il secondo passaggio che doveva portare alla di-benzilazione del macrociclo, si è cercato un modo per ridurre i tempi di reazione. Infatti, la procedura descritta in letteratura, che utilizza il benzilbromuro come alchilante, richiede dai tre ai ventuno giorni. Trattandosi di una sostituzione nucleofila (in particolare con meccanismo  $S_N2$ ), il modo più semplice per aumentarne la velocità è sembrato quello di migliorare la natura del gruppo uscente. Si è pensato dunque di operare una sostituzione bromo/iodio nel benzil-bromuro, utilizzando NaI in acetone, in modo da ottenere il benzil-ioduro, circa tre volte più reattivo del primo. Si è fatto poi reagire il benzilioduro con l'azamacrociclo mantenendo inalterate tutte le altre condizioni di reazione (acetonitrile,  $30^\circ\text{C}$ ) ed effettivamente si è osservato un rilevante incremento della velocità di reazione. In particolare, il prodotto 3 è stato ottenuto, per  $m$  e  $n=0$  in una notte, con una resa del 68% mentre per  $m$  e  $n=1$  ci sono voluti 2 giorni, con una resa del 71%.

Il terzo passaggio era una reazione di riduzione del ponte centrale che doveva portare ad un'espansione a sistema biciclico. Di nuovo, in letteratura viene riportata una procedura che richiede dai 4 ai 16 giorni di reazione. Per cercare di accorciare i tempi in questo caso si è provato a non utilizzare il sodio boroidruro, ma bensì il litio alluminio idruro. Entrambi questi composti sono agenti riducenti ed agiscono entrambi "donando" formalmente uno ione idruro, tuttavia il secondo risulta essere un riducente più forte rispetto al boro idruro. La reazione, quindi condotta a temperatura ambiente, in THF (con  $\text{LiAlH}_4$  non si possono utilizzare solventi protici) e sotto azoto, in presenza di un eccesso di  $\text{LiAlH}_4$  porta all'ottenimento del composto 4 in solo una notte. Anche in questo caso, dunque si è riusciti ad ottimizzare i tempi di reazione.

Infine, l'ultimo passaggio prevedeva la debenzilazione per portare all' 1,4,7,10-tetraazabicyclo [5.5.2] tetradecano (cb-cyclen) e all'-1,4,8,11-tetraazabicyclo [6.6.2] esadecano (cb-cyclam). Inizialmente si è seguita la procedura riportata: una classica idrogenazione, operata in acido acetico e con un 10% in peso di palladio su carbone come catalizzatore. Tuttavia, non è stata osservata la formazione del prodotto.

Si sono quindi provate altre due procedure trovate in letteratura per ottenere la scissione dei gruppi benzilici:

- una reazione di idrogenazione per transfer eseguita con ammonio formiato, palladio su carbone 10% in peso, in metanolo, a refluxo e sotto atmosfera di azoto.
- Una reazione che utilizzava il DBAD (di-tert-butyl-azodicarboxylate), passando prima per la formazione di una immina e successiva idrolisi della stessa con rilascio di benzaldeide.

In entrambi i casi però la reazione non ha portato al distacco dei gruppi benzilici.

L'ipotesi è che siano necessarie delle alte pressioni, in questo caso non raggiungibili per la mancanza dell'attrezzatura necessaria.

Si è quindi deciso di modificare la via sintetica.

## 3.2 ALCHILAZIONE DIRETTA DAL COMPOSTO 2

Il punto forte della sintesi presentata in letteratura era la doppia alchilazione selettiva solo negli azoti in "trans" della molecola. Tale selettività sembra essere dovuto alla conformazione che la molecola assume una volta che è stata condensata con il gliossale. Essa, infatti, assume una conformazione *all-chair*  $C_2$ , con i due azoti *exo* omotopici che hanno i doppietti elettronici non condivisi che sporgono verso l'esterno della facciata convessa della molecola, mentre i due azoti *endo* omotopici hanno i doppietti elettronici che sono più stericamente nascosti dentro la facciata concava. [Wong, 2000] Dunque, la prima alchilazione avviene in uno dei due azoti *exo* che sono stericamente più accessibili. A questo punto la conformazione della molecola viene bloccata (prima era possibile un cambio di conformazione che portava allo scambio degli azoti *exo* con quelli *endo*) dalla formazione dell'ammonio quaternario, portando obbligatoriamente la seconda alchilazione ad avvenire sull'altro azoto *exo*, che di nuovo è molto più stericamente accessibile rispetto ai due azoti *endo* rimasti. Inoltre, la doppia alchilazione in *exo*, minimizza la repulsione Coulombiana tra i due gruppi ammonio rispetto all'alchilazione di una posizione *exo* e una *endo*.

### 3.2.1 Alchilazione diretta dal composto 2 con 2-cloro-metiletilsulfuro

Alla luce di tutto questo, una volta fatta la condensazione del macrociclo con il gliossale, si è pensato di andare ad alchilare direttamente i due azoti *exo* con la catena laterale di nostro interesse. La via sintetica così modificata viene riportata nella Figura 3.3 sottostante.

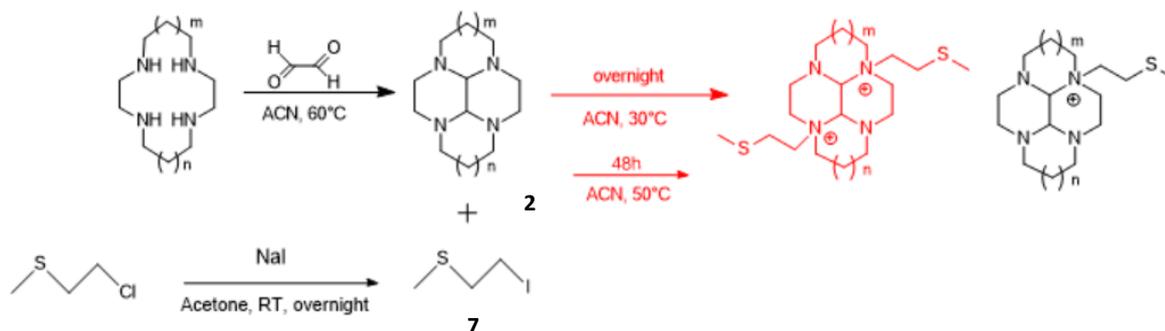


Figura 3.3: Via sintetica modificata al secondo passaggio per tentare una sostituzione diretta con la catena laterale di interesse. In rosso le reazioni provate ma non venute.

Fin da subito si è deciso di rendere più reattivo il 2-clorometiletilsulfuro operando uno scambio cloro-iodio come già descritto (composto 7). Dopo una notte di reazione, si è proceduto aggiungendo il composto 2 sciolto in acetonitrile e si è portata la temperatura a  $30^\circ C$ . Il giorno dopo l'analisi TLC ha rivelato la formazione di un prodotto diverso dal composto 2. Purificando quindi con cromatografia flash si è riusciti ad isolare il prodotto formatosi. Tuttavia, la successiva analisi tramite NMR e massa ha rivelato la formazione del solo composto mono-alchilato.

Si è deciso di ripetere la reazione a temperatura più alta e, una volta aggiunto il composto 2 sciolto in acetonitrile, si è portata la temperatura da  $30$  a  $50^\circ C$ ; inoltre si è allungato il tempo di reazione lasciando reagire la miscela per 48 ore. Nonostante ciò, il risultato dopo una purificazione con cromatografia flash è nuovamente il solo composto mono-coniugato.

A questo punto si sono tentate due diverse strategie:

1. Si è rimesso a reagire il mono-alchilato con un altro equivalente di 2-clorometiletilsolfo, a 60°C
2. Si è ripetuta la reazione utilizzando come solvente DMF e portando la temperatura a 100°C.

Queste due reazioni sono state lasciate a reagire per circa dieci giorni, ma ancora da analisi TLC non sembrava esserci formazione di composto bi-sostituito. Questa volta, l'avanzamento è stato monitorato anche attraverso spettroscopia di massa e, in questo modo è stato possibile notare una cosa interessante. Qui sotto vengono riportati gli spettri di massa, relativi alla miscela di reazione, rispettivamente dopo una notte di reazione, dopo 2 giorni di reazione e dopo 3 giorni di reazione (Figura 3.4).

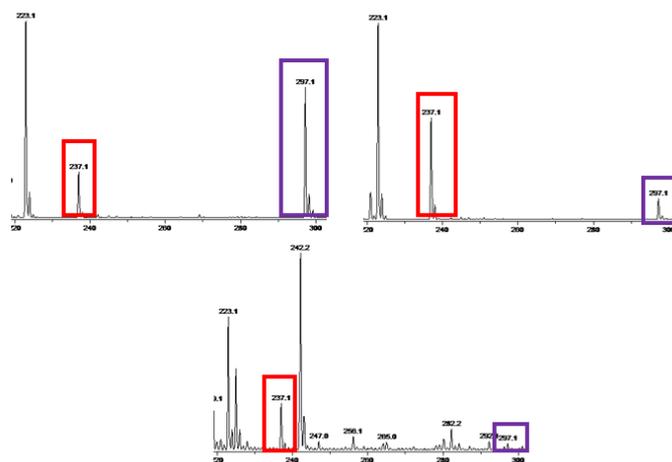


Figura 3.4: spettri di massa della miscela di reazione, dopo 1 giorno (sx), dopo 2 giorni (dx), dopo 3 giorni (basso). In rosso è riquadrato il picco di quello che si pensa essere il composto 8, in viola il picco relativo al composto mono-coniugato.

Dopo la prima notte si possono vedere principalmente due segnali:  $m/z=223$  relativo al composto 2 e  $m/z=269$ , relativo al composto mono-sostituito. Più basso vi è un picco con  $m/z$  di 237, che inizialmente si pensava essere un'impurezza. Il giorno dopo però, eseguendo sempre la stessa analisi, si è potuto notare che il picco del composto 2 (che in questa reazione è quindi il precursore) rimane circa invariato, mentre l'intensità del mono-alchilato e di quello a  $m/z$  di 237 si sono invertite, diventando così prevalente il secondo. Al terzo giorno il picco del mono alchilato è praticamente sparito. Un'analisi più dettagliata ha rivelato che il composto con  $m/z$  di 237 è 8, cioè il composto 2 metilato su uno degli azoti.

Da questa analisi abbiamo dunque potuto ipotizzare che la reazione di alchilazione con 2-alometil-etilsolfuri è una reazione all'equilibrio: infatti l'azoto che diventa carico positivamente, in seguito all'alchilazione, è anch'esso un buon gruppo uscente (si pensi alla reazione di eliminazione di Hoffman). Ecco quindi che, con lo stesso meccanismo con cui si è attaccata, che prevede l'assistenza anchimerica dell'atomo di zolfo e la formazione di un intermedio solforano ciclico, la catena laterale può anche tornare in soluzione. A questo punto un altro azoto può non solo attaccare il carbonio in posizione 2 e portare quindi alla solita alchilazione, ma può anche attaccare il metile, formando in questo modo il composto metilato su un azoto, visto alla massa con  $m/z$  di 237 e la cui formazione è irreversibile, e non la molecola di-sostituita di interesse (Figura 3.5).

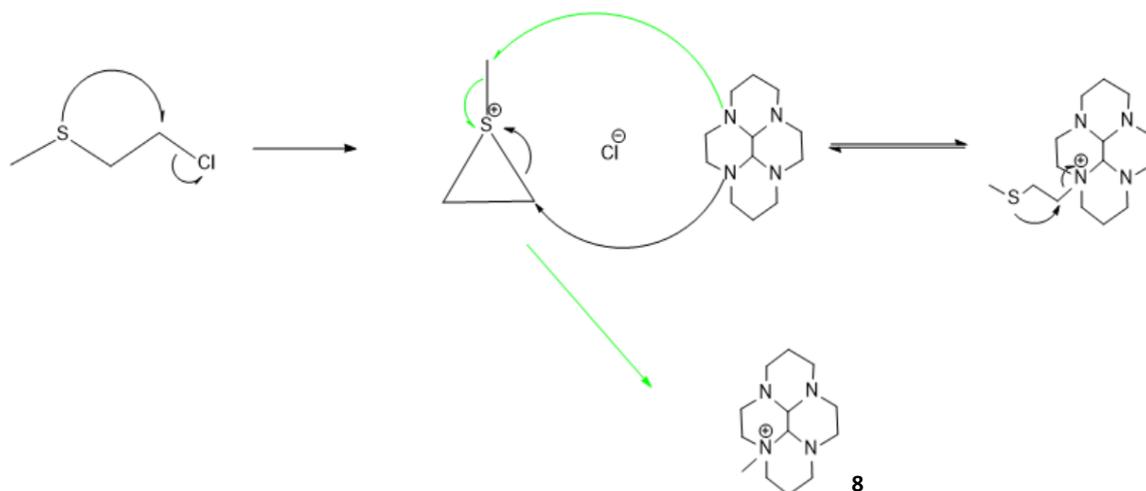


Figura 3.5: In nero è riportato il classico meccanismo di attacco da parte del 2-clorometiletilsulfuro. In verde è rappresentato il meccanismo alternativo da noi ipotizzato che porta alla formazione del composto 8.

Si tratta comunque solo di un'ipotesi: infatti a parte ciò che si è visto alla massa, il composto 8 non è mai stato isolato e purificato. È però vero che, cercando in letteratura, si è trovato un articolo in cui utilizzando lo ioduro di S-metilanio (un ciclo a sei con uno zolfo a cui è legato un metile) per una reazione di sostituzione nucleofila del tipo SN2 (Figura 3.6), più dell'80% del prodotto ottenuto è quello derivante dall'attacco del metile alla molecola nucleofila, proprio come si è visto per il nostro composto 8 [Ernest L. Eliel, 1975].

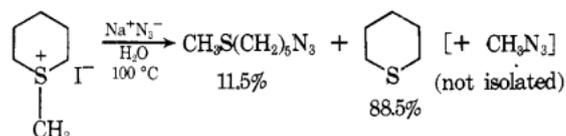


Figura 3.6: figura tratta da Ernest L. Eliel, 1975

In ogni caso risulta chiaro che un'alchilazione diretta con la catena laterale di interesse non è realizzabile: la poca reattività della molecola richiederebbe tempi di reazione lunghi ed alte temperature, tuttavia, in queste condizioni il 2-iodometiletilsulfuro genera una miscela di prodotti e non quello di interesse.

### 3.2.2 Alchilazione diretta dal composto 2 con 1,2-dibromoetano

Si è quindi optato per provare ad alchilare, inizialmente, il composto 2 con 1,2-dibromoetano e successivamente si sarebbe potuto convertire il bromuro rimasto libero nel metil sulfuro. La via sintetica sarebbe dunque diventata come riportato in Figura 3.7.

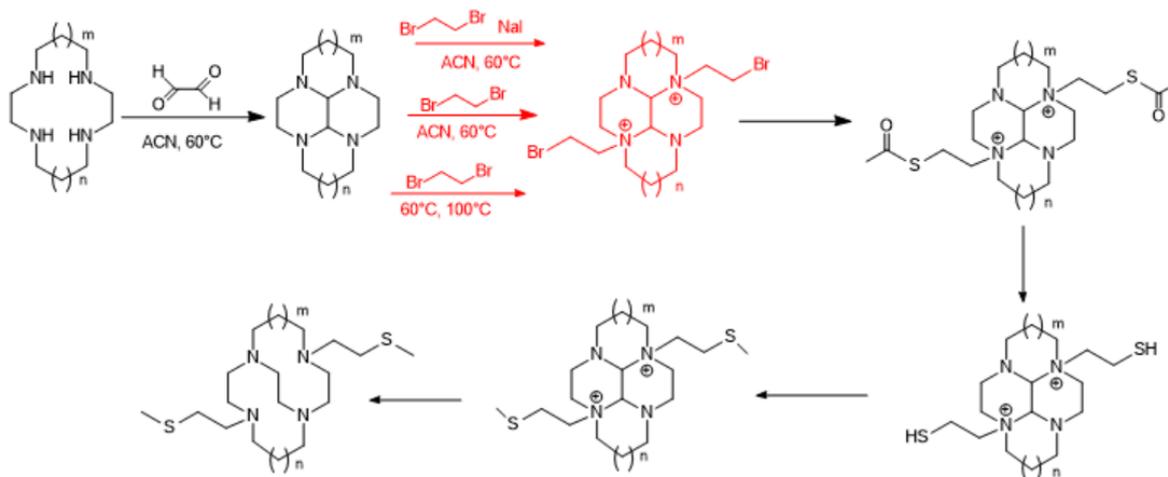


Figura 3.7: via sintetica progettata, con l'utilizzo, come catena alchilante, il dibromoetano. In rosso le reazioni provate e non riuscite.

Un accorgimento da adottare in questa procedura è di introdurre un largo eccesso di dibromoetano nella miscela di reazione, altrimenti, essendo il dibromoetano una molecola bifunzionale, potrebbe andare ad alchilare due molecole 2 diverse contemporaneamente formando un dimero.

Anche per questa via sintetica sono state provate diverse condizioni di reazione: inizialmente, sono state semplicemente miscelate le due molecole in acetonitrile e la soluzione così formata è stata posta in una vial chiusa, scaldata a 60°C finché non si è notata, dopo circa due settimane, la comparsa di un precipitato lungo le pareti (la molecola che si viene a formare possiede due cariche positive, quindi è verosimile che in un solvente polare aprotico precipiti). Analizzando però il precipitato non è risultato essere il composto di interesse, ma una miscela di più prodotti.

Successivamente è stato provato ad aggiungere un equivalente di sodio ioduro che potesse andare a catalizzare la sostituzione, mantenendo inalterate le altre condizioni di reazione. In questo modo si sperava che diminuendo i tempi necessari alla doppia alchilazione (dato che lo iodoetano è più reattivo) si sarebbero ottenuti meno sottoprodotti. Anche questo però alla fine ha portato ad una miscela non separabile.

Infine, si è fatto un ultimo tentativo sciogliendo/disperdendo il composto 2 nel dibromoetano, senza solvente. La miscela così composta è stata poi scaldata, prima a 60°C e poi a 100°C. Ma ancora una volta, l'analisi di massa ha mostrato la formazione di molti polimeri (dimeri, trimeri... mostrati in figura 3.8) della molecola 2 unite tra loro da due metilene (derivanti dal dibromoetano). Si è anche cercato di separare i vari composti e vedere, se almeno in piccola quantità si fosse formato il prodotto di interesse. Come detto prima però non appena avviene una sostituzione su uno degli azoti quest'ultimo diventa quaternario dunque porta una carica positiva stabile. Ciò significa che tutte le specie che si formano sono almeno monocariche. Questo non le rende adatte ad una separazione in colonna su silice perché tutte vi rimarrebbero attaccate. Si è perciò provato con una fase stazionaria C18 a fase inversa, tuttavia anche in questo caso non si è ottenuta la separazione sperata.

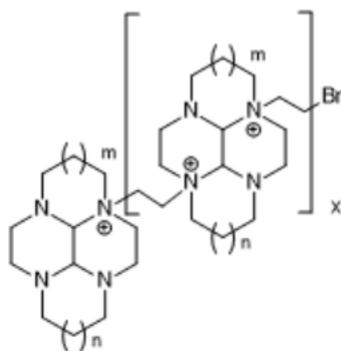


Figura 3.8: struttura dei possibili polimeri che si formano dalla reazione.

Anche questa via sintetica dunque è stata abbandonata, sia di nuovo per la poca reattività della molecola verso la doppia sostituzione sia perché, essendo il secondo reagente bifunzionale, in questo caso si ottenevano sempre delle miscele di polimeri variamente disperse, non separabili.

### 3.2.3 Alchilazione diretta dal composto 2 con etil-2-iodoacetato

Un ultimo tentativo di bi-sostituzione diretta è stato fatto usando come agente alchilante l'etil-2-iodoacetato. È stata selezionata questa molecola essenzialmente per due motivi: innanzitutto è monofunzionale, ovvero solo il carbonio legato allo iodio è in grado di dare una sostituzione nucleofila, superando così il problema della formazione di polimeri; in secondo luogo, gli alfa-alogeno carbonili sono più reattivi degli alchilalogenuri e hanno una reattività simile a quella degli alogenuri benzilici. Una volta che si sarà legato al composto 2, il gruppo estereo rimasto libero potrà essere convertito in alchene (gruppo funzionale utilizzabile per la coniugazione del metil-solfuro).

Tuttavia, ancora una volta gli spettri fatti all'NMR del composto purificato non confermano l'ottenimento del prodotto di interesse.

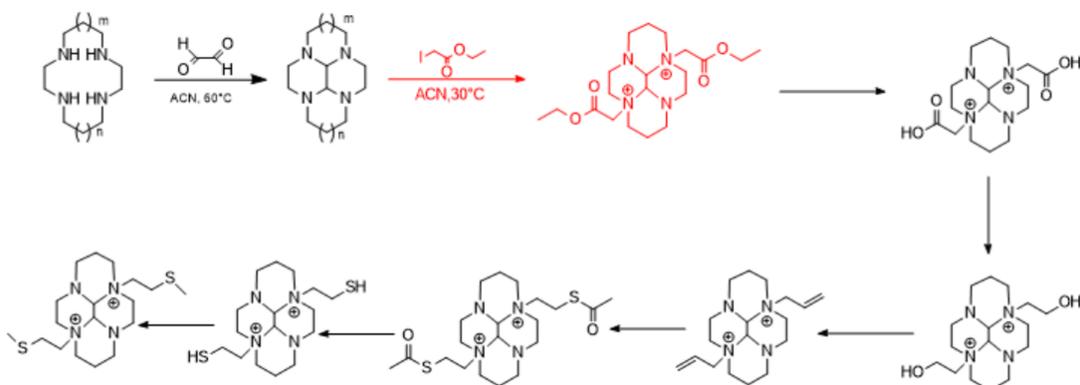


Figura 3.9: via sintetica alternativa alchilando con etil-2-bromoacetato. In rosso le reazioni provate ma non venute.

Si è perciò concluso che la via della di-sostituzione diretta fosse impraticabile per via della poca reattività del macrociclo, una volta che è stato condensato con il glicosale.



acetato per eliminare le impurezze (essendo protonato, il composto finale di interesse rimane in fase acquosa). Si è poi riportato a pH basico tramite aggiunta di bicarbonato di sodio e NaOH 3M, a cui è seguita una seconda estrazione con etile acetato in cui questa volta, riportato in forma di base libera, il composto di interesse si dovrebbe ripartire preferenzialmente.

- Nel secondo caso, dopo aver portato il pH a 1 e aver fatto la prima estrazione per togliere tutte le impurezze, si è direttamente evaporato il solvente all'evaporatore rotante.

Gli spettri NMR dei composti finali, così purificati, non mostrano in nessuno dei due casi l'ottenimento del prodotto di interesse. Tuttavia, con il secondo work up si possono notare molti più segnali, indice di una frammentazione della molecola. Si può quindi supporre che condizioni eccessivamente acide portino all'idrolisi della stessa.

Pensando potesse essere un problema legato alla natura della catena laterale, si sono ritestate tutte le procedure sopra riportate, utilizzando 1,2-dibromoetano come agente alchilante nell'ultimo passaggio.

Ancora una volta però gli spettri NMR non hanno mostrato l'ottenimento del prodotto di interesse e l'analisi di massa dei composti finali evidenziano nuovamente la formazione di polimeri.

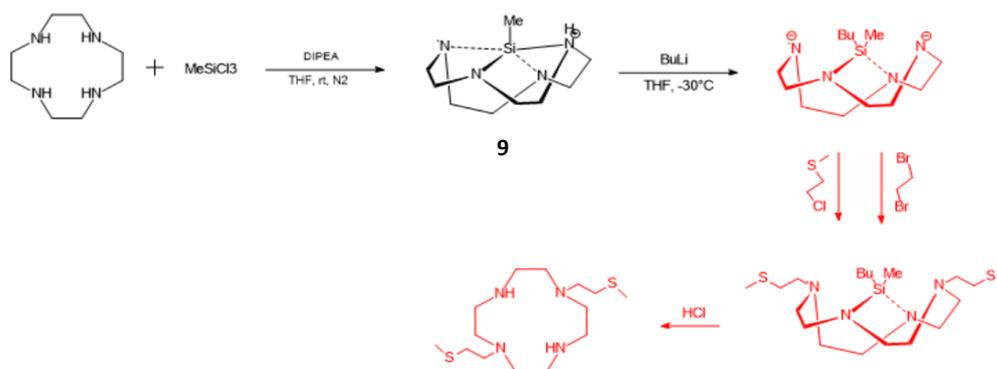


Figura 3.11: via sintetica progettata con il metil-tricloro-silano. In rosso le reazioni tentate e non riuscite.

Per cercare di capire se fosse effettivamente un problema del sostituente o se ci fossero già prima dei passaggi che non portano all'intermedio atteso, si è ripetuta la procedura e si sono controllati gli spettri di ogni molecola formata, inclusi intermedi di reazione precedentemente non isolati.

Già il complesso con il silicio (9) non mostra i segnali all'NMR attesi e riportati nell'articolo. In questo caso c'è però da dire che la solubilità di tale intermedio è molto bassa, tanto che alla fine per poter effettuare l'analisi si è deciso di scioglierne una piccola quantità in DMSO; quello che si è potuto notare è che, sebbene il precipitato venga lavato più volte con THF, rimane ancora della DIPEA, usata come base nella reazione. Non vedendo però possibile la precipitazione di nessun'altra molecola al di fuori di quella di interesse, si è deciso comunque di proseguire aggiungendo un eccesso di butillitio. Anche con questo accorgimento, tuttavia, al passaggio successivo non si è ottenuto né lo spettro NMR atteso né la massa attesa all'analisi ESI.

Si è quindi così deciso di abbandonare anche questa via sintetica.

### 3.3.2 Formazione di un ponte meno rigido

Un'altra idea è stata quella di cercare di formare un ponte intramolecolare che rigidificasse meno la struttura della molecola rispetto a quello ottenuto con il glicosale, preservando però la formazione di un ammonio quaternario al momento dell'alchilazione con la catena laterale che garantisca la regioselettività desiderata. In letteratura è stata trovata descrizione della formazione del ponte non completo mostrato in Figura 3.12: partendo da una soluzione acquosa di cyclam vengono aggiunti 2 equivalenti di paraformaldeide. Dopo pochi minuti, si ha la precipitazione del prodotto con una resa del 71%. Una volta quindi ottenuta la molecola 10 (correttamente identificata anche dagli spettri NMR) si è proceduto all'alchilazione diretta con l'1,2-dibromoetano. Tuttavia, ancora una volta, sebbene sia stata lasciata a reagire a caldo (60°C) per diverso tempo non si è ottenuto il prodotto di-sostituito desiderato.

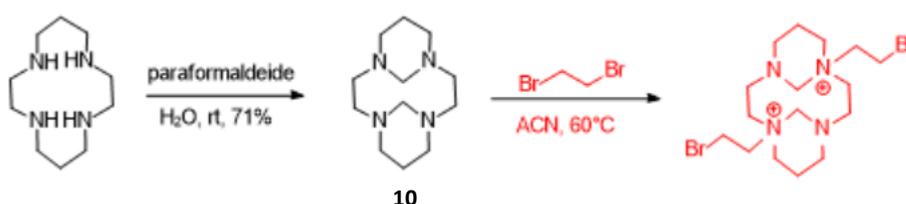


Figura 3.12: formazione di un ponte meno rigidificante e tentativo di successiva alchilazione. In rosso la reazione provata ma non riuscita.

Prima di abbandonare questa via sintetica si è pensato di seguire esattamente quanto riportato in letteratura e di alchilare con la catena di interesse solo alla fine, una volta che il ponte di interesse fosse già stato formato (Figura 3.13).

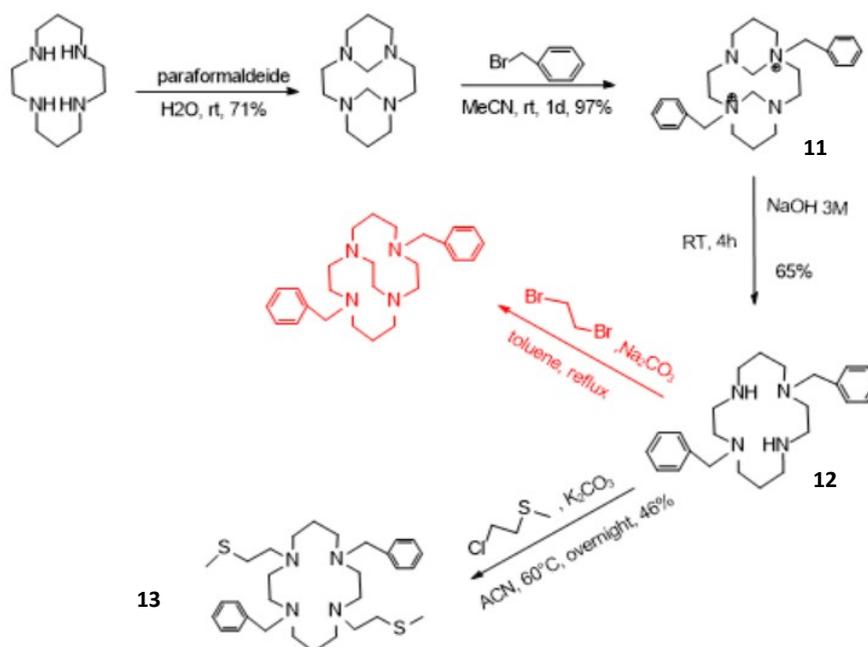


Figura 3.13: nuova via sintetica progettata a partire da quella riportata dal Brevetto EP 2 476 683 A2

Dalla molecola 10 quindi si è proceduto con la sostituzione nucleofila usando benzilbromuro, in acetonitrile. Il prodotto 11 precipita e dopo estrazioni con ACN la resa si attesta al 97%. L'idrolisi dei ponti è stata eseguita in NaOH 3M, con una resa del 65%. Sia la molecola 11 che la molecola 12 sono state caratterizzate con spettri NMR che ne hanno confermato la correttezza e la purezza. A questo punto si sono tentate due strade in parallelo: nella prima, seguendo ancora la letteratura, si è cercato di formare il ponte intramolecolare utilizzando però anziché l'1,3-propandiolo-di-p-tosilato, l'1,2-dibromoetano; come seconda possibilità si è pensato invece di operare, a questo livello, la sostituzione con le due catene laterali, nei due azoti opposti ancora secondari.

La prima strada, sebbene siano state utilizzate le stesse condizioni riportate nell'articolo (toluene a riflusso, in eccesso di 1,2-dibromoetano e in condizioni diluite per 6 giorni), ha portato ad una miscela di prodotti (polimeri, prodotto monosostituito...) che non è stato possibile purificare (sono state effettuate due purificazioni mediante cromatografia su colonne flash senza però ottenere il composto puro).

La seconda strada invece, ha portato all'ottenimento della molecola 13, operando la reazione in acetonitrile, a 60°C, con eccesso di carbonato di potassio e tre equivalenti di catena laterale per una notte. Dopo una colonna cromatografica flash il prodotto 13 è stato ottenuto con una resa del 46%. Questo risultato è molto rilevante perché va a confermare l'ipotesi, formulata in precedenza, che la condensazione con il glicosale porti ad una drastica riduzione della reattività dell'azamacrociclo nei confronti della bisostituzione.

A questo punto, il passaggio successivo era la debenzilazione. In questo caso dato che il macrociclo non era stato ancora condensato con glicosale, e quindi non presentava una struttura policiclica, ci si aspettava che la reazione procedesse abbastanza velocemente e senza la formazione di sottoprodotti. Come primo tentativo si è provato a riprendere la procedura proposta da Gary R. Weisman (vista all'inizio). Dopo un giorno, da analisi TLC la reazione sembrava quasi a completezza, si è quindi deciso di purificarla e analizzare all'NMR. Questa analisi ha evidenziato che la reazione non era andata a completezza e la miscela è stata quindi rimessa a reagire nelle stesse condizioni. Controllando l'avanzamento della reazione dopo il week end, tramite analisi TLC, si è vista la comparsa di altre macchie, indice che si stavano formando diversi sottoprodotti. È stata dunque subito fermata, purificata ed analizzata: lo spettro NMR mostrava tanti segnali diversi che non è stato possibile associare a precise specie molecolari. Questo risultato non soddisfacente molto probabilmente è dovuto a due fattori: il primo è che lo zolfo può aver complessato il palladio e quindi oltre a produrre specie di non interesse (poi diventa difficile staccarlo) avvelena il catalizzatore e non permette alla reazione di procedere. In più il solvente utilizzato, come riportato nell'articolo, è acido acetico che protona gli azoti del macrociclo (di solito invece le idrogenazioni vengono condotte in metanolo o in THF e si aggiungono solo poche gocce di acido per favorirne l'avanzamento); così nuovamente si può favorire la degradazione della catena laterale, già mostrata prima in Figura 3.5.

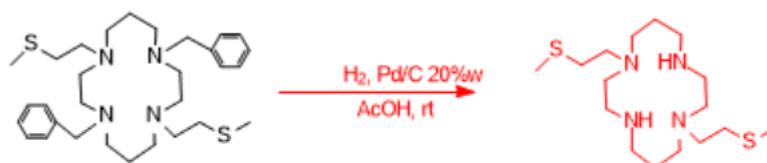


Figura 3.14: primo tentativo di debenzilazione, seguendo la procedura riportata da Gary R. Weisman.

Un altro tentativo di debenzilazione è stato fatto per transfer: si è utilizzato l'ammonio formiato come molecola donatrice di idrogeno, come solvente questa volta è stato preferito il metanolo, e si è portato ad un 50% in peso la quantità di palladio su carbone utilizzata, in modo che se anche in parte viene avvelenato, ce ne sia altro sufficiente alla prosecuzione della reazione.

Anche in questo caso però dopo un giorno di reazione, in analisi TLC compaiono diverse macchie e dopo la purificazione, il colore rossiccio che la soluzione assume suggerisce la complessazione del palladio da parte delle catene laterali.

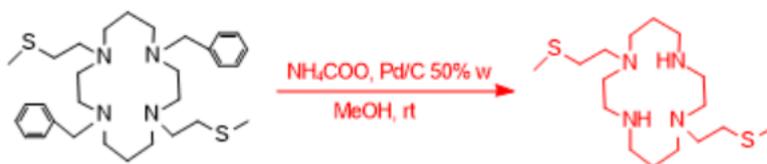


Figura 3.15: secondo tentativo di debenzilazione per transfer di idrogeno.

È stata quindi scartata anche questa via sintetica.

### 3.4 UTILIZZO DI ALTRI GRUPPI PROTETTORI

La successiva proposta sintetica è stata fatta sulla base di alcune osservazioni scaturite dalle ultime reazioni provate: innanzitutto pare che l'alchilazione del macrociclo, in seguito alla protezione degli altri due azoti, avvenga con una buona resa e in tempi accettabili; il gruppo benzilico, sebbene sia un buon gruppo protettore, su questo tipo di molecole non risulta rimuovibile, se non probabilmente ad alte pressioni di idrogeno; infine, anche se l'introduzione del ponte centrale una volta che due azoti opposti sono sostituiti non fosse andata a buon fine, vi sarebbe la possibilità di riprovare questa reazione utilizzando il glicosale invece dell'1,2-dibromoetano.

Alla luce di queste considerazioni è sembrata una buona idea quella di proteggere due degli azoti con un altro gruppo funzionale che poi, una volta alchilate le altre due posizioni con la catena laterale di interesse, potesse essere più facilmente rimosso. Una volta arrivati alla formazione del composto 16 si procederà con la condensazione con il glicosale ed infine alla riduzione dell'immina che si viene a formare.

I gruppi protettori che si è pensato di utilizzare sono: lo Fmoc e il Boc. In entrambi i casi, tuttavia, essi non possono essere inseriti successivamente alla condensazione con il glicosale o nella molecola 10 perché si verrebbero a formare carbammati carichi positivamente all'azoto probabilmente instabili. Risulta quindi necessario trovare un altro modo per proteggere selettivamente i due azoti in posizioni opposte della molecola. Cercando in letteratura, si è trovato un articolo che riporta una procedura molto semplice per la formazione di specie di-protette esclusivamente nelle posizioni N1 ed N7, del cyclen in particolare (la via sintetica viene mostrata in Figura 3.16). Alla base di questa proposta vi sta l'osservazione ai raggi X della struttura cristallografica del cyclen: esso assume una conformazione quadrangolare con gli atomi di carbonio agli angoli, in più gli idrogeni legati agli azoti N1 e N7 puntano verso il centro del ciclo, mentre quelli legati a N4 e N10 puntano verso l'esterno. Da questo si capisce dunque che il doppietto elettronico non condiviso degli azoti 1 e 7 è liberamente disponibile per la diprotezione, mentre quelli in 4 e 10 lo sono molto meno. La reazione viene effettuata in un solvente apolare senza aggiunta di base, il cyclen diprotetto dovrebbe precipitare sotto forma di sale cloruro. Sostanzialmente è lo stesso prodotto di-protetto che funge da base nella miscela di reazione, precipitando e sottraendosi quindi alla possibilità di ulteriori sostituzioni [Luis M. De Leon-Rodriguez, 2006].

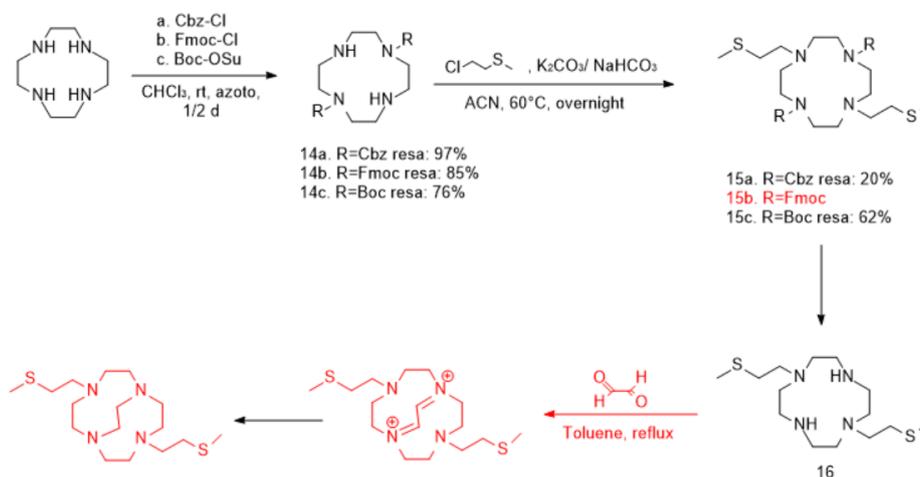


Figura 3.16: nuova via sintetica progettata usando diversi gruppi protettori. In rosso le reazioni provate e non riuscite.

### 3.4.1 Utilizzo del benzilcloroformiato come gruppo protettore

Per verificare queste ipotesi, dunque, è stato fatto reagire un equivalente di cyclen con due equivalenti di benzilcloroformiato (Cbz-Cl) in cloroformio. Il gruppo protettore in particolare è stato aggiunto goccia a goccia in bagno di ghiaccio. Si nota quasi fin da subito la formazione di un precipitato fine bianco. L'analisi all'NMR conferma la formazione della specie di-sostituita con ancora qualche traccia di cyclen non reagito. Senza purificare, si è deciso di passare all'alchilazione dei due azoti rimasti liberi con il 2-cloro-etilmetilsulfuro. Dopo una colonna cromatografica flash si è ottenuto la molecola 15a pura.

Il passaggio successivo prevede la deprotezione dei Cbz. Anche per questo gruppo protettore generalmente per essere rimosso viene utilizzata una reazione di idrogenazione. Si sperava che in questo caso, formandosi oltre al toluene,  $\text{CO}_2$  che chiaramente si sottrae dall'equilibrio essendo un gas, la reazione potesse procedere più velocemente, e quindi diminuendo i tempi di reazione la complessazione del palladio non avvenisse. Così però non è stato, la deprotezione non è andata a completezza e si è avuta la formazione di sottoprodotti. Sono state provate altre metodiche per portare al loro distacco quali: l'utilizzo di sodio boridruro, di litio alluminioidruro, l'utilizzo di nichel cloruro esaidrato, (queste reazioni sempre in presenza di palladio su carbone come catalizzatore al 10% in massa), l'idrogenazione usando però come solvente THF e non metanolo e una alcolisi con sodio metossido. In nessuno di questi casi si è però arrivati alla formazione della molecola 16 pura.



Figura 3.14: reazioni di deprotezione tentate, ma non riuscite, sulla molecola 15a.

### 3.4.2 Utilizzo dello Fmoc come gruppo protettore

Quindi, verificato che comunque la procedura di protezione selettiva nelle posizioni 1 e 7 è efficace, si è scartato il Cbz come gruppo protettore e si è invece provato ad utilizzare lo Fmoc-cloruro.

Di nuovo aggiungendo il gruppo protettore goccia a goccia in bagno di ghiaccio ad una soluzione di cyclen in cloroformio, e lasciando la reazione overnight a temperatura ambiente, si è ottenuto il di-Fmoc-cyclen (molecola 15b). Analisi NMR e di massa ne confermano la correttezza e la purezza.

Il passaggio successivo che prevede appunto l'alchilazione con la catena laterale di interesse è sempre stato condotto in acetonitrile a 60°C in presenza di un eccesso di carbonato di potassio. In queste condizioni lo Fmoc potrebbe essere labile, ma alte temperature e presenza di base non possono essere evitate perché necessarie per la reazione di sostituzione. Cercando dunque un compromesso si è mantenuta la temperatura a 60°C, si sono ridotti gli equivalenti (quasi stechiometrici) di base e anziché il carbonato di potassio si è utilizzato il bicarbonato di sodio. Tuttavia, anche in queste condizioni più blande si è osservato il distacco dei gruppi protettori portando ad una miscela di sottoprodotti variamente alchilati a livello degli azoti. Si è quindi dovuto scartare anche questo gruppo protettore.

### 3.4.3 Utilizzo del Boc come gruppo protettore

Un altro gruppo classicamente utilizzato per la protezione delle ammine e che rimaneva da testare era il Boc (tert-butilossicarbonile). In questo caso però non è disponibile commercialmente il Boc-cloruro in quanto molto instabile, e la scelta è quindi ricaduta sul Boc-OSu. L'utilizzo, prescritto in letteratura di cloruri o esteri del N-idrossisuccinimide per l'introduzione dei carbammati è giustificata con la necessità che il gruppo uscente nel gruppo protettore sia una base più debole rispetto ai due azoti rimasti liberi nel cyclen, in modo che siano essi a fungere da base e a far precipitare il prodotto diprotetto, sottraendolo all'equilibrio.

La reazione è stata quindi condotta con due equivalenti di Boc-OSu, in metanolo, a temperatura ambiente, sotto atmosfera d'azoto per 48 ore. Dopo una colonna cromatografica flash è stato possibile ottenere il di-boc-cyclen puro. Con le solite condizioni di reazione (acetonitrile, carbonato di potassio e 2 cloro-etilmetilsulfuro, a 60°C, overnight) si è proceduto all'alchilazione dei due azoti rimasti liberi e anche la molecola 15c dopo una purificazione tramite colonna è stata ottenuta pura. La deprotezione dei Boc solitamente viene condotta in ambiente acido, si è quindi testata la deprotezione in una soluzione 1M HCl in metanolo a temperatura ambiente per due giorni (si è preferito non esagerare con la quantità di acido né con la durata della reazione visti i precedenti problemi avuti con la catena laterale in queste condizioni). Non essendo andata a completezza si è resa necessaria una purificazione tramite colonna cromatografica per isolare il composto dalla molecola che ancora è protetta da un boc. Arrivati alla molecola 16 non rimane che inserire il ponte centrale: in toluene, all'1,7-dietilmetilsulfuro-cyclen (16), sono stati aggiunti 1,2 equivalenti di gliossale e la miscela è stata poi portata a riflusso per due giorni. Siccome la condensazione, monitorando all'NMR, non sembrava procedere molto, si è deciso di aggiungere sodio triacetossiboroidruido in modo da ridurre la poca immina che si era formata e indurre l'ulteriore formazione. Ancora una volta però non si è ottenuto il risultato sperato e la reazione è stata abbandonata. Sul fondo del pallone in cui è stata condotta la reazione, si vede la formazione di un precipitato molto scuro quasi nero. Sono state formulate due ipotesi sull'identità di questo precipitato: la prima è che qualora la condensazione intramolecolare del gliossale con due azoti della stessa molecola fosse molto sfavorita stericamente, la reazione potrebbe avvenire intermolecolarmente portando alla formazione di polimeri che precipitano; la seconda è che, non procedendo la reazione di formazione del ponte, si formino polimeri di gliossale che precipitano e degradano a causa del riscaldamento.

### 3.5 VIA SINTETICA PARTENDO DA TACN E ACIDO IMMINODIACETICO

Riprendendo il disegno retrosintetico si è provato a non disconnettere la molecola, come fatto finora, a livello della catena e del ponte intramolecolare, ma a farlo a livello del ciclo, in particolare nel cyclen, come mostrato in Figura 3.18.

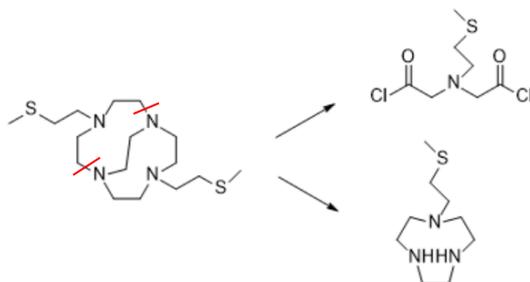


Figura 3.15: nuovo disegno retrosintetico con diverse disconnessioni.

Il *coupling* di due molecole molto simili a quelle di interesse è stato trovato in letteratura [Yuji Miyahara, 1999] e viene riportato in Figura 3.19.

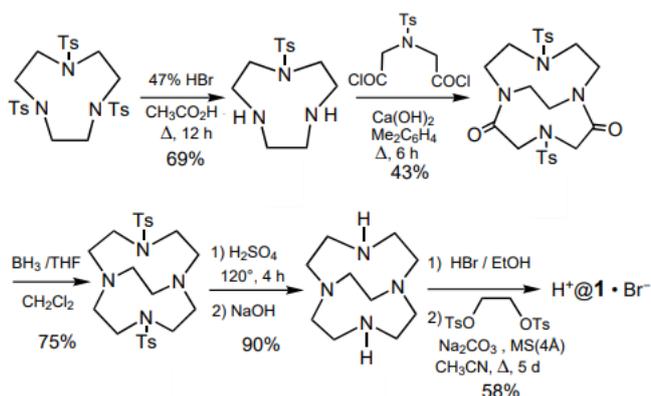


Figura 3.19: sintesi presa da Yuji Miyahara, 1999.

La via sintetica dunque progettata viene mostrata di seguito:

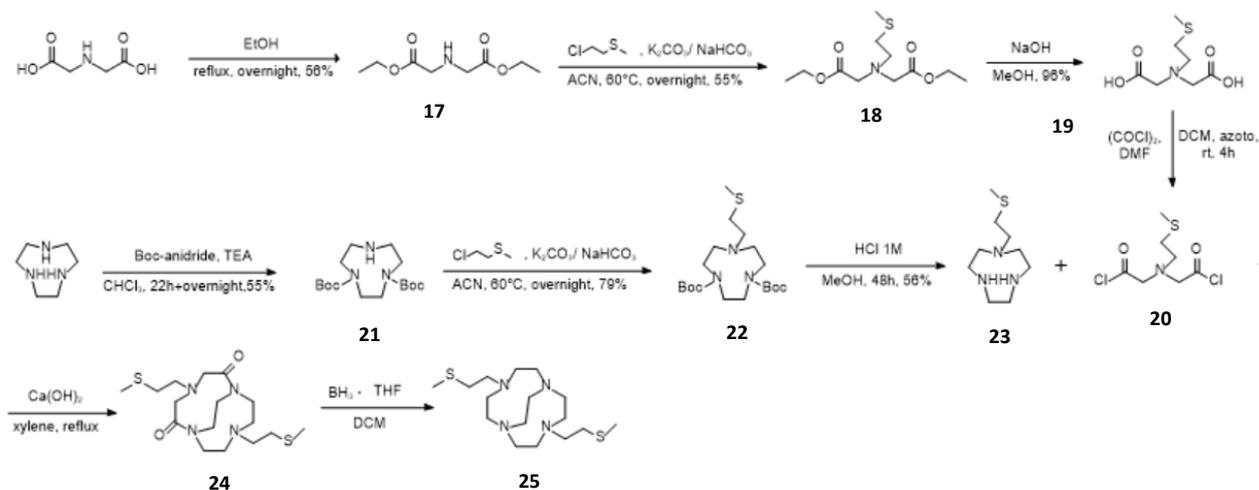


Figura 3.20: nuova via sintetica progettata partendo da TACN e acido iminodiacetico.

Essa appare subito essere un percorso lungo, tuttavia tutti i passaggi, escluso il penultimo di *coupling*, sembrano essere delle reazioni di pratica comune e quindi prive di particolari complicazioni.

Per la formazione della molecola 23 si parte dunque dal prodotto disponibile commercialmente che è il TACN (1,4,7-triazonano). La prima reazione da condurre è una diprotezione di due azoti del ciclo utilizzando la Boc-anidride. La procedura che è stata seguita per questo passaggio è stata messa a punto e ottimizzata nel laboratorio presso cui ho svolto il mio internato di tesi e prevede la lenta aggiunta (tramite syringe pump) di due equivalenti di Boc-anidride ad una soluzione di TACN in  $\text{CHCl}_3$  e TEA. Finita l'aggiunta, si lascia a reagire per una notte e il giorno seguente si purifica, tramite cromatografia flash, il di-boc-TACN dalle tracce di mono e tri-Boc formatesi. La resa è del 55%. Si procede poi con l'alchilazione dell'azoto rimasto libero con 2-cloroetilmetilsulfuro attraverso la procedura ormai nota, vista nelle precedenti vie sintetiche, ottenendo dopo la purificazione, 390mg di prodotto per una resa del 79%. Infine, si procede con la rimozione dei gruppi protettori utilizzando le stesse condizioni viste per l'ottenimento della molecola 16. In questo caso la resa si attesta intorno al 56%, decisamente più bassa rispetto alla precedente; questo perché non solo la reazione non è andata a completezza, ma anche la successiva purificazione in colonna cromatografica flash non avviene così efficientemente (si hanno molte frazioni in cui il composto completamente deprotetto e quello in cui rimane un boc co-eluiscono) come succedeva per la molecola 16. Si ottengono comunque 50mg di prodotto, sufficienti per una prima prova.

Per quanto riguarda invece il secondo frammento, esso viene sintetizzato a partire dall'acido imminodiacetico disponibile commercialmente. La prima reazione è una classica esterificazione di Fisher per proteggere la funzione carbossilica nella successiva reazione di sostituzione nucleofila. È stata condotta in etanolo, a riflusso, con acido solforico come catalizzatore e utilizzando dei setacci molecolari di 3 Å per la rimozione dell'acqua che si viene a formare. Vengono ottenuti 1,6g per una resa del 56%. Successivamente su 200mg di molecola 17 viene eseguita la sostituzione nucleofila sull'azoto con 2-cloroetilmetilsulfuro in acetonitrile con eccesso di potassio carbonato a 60°C per 48 ore. Dopo purificazione tramite cromatografia flash vengono ottenuti 76mg di composto 18 puro. In seguito, è necessario idrolizzare gli esteri inseriti per proteggere il gruppo carbolissico e questa reazione viene condotta in presenza di 4 equivalenti di NaOH in metanolo, a temperatura ambiente e lasciata overnight. Senza bisogno di purificazioni vengono ottenuti 55mg per una resa del 95%.

A questo punto entrambe le molecole sono pronte e dopo aver attivato, a cloruro acilico il composto 19 (due equivalenti di ossalil cloruro, in DCM con due gocce di DMF catalitica, sotto atmosfera di azoto per 4 ore) si può proseguire con il passaggio critico che è il *coupling*. L'articolo riporta che per evitare la formazione di polimeri e spingere maggiormente verso la formazione del prodotto desiderato è essenziale utilizzare lo xilene ad alto punto di ebollizione come solvente e usare condizioni molto diluite. Tramite analisi TLC si possono vedere la formazione di tre prodotti. Si purificano tramite cromatografia flash su gel di silice, ma nessuna delle tre molecole si è rivelata essere il prodotto di interesse.

Anche questa via sintetica è stata abbandonata.

### 3.6 SINTESI DEL 4,11-BIS(2-(METILTIO)ETIL)-1,4,8,11-TETRAAZOBICICLO[6.6.2]ESADECANO

La Chematech, durante il mio periodo di internato, ha reso disponibile commercialmente il cb-cyclam (1,4,8,11-tetraazobicyclo[6.6.2]esadecano). Partendo dunque da esso non rimane che operare la bisostituzione sui due azoti rimasti secondari con la catena solforata di interesse.

La via sintetica adottata viene mostrata in Figura 3.21:

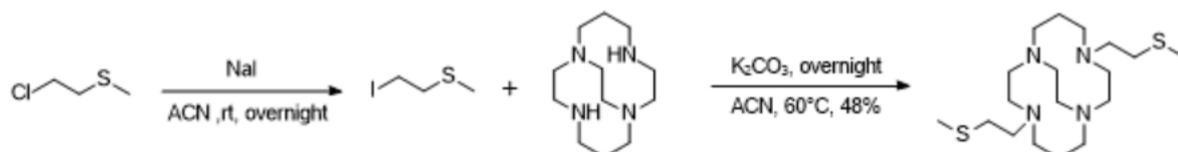


Figura 3.21: sintesi del 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazobicyclo[6.6.2]esadecano.

Inizialmente si era pensato di utilizzare le stesse condizioni impiegate nell'alchilazione delle molecole 12, 14a, 14b, 14c: 3 equivalenti di 2-cloro-etilmetilsulfuro, eccesso di carbonato di potassio, acetonitrile, 60°C, overnight. Tuttavia, dopo una settimana la reazione sembra procedere molto lentamente ed è visibile la formazione del solo prodotto monosostituito. Questo conferma ciò che si era pensato inizialmente ovvero che l'introduzione del ponte etilenico centrale vada a rendere la molecola molto meno reattiva.

Prima, quindi, si è deciso di operare la sostituzione cloro-iodio sulla catena laterale entrante e successivamente effettuare la sostituzione nucleofila nelle stesse condizioni di temperatura, solvente e base viste sopra.

Dopo una colonna cromatografica si è riusciti ad ottenere il composto desiderato puro, con una resa del 48%.



# CAPITOLO 4

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Questo lavoro di tesi è stato condotto all'interno del progetto multidisciplinare ISOLPHARM-Ag in cui sono coinvolti i Laboratori Nazionali di Legnaro dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (LNL-INFN), il Dipartimento di Scienze Chimiche (DiSC) e il Dipartimento di Scienze del Farmaco (DSF) dell'Università degli Studi di Padova; il progetto è volto alla produzione di radiofarmaci basati sull'argento-111.

In particolare, in questo lavoro di tesi ci si è focalizzati su uno dei componenti del radiofarmaco che è il chelante bifunzionale, e lo scopo è stato quello di sintetizzare due nuovi composti (CB-DO2S e CB-TE2S) che appaiono promettenti per migliorare in particolare la inerzia cinetica dei complessi *in vivo*.

La sintesi del 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano (CB-DO2S) e del 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (CB-TE2S) è risultata più complicata di quanto si fosse pensato inizialmente. Data la loro somiglianza strutturale con il CB-DO2A e il CB-TE2A (differiscono solo per la catena laterale), si è inizialmente pensato di seguire la medesima via sintetica proposta in letteratura per questi composti. Tuttavia, la procedura riportata in letteratura per la loro sintesi non è stata coronata da successo, in quanto, una volta arrivati alle molecole 4a e 4b (cfr. Figura 3.2), non si è riusciti a deproteggerle. Si sono quindi cercate altre vie sintetiche, ma in ognuna sono sorti problemi diversi principalmente dovuti ad un calo di reattività una volta che nel macrociclo viene introdotto il ponte etilenico, oppure, al contrario, ad una difficoltà nell'introduzione del ponte, una volta che due azoti non vicinali sono già stati alchilati.

Il CB-TE2S è stato ottenuto partendo dal cb-cyclam, reso disponibile commercialmente dalla Chematech. In un primo passaggio si è reso maggiormente reattivo il 2-cloro-etilmetilsulfuro operando la sostituzione cloro-iodio. Successivamente si sono alchilati i due azoti ancora secondari con 2 equivalenti di ioduro, in presenza di un eccesso di carbonato di potassio, in acetonitrile, a 60°C per una notte. Dopo una successiva purificazione con cromatografia su gel di silice è stato possibile ottenere il prodotto di interesse puro con una resa del 48%. Il composto è stato caratterizzato mediante analisi NMR e di massa.

La sintesi di CB-TE2S potrebbe essere ottimizzata per migliorare la resa. In particolare, si proverà a condurre la reazione a temperature più basse, poiché si prevede una minore produzione di sottoprodotti.

Per quanto riguarda il CB-DO2S, invece, al momento non è stato ancora possibile ottenere il prodotto finale nonostante i numerosi tentativi effettuati. Si ritiene che possano esservi due strade percorribili. La prima, la più semplice, prevede di provare nuovamente la deprotezione, ma conducendola a pressione elevata (utilizzando quindi un'autoclave). In queste condizioni spinte è più probabile ottenere il distacco dei benzili protettori e, a quel punto, sarebbe sufficiente operare l'alchilazione dei due azoti appena deprotetti con la catena laterale di interesse. In alternativa, si proverà nuovamente la reazione del ponte etilenico a partire dalla molecola 16 (cfr. Figura 3.16), rimanendo però questa volta a temperature meno elevate o addirittura a temperatura ambiente. La reazione in queste condizioni procede più lentamente e si potrebbe favorire la formazione preferenziale del ponte intramolecolare a discapito dei sottoprodotti.

Il CB-TE2S, e auspicabilmente a breve anche il CB-DO2S, saranno ora sottoposti ad una caratterizzazione chimica volta a determinare le proprietà termodinamiche (numero, stechiometria e costanti di formazione dei complessi che si formano in soluzione con l'Ag<sup>+</sup>), quelle cinetiche di complessamento/ decomplessamento, e quelle strutturali. Se, come si confida, queste molecole risultassero adeguatamente stabili e/o inerti nel complessamento dell'Ag<sup>+</sup>, si procederà all'esecuzione delle misure mediante radioattività. Queste evidenzieranno la capacità dei chelanti di formare complessi all'atto del *labeling*, e la capacità dei complessi medesimi di resistere alla demetallazione *in vivo*.)

# CAPITOLO 5

## PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 MATERIALI

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

I solventi deuterati utilizzati per l'NMR (Sigma-Aldrich) presentano una purezza isotopica minimo del 99.8%.

Il metanolo utilizzato per le analisi di massa è del tipo Plus Gradient HPLC use.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su fogli di alluminio a gel di silice 60 F254 (della Merk), mentre la fase stazionaria per la cromatografia flash su colonna è stata preparata da gel di silice Kiesiegel 60M, 0.4 – 0.063 mm.

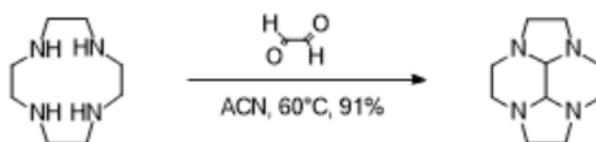
### 5.2 STRUMENTAZIONE

Gli spettri NMR sono stati registrati sciogliendo il campione nel solvente deuterato opportuno e sono stati utilizzati i seguenti spettrometri: Bruker AV III 500 a 500 MHz per  $^1\text{H}$  e 125.8 MHz per  $^{13}\text{C}$  e Bruker Avance DPX 300 a 300 MHz per  $^1\text{H}$  e 75 MHz per  $^{13}\text{C}$ . La molteplicità è riportata nel seguente modo: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, m = multipletto. Gli spostamenti chimici ( $\delta$ ) sono espressi in parti per milione (ppm).

Per l'analisi di massa, i campioni sono stati sciolti in MeOH e lo strumento usato per registrare gli spettri è l'Agilent Technologies LC/MSD Trap SL.

## 5.3 PROCEDURE SINTETICHE

### 5.3.1 Sintesi di decaidro-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilene (2a)



	m/V	Mw	mmol	eq	d
cyclen	1g	172,27	5,8	1	
glyoxal 40%	998 µL	58,04	8,7	1,5	1,265
ACN	58,03 mL				

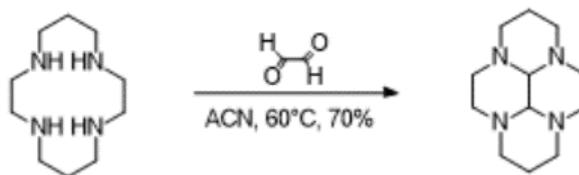
Ad una soluzione di cyclen in acetonitrile, posta in un pallone da 250mL, vengono aggiunti 998µL di glicosale (soluzione acquosa al 40%). Si lascia a reagire sotto agitazione magnetica e a riflusso per 4 ore. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC (eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>). Dopo aver allontanato il solvente all'evaporatore rotante, il grezzo di reazione viene purificato tramite colonna cromatografica flash su gel di silice (3,5cmx35cm) con eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Dopo evaporazione del solvente tramite evaporatore rotante si ottengono 1,03g di prodotto (2a), sottoforma di olio arancione, per una resa del 91%.

<sup>1</sup>H-NMR (MeOD, 500): 2.57 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.73 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.99 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.05 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.12 (s, 2H, CH).

<sup>13</sup>C-NMR (MeOD, 500): 49.85 (8C, CH<sub>2</sub>), 50.67 (2C, CH).

ESI (+) MS m/z: 195

### 5.3.2 Sintesi di dodecaidro-3a,5a,8a,10a-tetraazapirene (2b)



	m/V	Mw	mmol	eq	d
cyclam	1g	200,32436	4,99	1	
glyoxal 40%	859 $\mu$ L	58,04	7,49	1,5	1,265
ACN	58,03 mL				

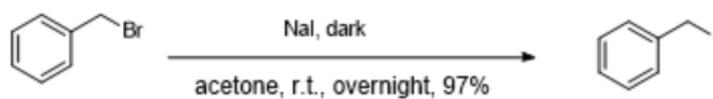
In un pallone da 250mL vengono aggiunti 1 grammo di cyclam, sciolto in 58mL di acetonitrile e 859 $\mu$ L di gliossale in soluzione acquosa al 40%. La reazione viene lasciata sotto agitazione, a riflusso per 6 ore. Il suo decorso viene monitorato tramite TLC (9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>). Si purifica con cromatografia flash su gel di silice (3,5cmx35cm) a gradiente (DCM:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub> 9:1, 8:2). Dopo aver evaporato il solvente, si ottengono 770mg di prodotto (2b), sottoforma di olio giallo, per una resa del 70%.

<sup>1</sup>H-NMR (MeOD, 500): 1.30 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.18 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>N- e -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.26 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.04 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.12 (s, 2H CH).

<sup>13</sup>C-NMR (MeOD, 500): 49.85 (8C, CH<sub>2</sub>), 50.67 (2C, CH).

ESI (+) MS m/z: 223

### 5.3.3 Sintesi benzil ioduro

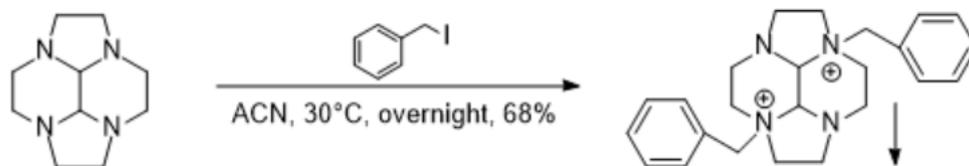


	m/V	Mw	mmol	eq	d
benzil bromuro	1,19mL	171,03	10	1	1,438
NaI	3g	149,89	20	2	
acetone	2,5mL				

In un pallone da 25mL sotto agitazione vengono aggiunti il benzilbromuro, sodio ioduro e acetone. Il pallone viene coperto con carta stagnola per ripararlo dalla luce. La reazione viene lasciata a temperatura ambiente in agitazione overnight. Il giorno seguente, l'acetone viene evaporato e il residuo viene ripreso con DCM. La soluzione viene filtrata su imbuto con cotone e il solvente viene evaporato. Si ottengono 2,118g di benzilioduro per una resa del 97%.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.52 – 7.07 (m, 5H, *H* Ph), 4.46 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{I}$ ).

### 5.3.4 Sintesi 2a,6a-dibenzildodecaidro-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilen-2a,6a-dio (3a)



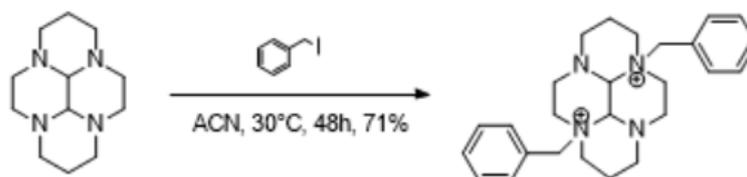
	m/V	Mw	mmol	eq
2a	262mg	194,28	1,35	1
benzil ioduro	1,05g	218,03	4,81	3,56
ACN	2,5mL			

In un tubo a pressione vengono aggiunti la molecola 2a e benzil ioduro in acetonitrile. Pochi minuti dopo l'aggiunta si vede già la formazione di un precipitato, si lascia in ogni caso la reazione sotto agitazione magnetica, a 30°C per una notte. Il precipitato viene poi filtrato sottovuoto e lavato per 3 volte con acetonitrile e per due volte con Et<sub>2</sub>O. Si ottengono 577mg di un solido giallo per una resa del 68%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.79 – 7.50 (m, 10H, H Ph), 5.02 – 4.92 (d, 2H, CH), 4.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.41 – 4.28 (m, 2H), 3.97 – 3.87 (m, 2H), 3.76 – 3.60 (m, 6H), 3.52 – 3.41 (m, 4H), 3.24 – 3.10 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 133.64 – 132.61, 131.35, 129.73, 125.83 – 123.83 (12C, C Ph), 77.59 (2C, -CH<sub>2</sub>Ph), 61.00 (2C, CH), 54.84, 46.04, 42.77 (8C).

**5.3.5 Sintesi (10br,10cr)-Dodecaidro-3a,8a-bis(fenilmetil)-3a,5a,8a,10a-tetrazapirenio diioduro monoidrato (3a,H<sub>2</sub>O) (3b)**



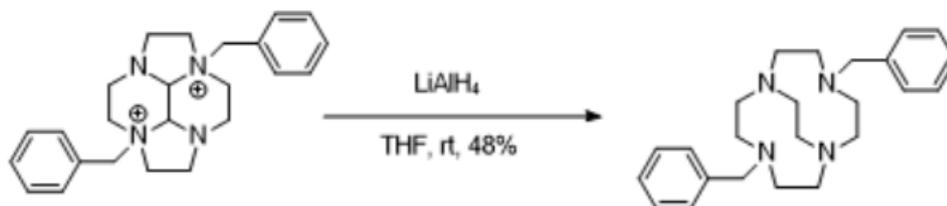
	m/V	Mw	mmol	eq
<b>2b</b>	300mg	222,23	1,35	1
<b>benzil ioduro</b>	1,05g	218,03	4,81	3,56
<b>ACN</b>	14MI			

In un tubo a pressione vengono aggiunti la molecola 2b e benzil ioduro in acetonitrile. Si lascia la reazione sotto agitazione magnetica, a 30°C per due giorni. In soluzione appare un precipitato di colore giallo che viene filtrato sottovuoto e lavato per tre volte con acetonitrile e per due volte con dietilere. Si ottengono 627mg di un solido giallo per una resa del 71%.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.78 – 7.51 (m, 10H, *H* Ph), 5.42 – 5.21 (d, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.77 – 4.76 (d, 2H), 4.50 – 4.39 (m, 2H), 3.83 – 3.70 (m, 2H), 3.65 – 3.43 (m, 6H), 3.31 – 3.21 (m, 4H), 2.93 – 2.79 (m, 2H), 2.38 – 2.21 (m, 2H), 1.99 – 1.88 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 133.20 (4C, C Ph), 131.46 (4C, C Ph), 129.51 (2C, C Ph), 124.69 (2C, C Ph), 76.87 (2C, CH), 62.40 (2C, -CH<sub>2</sub>Ph), 60.55 (2C), 51.27 (2C), 46.76 (2C), 46.10 (2C), 17.97 (2C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

### 5.3.6 Sintesi 4,10-dibenzil-1,4,7,10-tetraazabicciclo[5.5.2]tetradecano (4a)



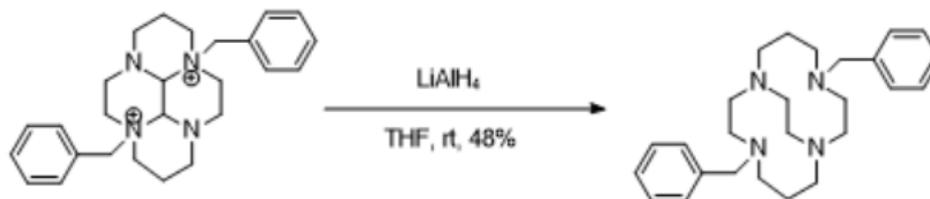
	m/V	Mw	mmol	eq
Si.Po-3	440 mg	630,35	0,7	1
LiAlH <sub>4</sub>	2,10 mL	1M	2,1	3
THF	5 mL			

In un palloncino da 25 mL, vengono aggiunti sotto flusso di azoto, la molecola 3a e litio alluminio idruro (soluzione 1M in THF) in THF. La reazione viene lasciata sotto agitazione e in atmosfera d'azoto per una notte a temperatura ambiente. Dopo aver evaporato il solvente, vengono aggiunti 10mL di soluzione Rochelle e si estrae per tre volte con diclorometano. Si evapora il solvente e si procede con una purificazione tramite colonna cromatografica flash. Si usa una colonna di dimensioni 3,5cmx35cm con eluente 9:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Si ottiene un olio giallino per una resa del 48%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.53 – 7.32 (m, 10H, H Ph), 3.96 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>Ph), 3.42(s, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.25 – 3.15 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.15 – 3.04 (m, 8H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.82 – 2.66 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 128.83, 127.79 – 126.41 (m, 12C, C Ph), 60.90 – 57.86 (m), 57.86 – 55.51 (m), 52.47 – 51.44 (m), 48.40 – 44.66 (m) (14C).

### 5.3.7 Sintesi di 4,11-dibenzil-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano (4b)



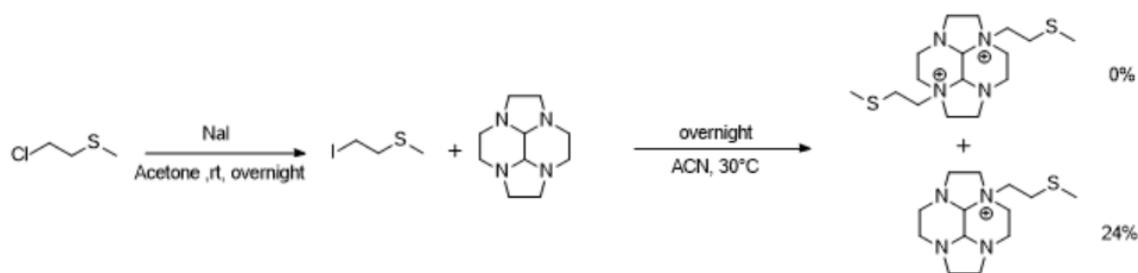
	m/V	Mw	mmol	eq
<b>3b</b>	607mg	658,4	0,92	1
<b>LiAlH<sub>4</sub> THF 1M</b>	2,77mL		2,77	3
<b>THF</b>	6mL			

In un palloncino da 25 mL, vengono aggiunti sotto flusso di azoto la molecola 3b e litio alluminio idruro (soluzione 1M in THF) in THF. La reazione viene lasciata sotto agitazione e in atmosfera d'azoto per una notte a temperatura ambiente. Dopo aver evaporato il solvente, vengono aggiunti 10mL di soluzione Rochelle e si estrae per tre volte con diclorometano. Si evapora il solvente e si procede con una purificazione tramite colonna cromatografica flash. Si usa una colonna di dimensioni 3,5cmx35cm con eluente 9:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.37 – 7.20 (m, 10H, *H* Ph), 3.76 (d, *J* = 1.5 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>Ph-), 3.68 – 3.59 (m, 2H), 3.15 (m, 8H), 2.99 – 2.84 (m, 6H), 2.81 – 2.70 (m, 2H), 2.69 – 2.60 (m, 2H), 1.79 – 1.62 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 130.05 (4C, *C* Ph), 128.50 (4C, *C* Ph), 127.72 (4C, *C* Ph), 77.46 (1C), 77.20 (1C), 76.95 (2C), 58.17, 57.64, 57.44 – 57.04, 54.08, 53.18, 52.21, 50.10, 24.17 (2C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

### 5.3.8 Sintesi di 8a-(2-(metiltio)etil)decaidro-1H-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg]acenaftilen-8a-io



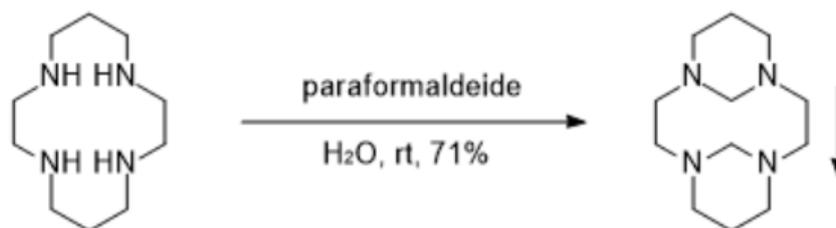
	m/V	Mw	mmol	Eq	d
<b>2-cloro-etilmetilsulfuro</b>	438 $\mu$ L	110,61	4,4	2,2	1,11
<b>NaI</b>	1,32 g	149,89	8,8	4,4	
<b>Acetone</b>	4 mL				
<b>2° STEP</b>					
<b>2a</b>	388 mg	194,28	2	1	
<b>ACN</b>	10 mL				

Ad una soluzione di sodio ioduro in acetone, posta in un palloncino da 25mL sotto agitazione magnetica, vengono aggiunti 438  $\mu$ L di 2-cloro-etilmetilsulfuro. La reazione viene lasciata sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per una notte. Il giorno seguente, senza operare purificazioni, vengono aggiunti 388mg di molecola 2a, sciolta in 10mL di acetonitrile. La soluzione, sempre sotto agitazione magnetica e atmosfera d'azoto, viene termostata a 30°C e lasciata a reagire per una notte. La reazione viene monitorata tramite TLC (eluente 8:2 DCM:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub>) e purificata con colonna su gel di silice (3,5cmx35cm, stesso eluente della TLC). Viene ottenuto solo il prodotto mono-alchilato sottoforma di olio giallino con una resa del 24%.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD):  $\delta$  4.70 (s, 2H), 4.16 – 4.01 (m, 6H), 3.96 – 3.88 (m, 2H), 3.87 – 3.77 (m, 2H), 3.72 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.31 – 3.06 (m, 6H), 2.34 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, MeOD):  $\delta$  76.86 (2C, CH), 60.35, 53.95, 47.56, 44.97, 41.21, 24.60 (1C, CH<sub>2</sub>S), 13.36 (1C, CH<sub>3</sub>).

### 5.3.9 Sintesi di 1,4,8,11-tetraazatriciclo[9.3.1.14,8]esadecano (10)



	m/V	Mw	mmol	eq
cyclam	3g	200,33	14,98	1
paraformaldeide	0,899g	30,03	30	2
H <sub>2</sub> O	50 mL + 4 mL			

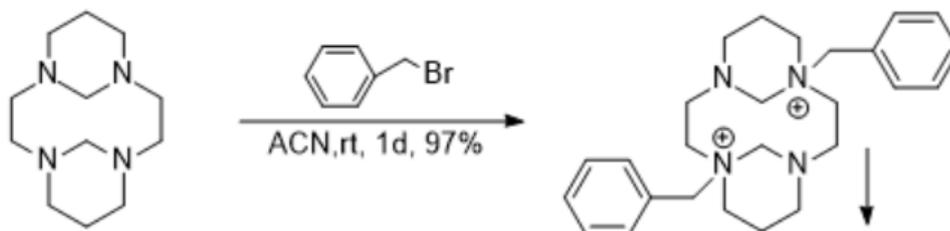
0,899g di paraformaldeide vengono sospesi in 30mL di acqua deionizzata in una vial posta sotto agitazione magnetica. 3g di cyclam vengono successivamente sciolti in 4mL di acqua; la soluzione così formata viene aggiunta alla sospensione. Dopo quattro ore, si ha la formazione di un precipitato bianco. La sospensione viene trasferita in una provetta da centrifuga, si centrifuga e si scarta il surnatante. Si ripete questa procedura per 3 volte, aggiungendo ogni volta 5mL di acqua deionizzata. Per favorire l'eliminazione dell'acqua il precipitato viene sciolto in etanolo e trasferito in un pallone. Il solvente viene poi evaporato all'evaporatore rotante. Dopo una notte in pompa da vuoto, si recuperano 2,4g di solido bianco per una resa del 71%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.45 (dt, *J* = 10.9, 2.1 Hz, 2H, -NCH<sub>2</sub>N-), 3.26 – 3.08 (d, 4H), 2.91 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H, -NCH<sub>2</sub>N-), 2.87 – 2.79 (m, 4H), 2.64 (td, *J* = 12.6, 3.6 Hz, 4H), 2.46 – 2.36 (m, 4H), 2.28 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.27 – 1.14 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 69.3 (2C, -NCH<sub>2</sub>N-), 54.1 (4C), 49.8 (4C), 20.6 (2C, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

ESI (+) MS *m/z*: 225

### 5.3.10 Sintesi di 1,8-bis-(benzil)-4,11-diazoniatriciclo[9.3.1.14,8]esadecano dibromuro (11)



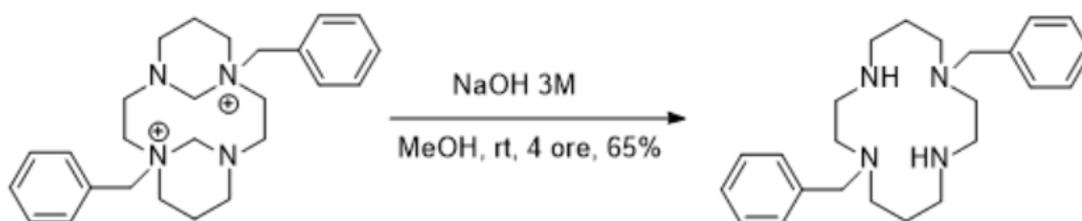
	m/V	Mw	mmol	Eq	d
<b>10</b>	500 mg	224,346	2,23	1	
<b>benzil bromuro</b>	530 $\mu$ L	171,03	4,46	2	1,438
<b>ACN</b>	16 mL				

In un pallone da 50mL vengono aggiunti, sotto agitazione magnetica, il composto 10, acetonitrile e benzilbromuro. Dopo poche ore, si vede già la precipitazione di un solido bianco. Si lascia comunque la soluzione a reagire per 24 ore. Successivamente la sospensione viene trasferita in una provetta da centrifuga, centrifugata e scartato il surnatante. La procedura viene ripetuta tre volte, aggiungendo di volta in volta 10mL di ACN per lavare il precipitato. Dopo evaporazione del solvente residuo vengono recuperati 1,012g di solido bianco, per una resa del 97%.

**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz, MeOD):  $\delta$  7.69 – 7.53 (m, 10H, *H* Ph), 5.59 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 13.4 Hz, 2H), 4.58 – 4.44 (m, 2H), 3.80 – 3.66 (m, 2H), 3.66 – 3.55 (m, 2H), 3.52 – 3.39 (m, 2H), 3.27 (m, 2H), 2.99-2.89 (m, 4H), 2.69 – 2.45 (m, 4H), 1.92-1.86 (m, 2H).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (125 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  135.5 (4C), 133.5 (4C), 131.9 (2C), 128.5 (2C), 82.2, 77.0, 63.5, 60.1, 51.5, 48.0, 19.8 (2C).

### 5.3.11 Sintesi di 1,8-bis-(benzil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (12)



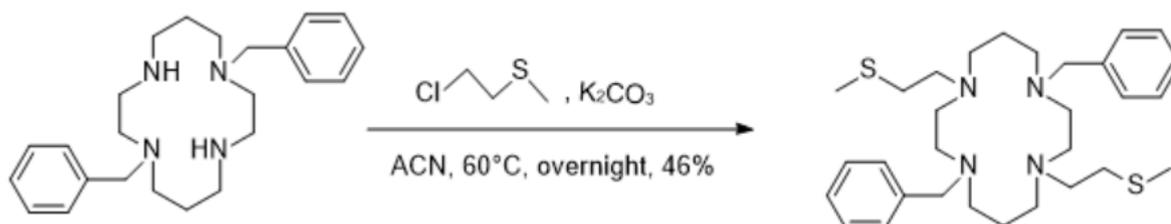
	m/V	Mw	mmol	eq
<b>11</b>	500mg	406,309	1,23	1
<b>NaOH 3M+ MeOH</b>	20mL + 20mL			

Ad una soluzione della molecola 11 in metanolo, posta in un pallone da 100mL, vengono aggiunti 20mL di NaOH 3M. La soluzione viene lasciata sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente per 4 ore. La reazione è stata monitorata tramite TLC, eluente 8:2 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Una volta vista la scomparsa della partenza, il solvente è stato evaporato all'evaporatore rotante. In seguito, si sono aggiunti 20mL di acqua deionizzata e si è estratto per tre volte con diclorometano. Si è aggiunto sodio solfato, filtrato in imbuto con cotone ed evaporato il solvente. Si ottengono 300mg di olio incolore, per una resa del 65%.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD) δ 7.48 – 7.11 (m, 10H, *H* Ph), 3.75 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>Ph-), 2.82 – 2.70 (m, 4H), 2.69 – 2.62 (m, 4H), 2.61 – 2.51 (m, 8H), 1.90-1.82 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, MeOD): δ 130.1 (6C, *C* Ph), 127.4 (6C, *C* Ph), 58.3, 54.1, 51.9, 50.4, 48.1, 25.2 (2C, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

### 5.3.12 Sintesi di 1,8-dibenzil-4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (13)



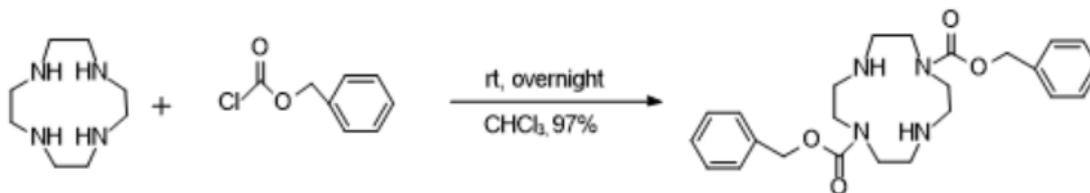
	m/V	Mw	mmol	eq	d
12	180mg	380,569	0,473	1	
2-cloro-etilmetilsulfuro	141µL	110,61	1,42	3	1,11
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	261mg	138,21	1,892	4	
ACN	6-7mL				

In un tubo a pressione, flussando azoto, vengono aggiunti il composto 12, acetonitrile dry, carbonato di potassio e 2-cloro-etilmetilsulfuro. Una volta finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Una volta notata la scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in pipetta Pasteur con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si purifica il residuo tramite cromatografia flash su gel di silice (2,5cmx35cm), con eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 115mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 46%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 – 7.18 (m, 10H, H Ph), 3.57 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>Ph), 2.73 – 2.41 (m, 24H), 2.07 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.82 – 1.61 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 128.02 (t, J = 130.7 Hz, 12C, C Ph), 59.81 (2C, -CH<sub>2</sub>Ph), 54.64, 51.23 (dd, J = 67.2, 29.0 Hz), 31.77, 23.71 (2C, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 15.77 (2C, CH<sub>3</sub>).

### 5.3.13 Sintesi di dibenzil 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14a)



	m/V	Mw	mmol	eq	d
cyclen	671 mg	172,27	3,39	1	
Cbz-Cl	968 $\mu\text{L}$	170,59	6,78	2	1,195
$\text{CHCl}_3$	35 mL				

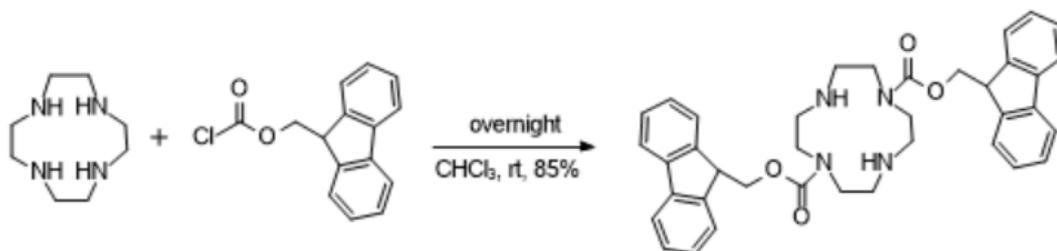
In un pallone da 100mL, sotto flusso di azoto, viene aggiunto il cyclen e 35mL di cloroformio. La soluzione così formata viene posta in bagno di ghiaccio e si procede con l'aggiunta goccia a goccia del benzilcloroformiato. La miscela di reazione viene poi riportata a temperatura ambiente e lasciata a reagire, sotto atmosfera di azoto e agitazione magnetica, per una notte. Si ha la precipitazione di un fine solido bianco. Il cloroformio viene evaporato tramite l'evaporatore rotante e il precipitato viene ripreso con dietiletere. Viene filtrato su pompa da vuoto e lavato tre volte con dietiletere. Per riportarlo in forma di base, il solido ottenuto viene ripreso con NaOH 3M ed estratto con diclorometano per tre volte. Viene aggiunto sodio solfato, filtrato su imbuto con cotone e allontanato il solvente all'evaporatore rotante. Vengono ottenuti 1,617g di prodotto, sottoforma di olio trasparente, che è tuttavia impuro di cyclen. La resa si attesta intorno al 97%.

**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz, MeOD):  $\delta$  7.45 – 7.22 (m, 10H, *H* Ph), 5.14 (s, 4H,  $-\text{COOCH}_2\text{Ph}-$ ), 3.51 – 3.37 (m, 8H,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ), 2.96 – 2.61 (m, 8H,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  156.46 (2C, C=O), 137.61 – 134.57 (m, 5C, C Ph), 130.83 – 125.10 (m, 5C, C Ph), 66.41 (2C,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 52.82 – 47.36 (m, 8C,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ).

**ESI (+) MS** m/z: 441

### 5.3.14 Sintesi dibis((9H-fluoren-9-il)metil) 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14b)

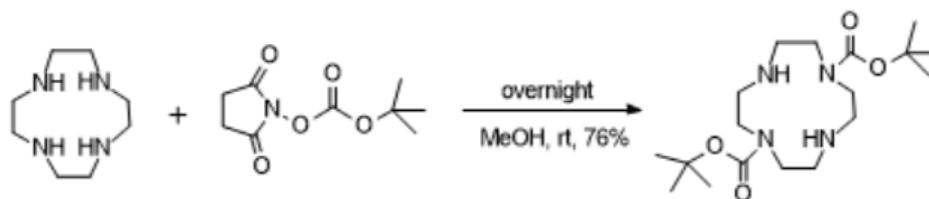


	m/V	Mw	mmol	eq
cyclen	100 mg	172,27	0,58	1
Fmoc-Cl	330 mg	258,699	1,28	2,2
CHCl <sub>3</sub>	10 mL			

In un pallone da 25mL, flussando azoto e sotto agitazione magnetica, viene aggiunto il cyclen e 10mL di cloroformio. La soluzione così formata viene posta in bagno di ghiaccio e, dopo aver sciolto lo Fmoc in pochi mL di cloroformio, si procede con la sua aggiunta goccia a goccia. La miscela di reazione viene poi riportata a temperatura ambiente e lasciata a reagire, sotto atmosfera di azoto, per una notte. Si ha la precipitazione di un fine solido bianco. Il cloroformio viene evaporato tramite l'evaporatore rotante e il precipitato viene ripreso con dietilere. Viene filtrato su pompa da vuoto e lavato tre volte con dietilere. Si ottengono 340mg di solido bianco per una resa dell'85%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.88 (m, 8.8 Hz, 6H, H Ph), 7.64 (m, 5H, H Ph), 7.46 – 7.37 (m, 5H, H Ph), 4.57 (s, 4H, -COOCH<sub>2</sub>-), 2.98 (m, 4H), 2.80 (m, 2H), 2.64 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.16 (m, 2H).

### 5.3.15 Sintesi di di-tert-butile 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (14c)



	m/V	Mw	mmol	eq
<b>cyclen</b>	300 mg	172,27	1,74	1
<b>Boc-Osu</b>	750 mg	215,2	3,48	2
<b>MeOH</b>	20 mL			

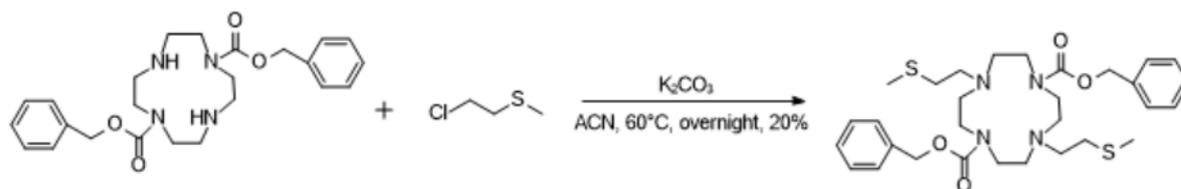
In un pallone da 50mL, flussando azoto e sotto agitazione magnetica, viene aggiunto il cyclen e 20mL di metanolo. La soluzione così formata viene posta in bagno di ghiaccio e, dopo aver sciolto la Boc-OSu in pochi mL di metanolo, si procede con la sua aggiunta goccia a goccia. La miscela di reazione viene poi riportata a temperatura ambiente e lasciata a reagire, sotto atmosfera di azoto, per due giorni. Il solvente viene poi evaporato, il residuo viene poi ripreso con NaOH 3M ed estratto per tre volte con cloroformio. Viene aggiunto sodio solfato, filtrato in imbuto con cotone ed evaporato il solvente. Si procede con una purificazione con colonna cromatografica flash su gel di silice (2,5cmx35cm) a gradiente (da 9:1 a 8:2 isopropanolo:NH<sub>3</sub>). Si ottengono 390mg di olio trasparente, per una resa del 76%.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.43-3.24 (m, 8H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.95-2.73 (m, 8H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 1.43 (s, 18H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 156.17 (2C, C=O), 49.67 (m, 8C, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 28.43 (6C, CH<sub>3</sub>), 25.33 (2C, C).

**ESI (+) MS** m/z: 373

### 5.3.16 Sintesi di dibenzil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15a)



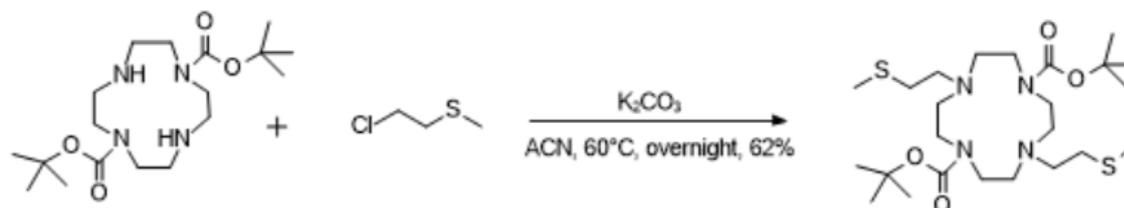
	m/V	Mw	mmol	Eq	d
14a	1 g	440,535	2,27	1	
2-cloro-etilmetilsulfuro	1141 $\mu$ L	110,61	11,3	5	1,11
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,88 g	138,21	13,6	6	
ACN	35 mL				

In un pallone da 100mL, flussando azoto, vengono aggiunti il composto 14a, acetonitrile, carbonato di potassio e 2-cloro-etilmetilsulfuro. Una volta finite le aggiunte si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Una volta notata la scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in imbuto con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si purifica il grezzo residuo tramite cromatografia flash su gel di silice (3,5cmx35cm), con eluente 9:1 DCM:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 207mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 20%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.46 – 7.13 (m, 10H, H Ph), 5.15 (s, 4H, -COOCH<sub>2</sub>Ph-), 3.55 – 3.32 (m, 8H), 2.75 – 2.38 (m, 16H), 2.15 – 1.92 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  156.45 (2C, C=O), 136.85 (d, *J* = 7.3 Hz, 2C, C Ph), 133.60 – 124.06 (10C, CH Ph), 65.94 (d, *J* = 274.8 Hz, 2C, -CH<sub>2</sub>Ph), 54.22, 36.21, 15.82 (2C, CH<sub>3</sub>).

**5.3.17 Sintesi di di-tert-butil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15c)**



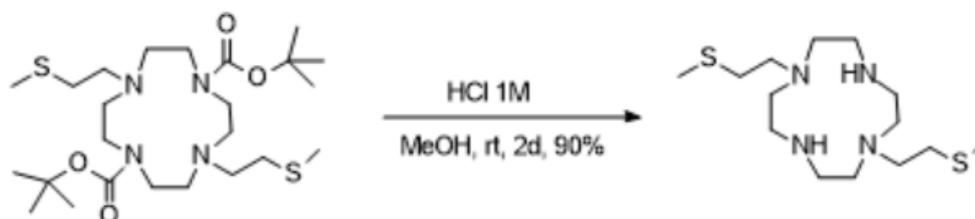
	m/V	Mw	mmol	eq	d
14c	350 mg	372,503	0,94	1	
2-cloro-etilmetilsulfuro	281 $\mu$ L	110,61	2,82	3	1,11
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	519 mg	138,21	3,76	4	
ACN	10 mL				

In un tubo a pressione, flussando azoto, vengono aggiunti il composto 14c, acetonitrile dry, carbonato di potassio e 2-cloro-etilmetilsulfuro. Una volta finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 99:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>. Una volta notata la scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in pipetta Pasteur con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si purifica il residuo tramite cromatografia flash su gel di silice (3,5cmx35cm) a gradiente (da 99:1 a 95:5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% di NH<sub>3</sub>). Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 306mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 62%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.42-3.29 (s, 8H), 2.79 – 2.61 (m, 12H), 2.62 – 2.50 (m, 4H), 2.10 (s, 6H, -SCH<sub>3</sub>-), 1.45 (s, 18H, -CCH<sub>3</sub>-).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  155.88 (2C, C=O), 54.26, 46.81, 28.49 (6C, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 15.79 (2C, -SCH<sub>3</sub>).

### 5.3.18 Sintesi di 1,7-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (16)



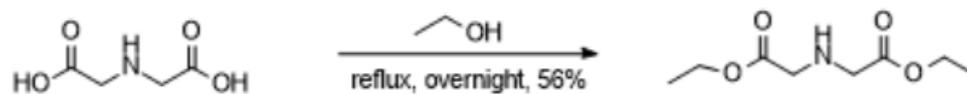
	m/V	Mw	mmol
15c	250 mg	520,792	0,48
HCl 12M	834 $\mu$ L		
MeOH	9,2 mL		

Il composto 15c viene sciolto in 10mL di una soluzione 1M di HCl in metanolo. La miscela di reazione viene posta in agitazione e termostata a 25°C per due giorni. L'andamento della reazione di controllo tramite TLC con eluente 95:5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub>. Dopo aver evaporato il solvente, si riprende il residuo con NaOH 3M e si estrae tre volte con CHCl<sub>3</sub>. Si aggiunge sodio solfato, si filtra in imbuto con cotone e si porta a secco tramite evaporatore rotante. La miscela viene poi purificata tramite colonna cromatografica flash (2,5cmx35cm) a gradiente (da 95:5 a 8:2, isopropanolo:ammoniaca). Si ottengono 140mg di olio giallino, per una resa del 90%.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, MeOD):  $\delta$  2.71-2.46 (m, 24H), 2.09 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, MeOD):  $\delta$  52.85 (2C, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-), 51.05 (4C, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 43.90 (4C, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 32.50 (2C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 14.10 (2C, -SCH<sub>3</sub>).

### 5.3.19 Sintesi di dietil 2,2'-azandiildiacetato (17)



	m/V	Mw	mmol
acido imminodiacetico	2 g	133,103	15
EtOH	50 mL		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 pipettata		

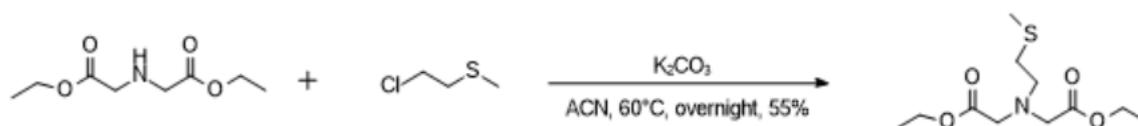
In un pallone da 100mL vengono posti sotto agitazione magnetica 50mL di etanolo e l'acido imminodiacetico. Viene poi aggiunta una pipettata di acido solforico come catalizzatore e dei setacci molecolari da 3A. Il pallone viene poi attaccato ad un refrigerante ad acqua e la soluzione è posta a riflusso per una notte.

Il giorno dopo, l'etanolo viene rimosso tramite evaporatore rotante. Viene aggiunta acqua distillata e si riporta a pH neutro tramite sodio bicarbonato. Si estrae per tre volte con diclorometano (30mL x 3), si aggiunge sodio solfato, si filtra in imbuto con cotone e si porta a secchezza tramite evaporatore rotante.

Si ottengono 1,7g di olio marroncino, per una resa del 56%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.43 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-), 2.02 (s, 1H, NH), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 5.3.20 Sintesi di dietil 2,2'-((2-(metiltio)etil)azandiil)diacetato (18)



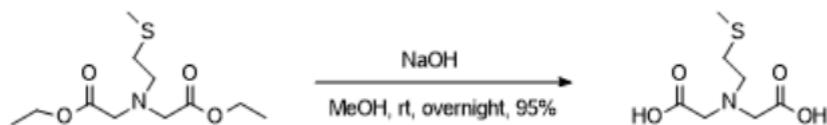
	m/V	Mw	mmol	Eq	d
17	200 mg	189,209	1,06	1	
2-cloro-etilmetilsulfuro	126 $\mu$ L	110,61	1,26	1,2	1,11
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	438 mg	138,21	3,17	3	
ACN	10 mL				

In un tubo a pressione, flussando azoto, vengono aggiunti il composto 17, acetonitrile dry, carbonato di potassio e 2-cloro-etilmetilsulfuro. Una volta finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 99:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Una volta notata la quasi scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in pipetta Pasteur con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si purifica il residuo tramite cromatografia flash su gel di silice (2,5cmx35cm) a gradiente (da 100 a 95:5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH). Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 76mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 55%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.16 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.57 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-), 3.02 – 2.89 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-), 2.67 – 2.53 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-), 2.11 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 1.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.09 (2C, C=O), 60.51, 55.21, 53.91 (10C), 32.51 (1C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 15.62 (2C, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.19 (1C, -SCH<sub>3</sub>).

### 5.3.21 Sintesi di acido 2,2'-((2-(metiltio)etil)azandiil)diacetico (19)



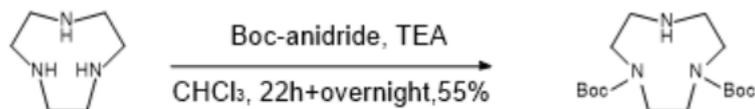
	m/V	Mw	mmol	eq
18	73 mg	263,354	0,276	1
NaOH 1M	1,11 mL		1,11	4
MeOH	1 mL			

Ad una soluzione della molecola 18 in metanolo, vengono aggiunti 1,11 mL di NaOH 1M. Si lascia a reagire, sotto agitazione magnetica, termostata a 25°C per una notte. Si controlla che la reazione sia andata a completezza tramite TLC con eluente 99:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Si stacca l'agitazione e si aggiunge resina a scambio ionico (Amberlyst 15 hydrogen) per 15 minuti. Si filtra la resina in imbuto con cotone e si evapora il solvente tramite evaporatore rotante. Si ottengono 54,5mg di solido marroncino per una resa del 95%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ 3.02 (s, 4H, -COOCH<sub>2</sub>N-), 2.66-2.56 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-), 2.08 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ 177.90 (2C, COOH), 60.44 (2C, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 55.04 (s), 30.94 (1C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 14.14 (1C, CH<sub>3</sub>).

### 5.3.22 Sintesi di di-tert-butil 1,4,7-triazonane-1,4-dicarbossilato (21)



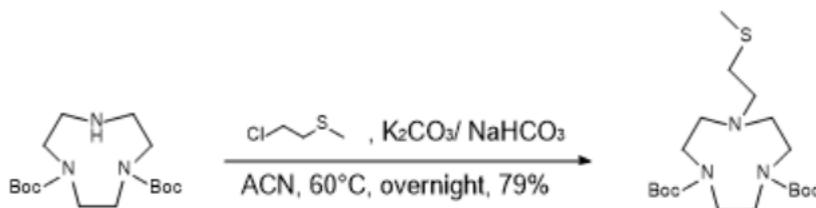
	m/V	Mw	mmol	Eq	d
TACN	1,5g	129	11,6	1	
Boc-anidride	5g	218,247	23,2	2	
TEA	4,84mL	101,19	34,8	3	0,728
CHCl <sub>3</sub>	45mL + 22mL				

In un pallone da 250mL, flussando azoto e sotto agitazione magnetica vengono aggiunti 45mL di cloroformio, 1,5g di cyclen e 4,84mL di TEA. A parte 5g di Boc anidride vengono sciolti in 22mL di cloroformio. La soluzione così formata si viene messa in una siringa da 24 mL e viene aggiunta nel pallone di reazione tramite l'utilizzo della syringe pump (impostata a 1mL/h, diametro 20mm, target 24mL). Una volta finita l'aggiunta, la miscela di reazione viene lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica e in atmosfera d'azoto per una notte. L'andamento della reazione viene controllato tramite TLC (eluente 1:99 Dietiletere:etile acetato). La soluzione viene portata all'evaporatore rotante e il residuo viene ripreso con una soluzione acquosa satura di bicarbonato di sodio. Si estrae tre volte (3x 30mL) con cloroformio, si aggiunge sodio solfato, si filtra in imbuto con cotone e si evapora il solvente. Per la purificazione si effettua una colonna cromatografica flash su gel di silice (3,5cmx35cm) a gradiente (da 1:99 dietiletere: etile acetato a 95:5 etile acetato metanolo). Si ottengono 2,2g di prodotto puro, sottoforma di olio giallo, per una resa del 56%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.51-3.38 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.31-3.17 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.95-2.86 (m, 4H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 1.46 (s, 18H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155.75 (2C, C=O), 56.32 – 44.68 (6C), 28.50 (6C, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### 5.3.23 Sintesi di di-tert-butil 7-(2-(metiltio)etil)-1,4,7-triazonane-1,4-dicarbossilato (22)



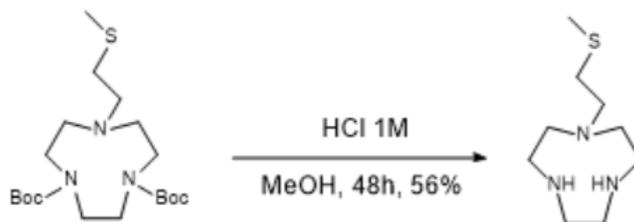
	m/V	Mw	mmol	eq	d
21	400 mg	329,435	1,21	1	
2-cloro-etilmetilsulfuro	145 $\mu$ L	110,61	1,46	1,2	1,11
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	503 mg	138,21	3,64	3	
ACN	12 mL				

In un tubo a pressione, flussando azoto, vengono aggiunti il composto 21, acetonitrile dry, carbonato di potassio e 2-cloro-etilmetilsulfuro. Una volta finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 99:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Una volta notata la quasi scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in pipetta Pasteur con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente tramite evaporatore rotante e si purifica il grezzo di reazione tramite cromatografia flash su gel di silice (3,5cmx35cm) a gradiente (da 99:1 a 95:5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH). Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 390mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 79%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.51-3.45 (m, 4H), 3.29-3.18 (m, 4H), 2.80 – 2.60 (m, 6H), 2.59-2.49 (m, 2H), 2.09 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 18H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  155.60 (2C, C=O), 59.38 – 47.82 (7C), 32.24 (1C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 28.53 (6C, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 15.68 (1C, -SCH<sub>3</sub>).

### 5.3.24 Sintesi di 1-(2-(metiltio)etil)-1,4,7-triazonano (23)



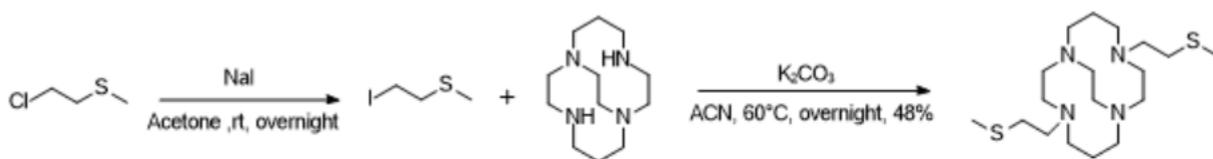
	m/V	Mw	mmol
22	350 mg	403,69	0,867
HCl 12M	1,5 mL		
MeOH	16,5 mL		

Il composto 22 viene sciolto in 18mL di una soluzione 1M di HCl in metanolo. La miscela di reazione viene posta in agitazione e portata a 25°C per due giorni. L'andamento della reazione di controllo tramite TLC con eluente 95:5 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub>. Dopo aver evaporato il solvente, si riprende il residuo con NaOH 3M e si estrae tre volte con CHCl<sub>3</sub>. Si aggiunge sodio solfato, si filtra in imbuto con cotone e si porta a secco tramite evaporatore rotante. La miscela viene poi purificata tramite colonna cromatografica flash (2,5cmx35cm, 8:2 isopropanolo:ammoniaca). Si ottengono 50mg di olio giallino, per una resa del 53%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ 2.88 – 2.58 (m, 16H), 2.10 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ 54.12, 50.35, 44.28 (7C), 32.51 (1C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 13.88 (1C, -SCH<sub>3</sub>).

### 5.3.25 Sintesi di 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano



	m/V	Mw	mmol	eq	d
2-cloro-etil-metil-sulfide	96,8 µL	110,61	0,972	1	1,11
NaI	175 mg	149,89	1,17	1,2	
Acetone	1 mL				

	m/V	Mw	mmol	eq	d
cb-cyclam	100 mg	226,36	0,442	1	
2-iodo-etil-metil-sulfide	quello recuperato da step precedente			2,2	
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	244 mg	138,21	1,77	4	
ACN	5 mL				

Ad una soluzione di sodioioduro in acetone, posta in un palloncino da 25mL sotto agitazione magnetica, vengono aggiunti 96,8 µL di 2-cloro-etilmetilsulfuro. La reazione viene lasciata sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per una notte. Il giorno seguente la miscela di reazione viene filtrata in pipetta Pasteur con cotone.

In un tubo a pressione, flussando azoto, vengono aggiunti il cb-cyclam, acetonitrile dry, carbonato di potassio e la soluzione di 2-iodo-etilmetilsulfuro appena filtrata. Una volta finite le aggiunte, il tubo viene chiuso e si porta la temperatura a 60°C per una notte. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC, eluente 8:2 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub>. Una volta notata la scomparsa del prodotto di partenza, si filtra la miscela di reazione in pipetta Pasteur con cotone, per eliminare il potassio carbonato insolubile. Si allontana il solvente all'evaporatore rotante e si purifica il residuo grezzo tramite cromatografia flash su gel di silice (2,5cmx35cm, eluente 8:2 CHCl<sub>3</sub>:MeOH + 0,5% NH<sub>3</sub>). Dopo aver evaporato il solvente si ottengono 80mg di prodotto puro, sottoforma di olio giallino, per una resa del 48%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD): δ 3.56 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 3.17 – 3.06 (m, 6H), 3.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 2.97 – 2.92 (m, 2H), 2.92-2.82 (m, 10H), 2.80 – 2.63 (m, 6H), 2.16 (s, 6H, -SCH<sub>3</sub>), 1.86 – 1.69 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD): δ 52.84 (m, 12C), 28.70 (2C, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>), 23.76 (2C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 15.09 (2C, -SCH<sub>3</sub>).

ESI (+) MS *m/z*: 375

# APPENDICE

## A.1 Caratterizzazioni 1,8-dibenzil-4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (13)

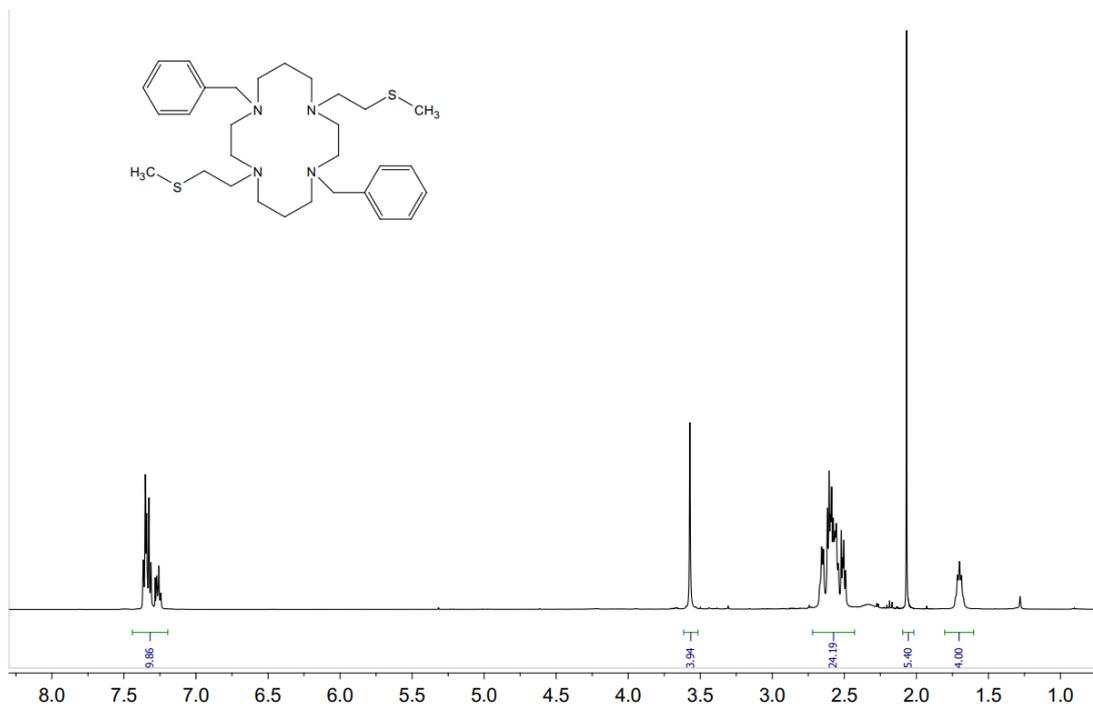


Figura A.1.1: Spettro <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del composto 13.

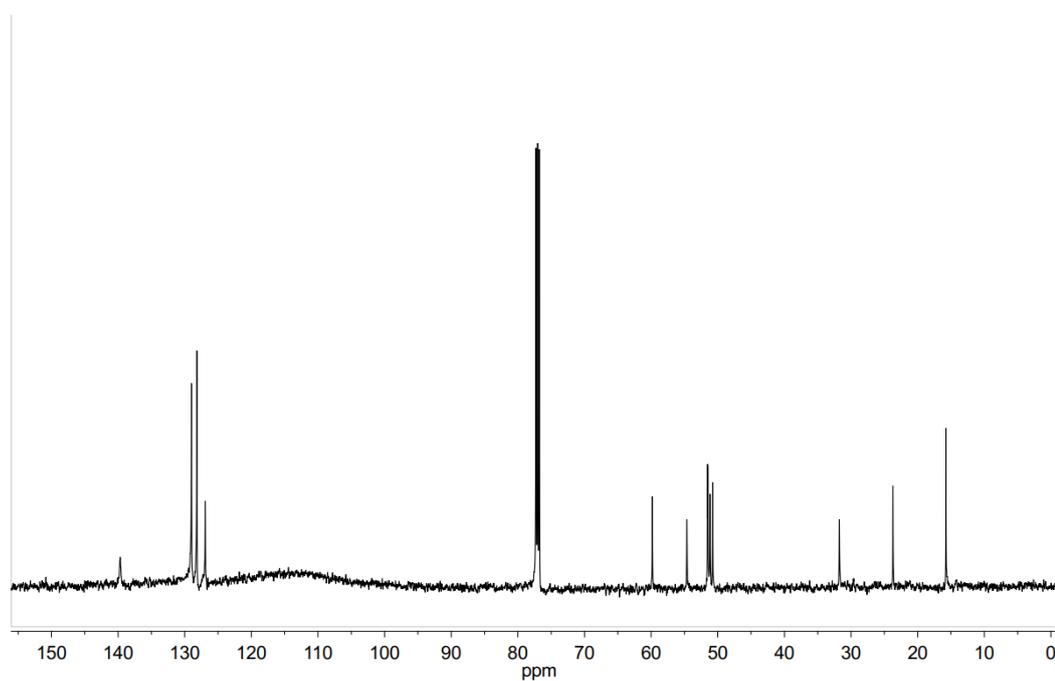


Figura A.1.2: Spettro <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del composto 13.

**A.2 Caratterizzazioni dibenzil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15a)**

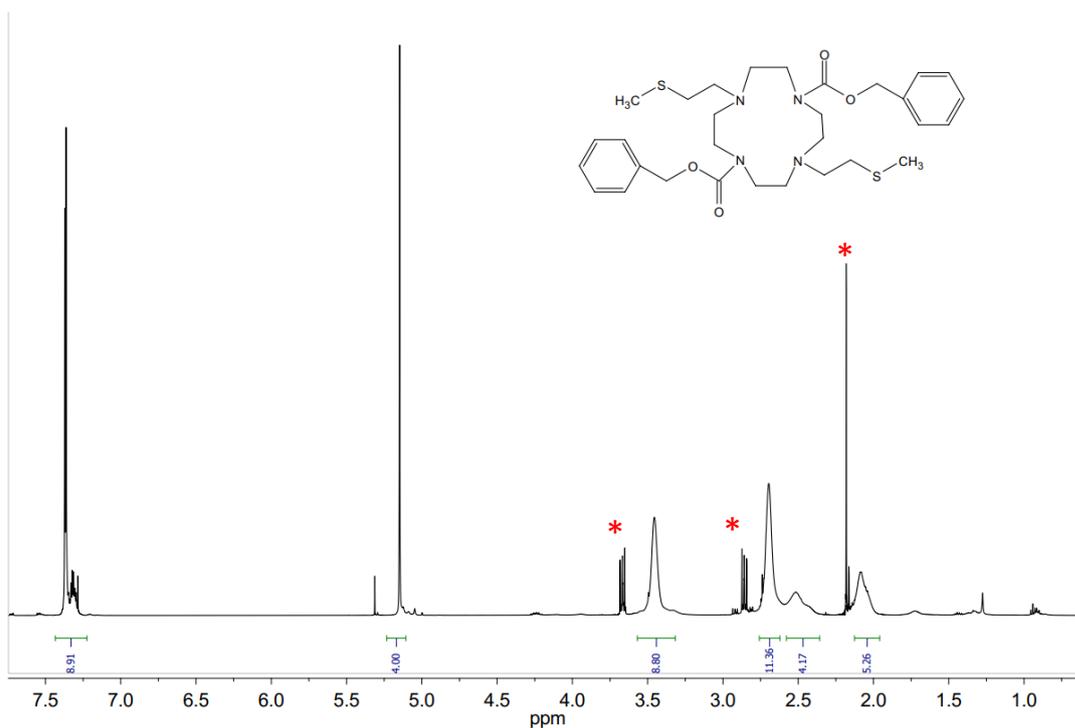


Figura A.2.16: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del composto 15a. Con gli asterischi rossi sono indicati i segnali di impurezze del 2-cloro-etilmetilsulfuro.

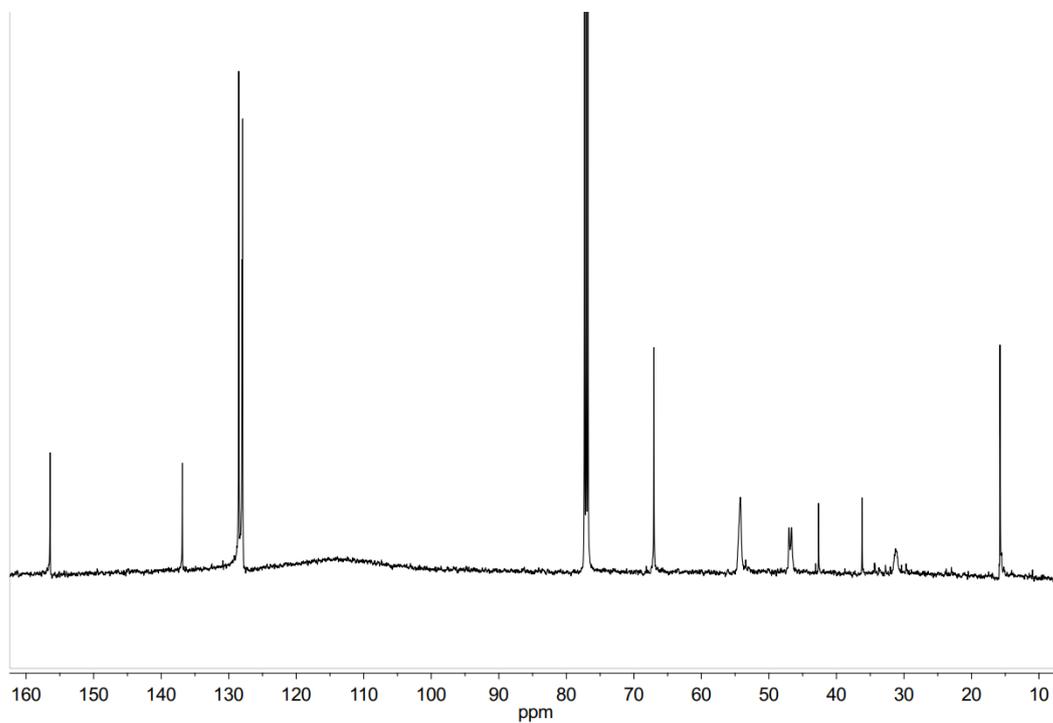


Figura A.2.2: Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del composto 15a.

### A.3 Caratterizzazioni Sintesi di di-tert-butil 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,7-dicarbossilato (15c)

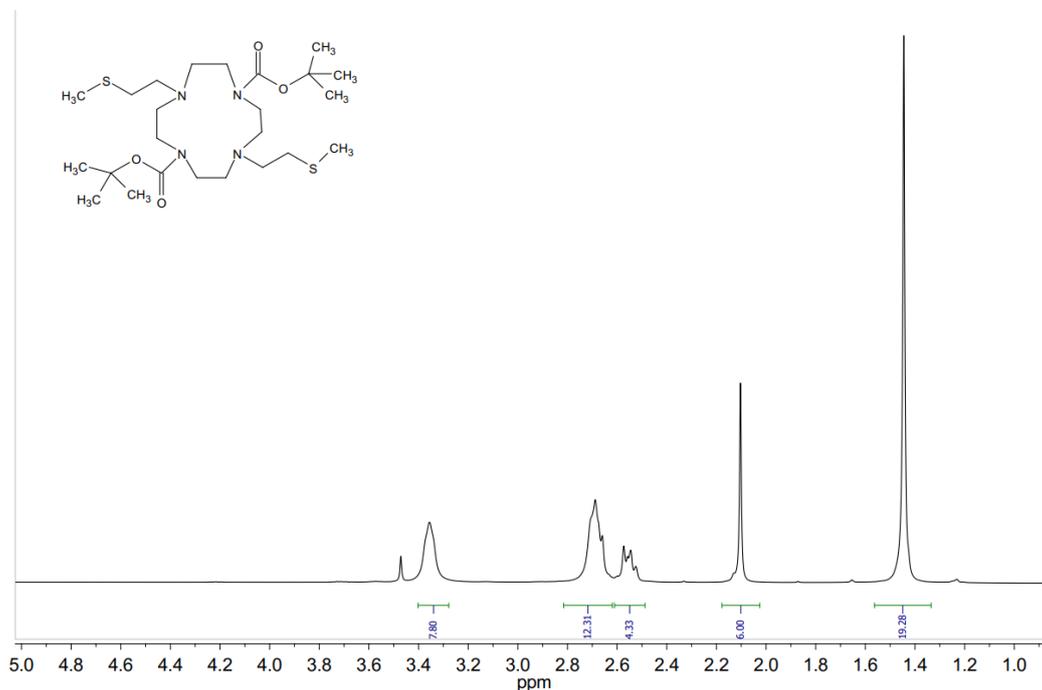


Figura A.3.1: Spettro <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del composto 15c.

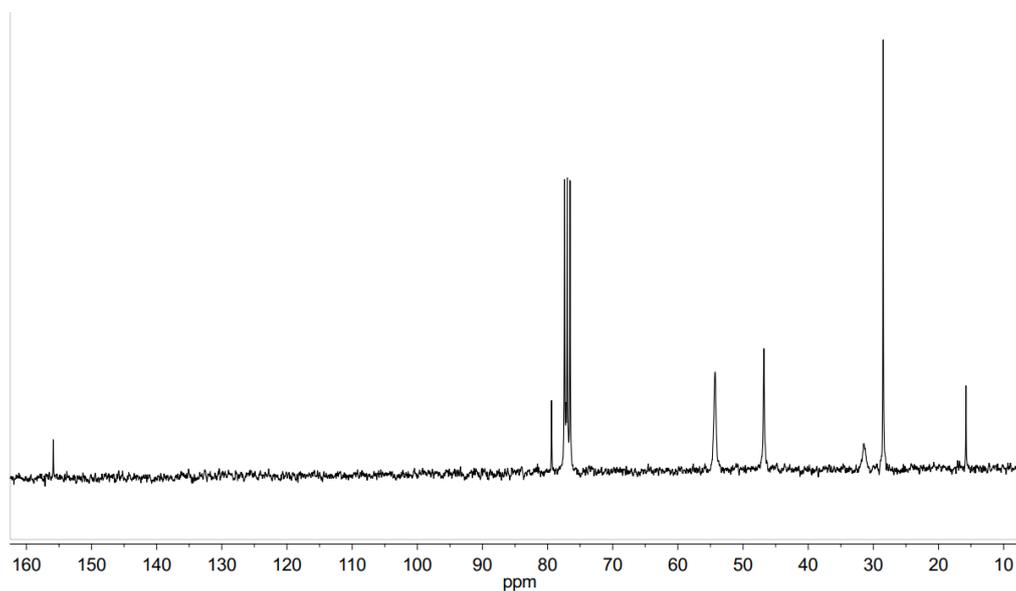


Figura A.3.2: Spettro <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del composto 15c.

#### A.4 Caratterizzazioni 1,7-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclodododcano (16)

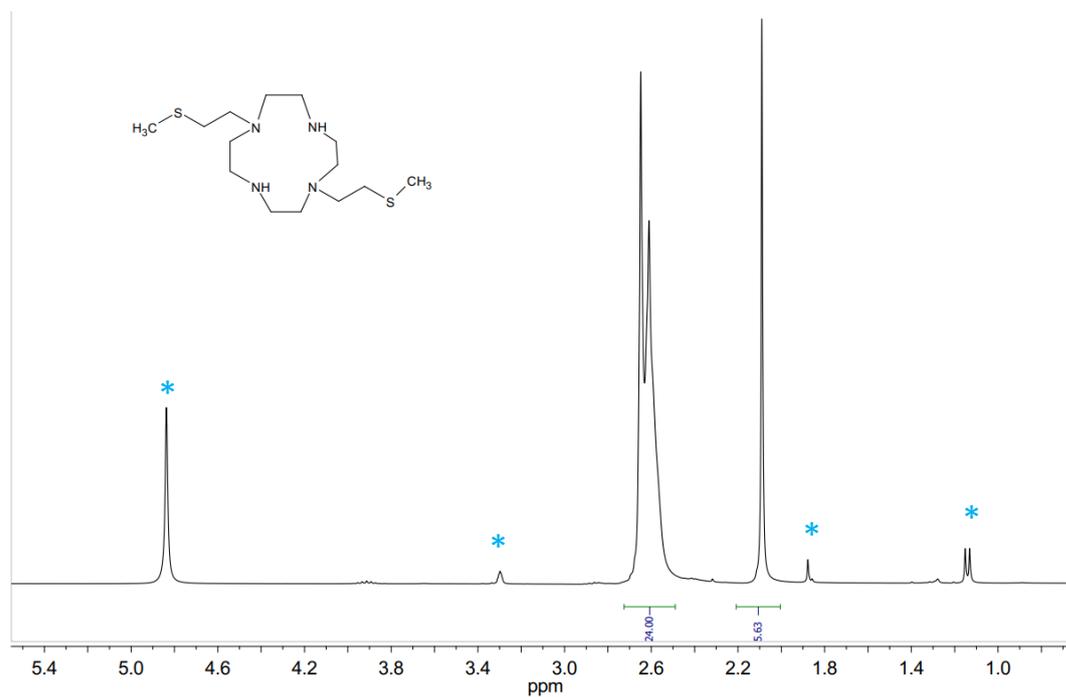


Figura A.4.1: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz MeOD) del composto 16. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

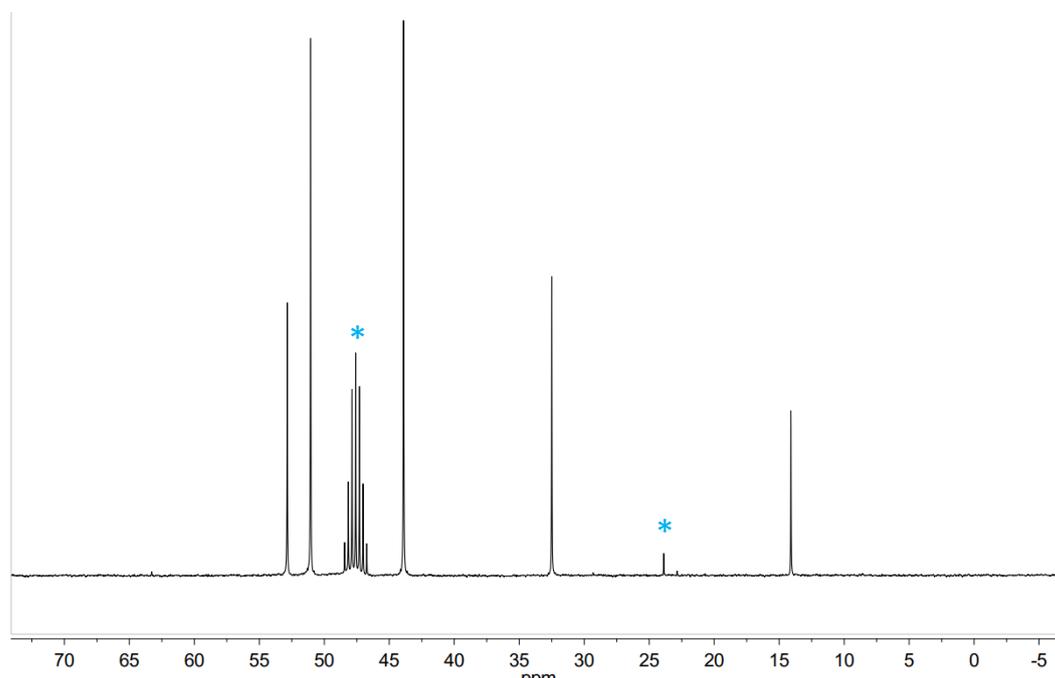


Figura A.4.2: Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  (75MHz MeOD) del composto 16. Con gli asterischi sono segnati i picchi di solventi o piccole impurezze.

## A.5 Caratterizzazioni Sintesi di 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano

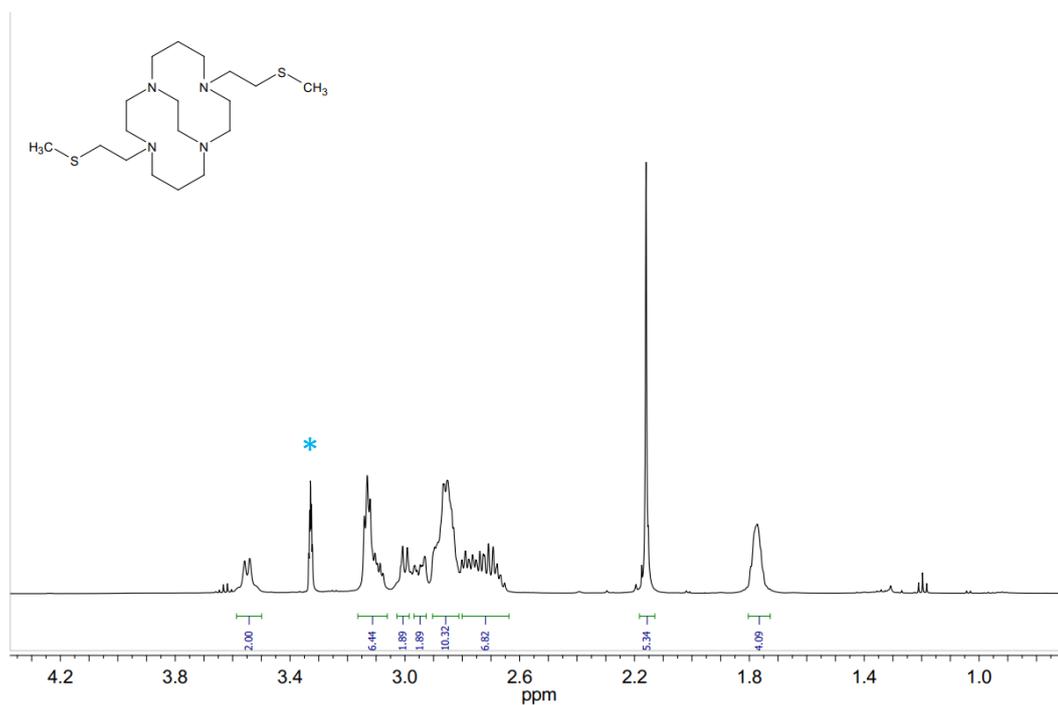


Figura A.5.1: Spettro <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, MeOD) del composto finale CB-TE2S. Con l'asterisco è indicato il picco del solvente.

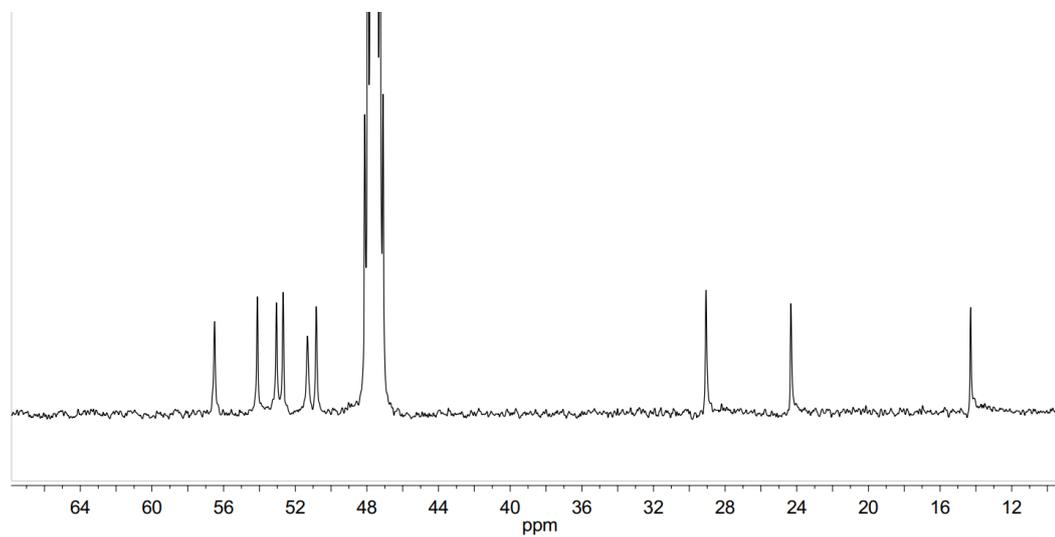


Figura A.5.2: Spettro <sup>13</sup>C-NMR (126MHz, MeOD) del composto finale CB-TE2S.

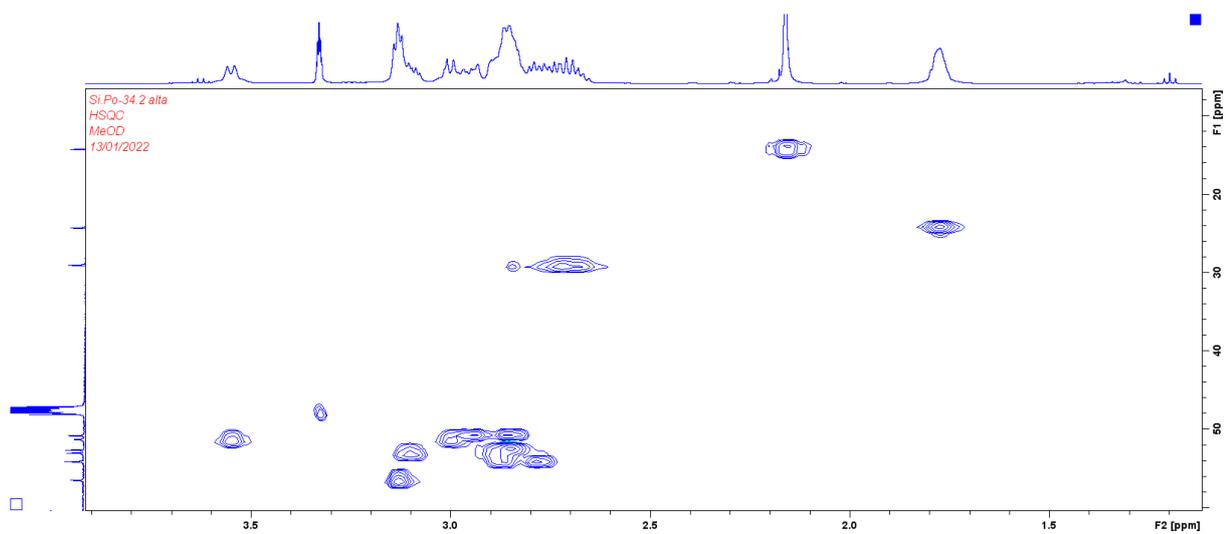


Figura A.5.3: Spettro HSQC (500MHz, MeOD) del composto finale CB-TE2S.

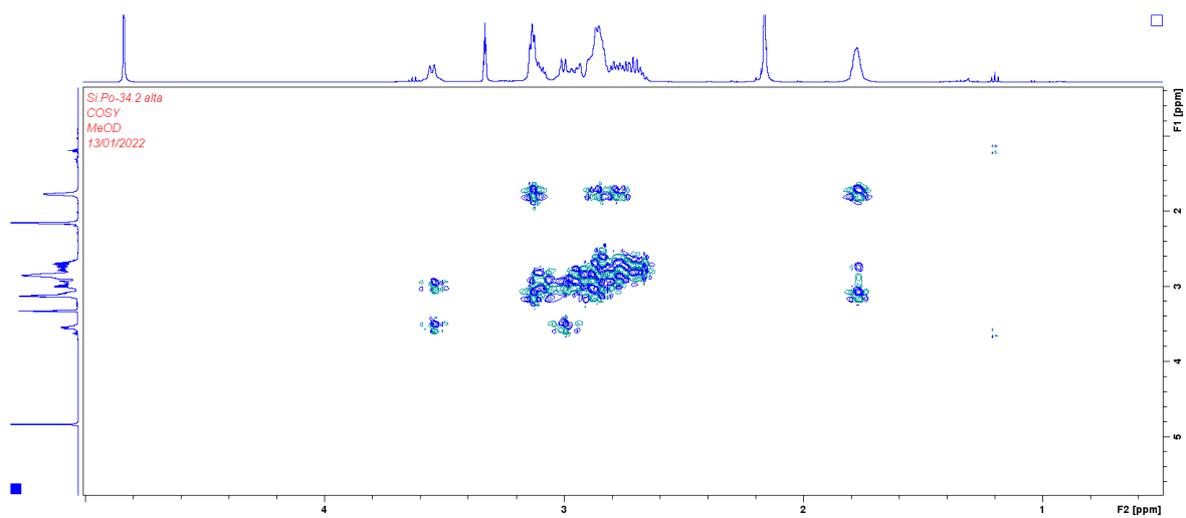


Figura A.5.4: Spettro COSY (500MHz, MeOD) del composto finale CB-TE2S.

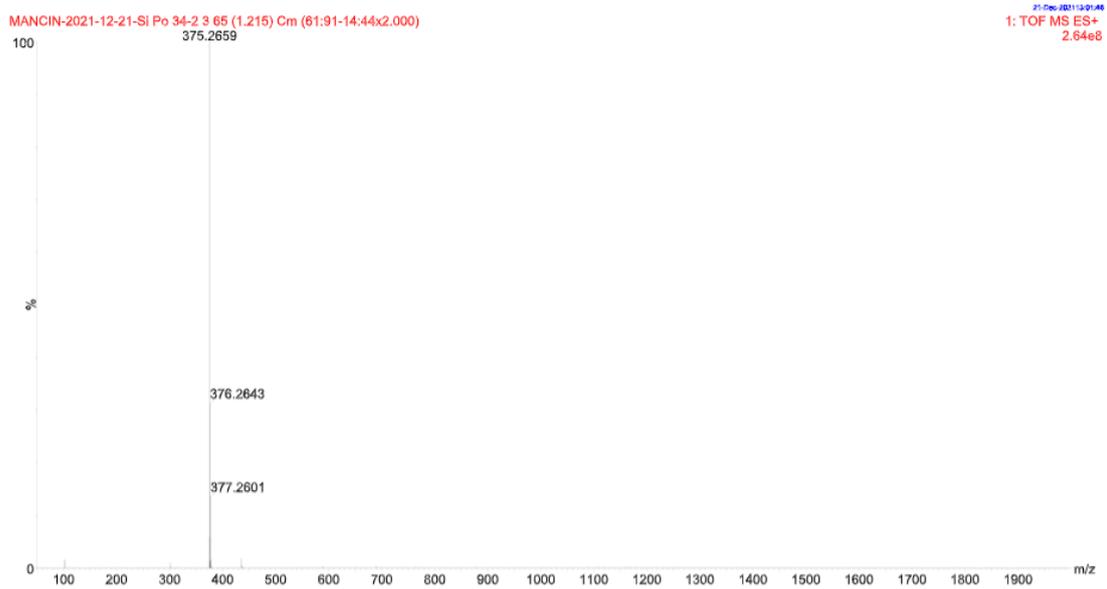


Figura A.5.5: Spettro di massa del composto finale CB-TE2S.  $m/z$  calcolato: 375.261, trovato: 375,265.



## BIBLIOGRAFIA

- Abdulwahaab, 2015** B. H. Abdulwahaab, "Mono- and Bis-Alkylation of Glyoxal-Bridged Tetraazamacrocycles Using Mechanochemistry", *J. Org. Chem.* 2016, 81, 890–898, 2015.
- Anderson, 1999** C. J. Anderson, "Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging", *Chem. Rev.*, 99, 2219–2234, 1999.
- Andrighetto, 2019** A. Andrighetto, "The ISOLPHARM project: ISOL-based production of radionuclides for medical applications", *J Radioanal Nucl Chem*, 2019.
- Dolgin, 2012** E. Dolgin, "Radioactive drugs emerge from the shadows to storm the market", *Nature Biotechnology*, 2018.
- Banerjee, 2014** S. R. Banerjee, "64Cu-Labeled Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen for PET Imaging of Prostate Cancer", *J. Med. Chem.*, 57, 2657–2669, 2014.
- Bhattacharyya, 2011** S. Bhattacharyya, "Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals", *Dalton Transactions*, issue 23, 2011.
- Boros, 2021** E. Boros, "Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy", *Chemical Reviews* 119 (2), 870-901, 2019.
- Boswell, 2003** C. A. Boswell, "Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes", *J. Med. Chem.*, 47, 1465-1474, 2004.
- Cancer Fact Sheet no. 297, 2012** World Health Organization, "World cancer factsheet", *International Agency for Research on Cancer*, 2012.
- Chilla, 2002** S. N. M. Chilla, "Importance of DOTA derivatives in bimodal imaging", *Isr. J. Chem.* 2017, 57, 1 – 10, 2017.
- Cuenot, 2008** F. Cuenot, "New Insights into the Complexation of Lead(II) by 1,4,7,10- Tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DOTAM): Structural, Thermodynamic, and Kinetic Studies", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 267–283, 2008.
- Currie, 2011** G. M. Currie, "Radionuclide production", *The Radiographer*, 2011.

- De Leon-Rodriguez, 2006** L. M. De Leon-Rodriguez, "Highly regioselective N-trans symmetrical diprotection of cyclen", *Tetrahedron Letters*, 47,6937–6940, 2006.
- Di Marco V., Tosato M., Nardella S. et al, 2020** V. Di Marco, M. Tosato, S. Nardella et al, "Chemical purification of <sup>111</sup>Ag from isobaric impurity <sup>111</sup>Cd by solid phase extraction chromatography: a proof of concept study", *Elsevier Ltd*, 2020.
- Eliel, 1975** E. L. Eliel, "Endocyclic vs. Exocyclic Attack in Nucleophilic Displacement Reactions on Five- and Six-Membered Cyclic Onium Salts", *J. Org. Chem.*, Vol. 41, No. 6,1976.
- Gansow, 1991** O. A. Gansow, "Newer Approaches to the Radiolabeling of Monoclonal Antibodies by Use of Metal Chelates", *NW/. Med. Bid. Vol. 18, No. 4, pp. 369-381*, 1991.
- Gyr, 1997** Gyr, T., "A Highly Stable Silver Complex of a Macrocyclic Derived from Tetraazatetrathiacyclen", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 24, 2786-2788, 1997.
- Hermann, 2008** P. Hermann, "Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes", *Dalton Trans.*, 3027–3047, 2008.
- Le Long, 2021** E. Le Long, "Complexation of C-Functionalized Cyclams with Copper(II) and Zinc(II): Similarities and Changes When Compared to Parent Cyclam Analogues", *Inorganic Chemistry*, 60 (15), 10857-10872, 2021.
- Lima, 2014** L. M. P. Lima, "Monopicolinate Cross-Bridged Cyclam Combining Very Fast Complexation with Very High Stability and Inertness of Its Copper(II) Complex", *Inorg. Chem.*, 53, 5269–5279, 2014.
- Liu, 2008** S. Liu, "Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides", *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 1347-1370, 2008.
- Miyahara,1999** Y. Miyahara, "The Proton Cryptate of Hexaethylenetetramine", *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, No. 7, 1999.
- Nicotra, 2018** M. Nicotra, "Medicina Nucleare: stato dell'arte e sfide future", AIFA. 2018.
- Odendaal, 2011** A Y. Odendaal, "Isomeric Trimethylene and Ethylene Pendant-armed Cross-bridged Tetraazamacrocycles and in Vitro/in Vivo Comparisons of their Copper(II) Complexes", *Inorg. Chem.*, 50, 3078–3086, 2011.
- Persson, 2013** M. Persson, "Improved PET Imaging of uPAR Expression Using new <sup>64</sup>Cu-labeled Cross-Bridged Peptide Ligands: Comparative in vitro and in vivo Studies", *Theranostics*, Vol. 3, Issue 9, 2013.
- Roignant, 1995** A Roignant, "Mono- and N1,N7-Dialkylation of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane via Silicon Protection", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995

- Romogida, 2013** Caterina F. Romogida, "Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy", *Chem. Commun.*, 2013, 49, 4720
- Schubiger, 1996** P. A. Schubiger, "Vehicles, Chelators, and Radionuclides: Choosing the "Building Blocks" of an Effective Therapeutic Radioimmunoconjugate", *American Chemical Society*, 1997.
- Srivastava, 2011** C. S. Srivastava, "Therapeutic Radionuclides: Production, Physical Characteristics, and Applications", *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2013.
- Tolmachev, 2018** V. Tolmachev, "Molecular design of radiocopper labeled Abody molecules", *Scientific Reports*, 2018.
- Tosato, 2020** M. Tosato, "Highly Stable Silver(I) Complexes with Cyclen-Based Ligands Bearing Sulfide Arms: A Step Toward Silver-111 Labeled Radiopharmaceuticals", *Inorganic Chemistry* 59 (15), 10907-10919, 2020.
- Tosato, 2020** M. Tosato, "Toward novel sulphur-containing derivatives of tetraazacyclododecane: synthesis, acid-base properties, spectroscopic characterization, DFT calculations, and cadmium(II) complex formation in aqueous solution", *New J. Chem.*, 44, 8337, 2020.
- Tosato, Di Marco et al.** Paper in preparation
- Vermeulen, 2019** K. Vermeulen, "Design and Challenges of Radiopharmaceuticals", *Seminar in Nuclear Medicines*, 2019.
- Weisman, 1996** G. R. Weisman, "Synthesis and transition-metal complexes of new cross-bridged tetraamine Ligands", *Chem. Community*, 1996.
- Wong, 2000** E. H. Wong, "Synthesis and Characterization of Cross-Bridged Cyclams and Pendant-Armed Derivatives and Structural Studies of Their Copper(II) Complexes", *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 10561-10572, 2000.
- Woodin, 2005** Katrina S. Woodin, "Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4829-4833, 2005.