



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Università degli studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Anno accademico 2023/2024

**STUDI SULLA FORMAZIONE DI UN PONTE
BICICLICO SU UN COMPLESSO
MACROCICLICO DI La(III)**

Relatore: Prof. Lorenzo Tei

Co-relatore: Dott. Pietro Piacenza

Candidato:

Matteo Soncin

CAPITOLO 1-INTRODUZIONE

1.1 MEDICINA NUCLEARE

La medicina nucleare è un campo della medicina che sfrutta il decadimento di isotopi radioattivi per ottenere una precoce diagnostica e la terapia di diversi tipi di patologie. A seconda del tipo di decadimento, e dunque dal tipo di particella emessa, l'isotopo verrà impiegato in terapia o in imaging diagnostico. Ad esempio, le particelle α , caratterizzate da un'alta potenza ma un raggio d'azione ridotto, insieme alle particelle β^- , meno energetiche ma più penetranti, vengono impiegate in terapia. Per quanto riguarda l'imaging invece si può sfruttare l'emissione di positroni tramite la tecnica PET (**P**ositron **E**mission **T**omography). In entrambi gli utilizzi l'isotopo radioattivo deve far parte di una molecola progettata appositamente per andare a localizzarsi in modo selettivo sulla zona interessata.

1.2 DECADIMENTO RADIOATTIVO

Il decadimento radioattivo è un processo spontaneo che permette di raggiungere la stabilità a nuclidi instabili, spesso detti nuclidi genitori. I nuclidi instabili decadendo emettono radiazioni, si convertono in isotopi detti anche nuclidi figli, i quali possono a loro volta essere instabili, questo porta a un ulteriore decadimento sino al raggiungimento di un nuclide stabile.

Il decadimento può essere catalogato in tre tipologie a seconda della particella emessa, come chiarito dall'esperimento di Rutherford che mostra il comportamento della particella in presenza d'un campo magnetico(Fig.1.1)

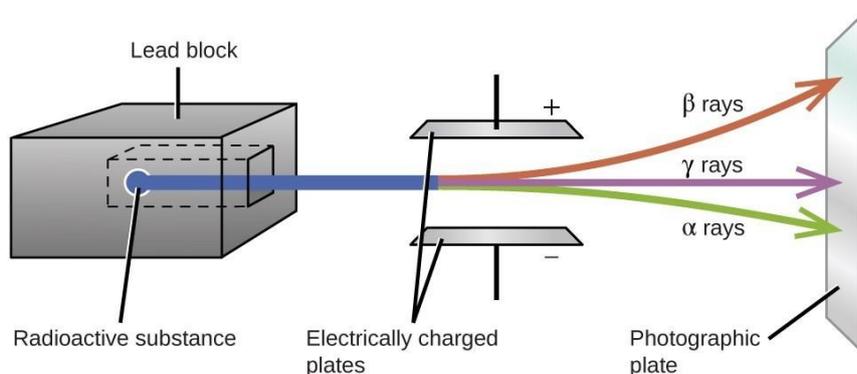


FIG.1.1 Esperimento di Rutherford da "libre text chemistry"

1) Decadimento α : consiste nell'emissione di una particella α , cioè di un nucleo di ${}^4_2\text{He}$ carico positivamente (Fig. 1.2). La particella α è dotata di alta energia ma anche di un basso potere penetrante. Il decadimento di questo tipo è solito di nuclidi instabili pesanti ($Z > 83$). Le particelle emesse, in presenza di un campo magnetico esterno, avranno la tendenza a deviare verso il polo negativo;

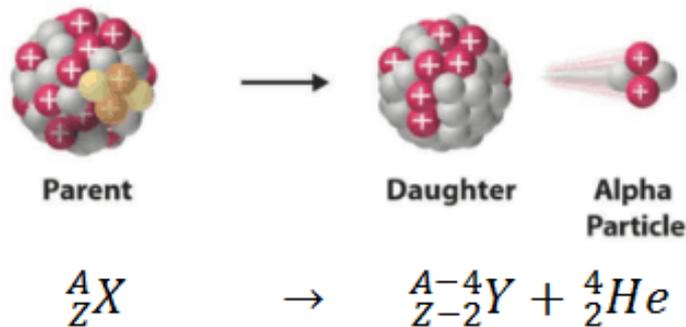


Fig. 1.2. decadimento alfa da "nuclear power"

2) Decadimento β : comprende tre vie di decadimento che il nuclide può seguire per raggiungere la stabilità

- Decadimento β^- , consiste nell'emissione di un elettrone a alta energia, che in un campo magnetico subirà una deviazione verso il polo positivo, e di un antineutrino, con conversione di un neutrone a protone
- Decadimento β^+ , consiste nell'emissione di un positrone, con conseguente conversione di un protone a neutrone accompagnata dall'emissione di un neutrino (Fig. 1.3)

I positroni emessi, a seguito di un incontro con la sua antiparticella ossia l'elettrone, possono andare incontro al fenomeno di annichilazione, questo processo porta all'emissione di due raggi γ , in direzioni opposte detti back to back .

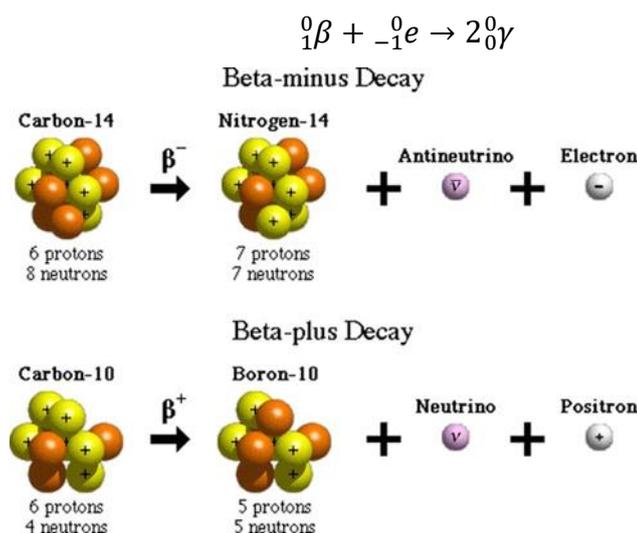


FIG.1.3 decadimento β^- e β^+ da JLab Science education

- Cattura elettronica di un elettrone all'interno del nucleo con conversione a neutrone di un protone seguita da una cascata di elettroni che vanno a riempire la lacuna formata con l'emissione di fotoni ad alta energia (Fig. 1.4)

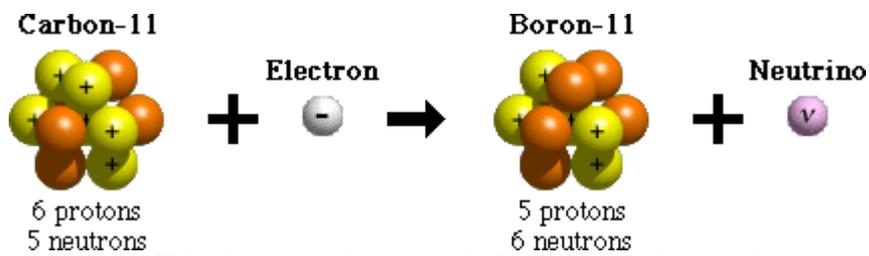


FIG.1.4 cattura elettronica da JLab Science education

- 3) Decadimento γ : consiste nell'emissione di fotoni altamente energetici prodotti dal ritorno allo stato fondamentale di isotopi eccitati tramite altri tipi di decadimento. I raggi gamma, essendo privi di carica, non vengono deviati in nessun modo in presenza di un campo magnetico esterno (Fig. 1.5)

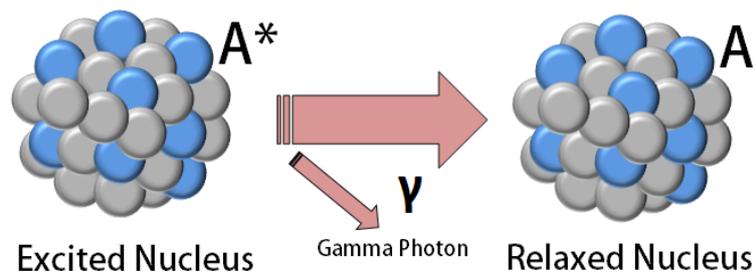


Fig 1.5 decadimento γ "energy education"

La via in cui un nuclide decade non è casuale ed è influenzata da diversi fattori, oltre che alla massa totale anche il numero di neutroni (N), quello di protoni (Z) e il loro rapporto (N/Z) influiscono sul metodo di decadimento di un nuclide. (Fig. 1.6)

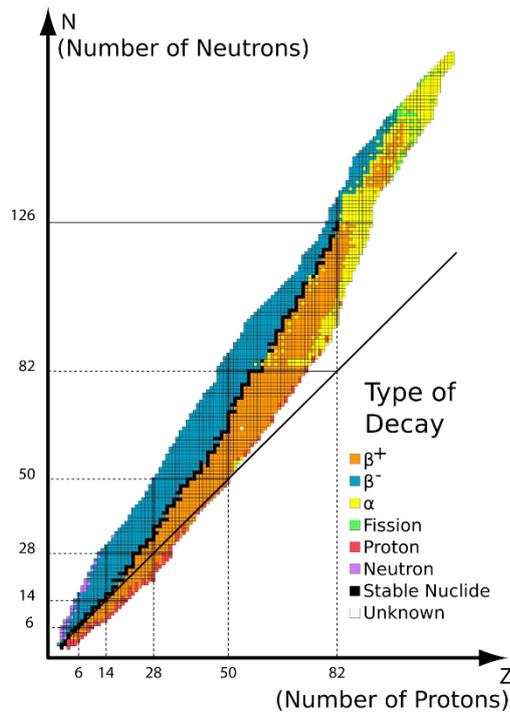


Fig. 1.6 diagramma di decadimento in funzione di N/Z

Per i nuclidi leggeri si ha una condizione di stabilità quando $N/Z=1$, questo rapporto aumenta gradualmente all'aumentare di Z fino a raggiungere l'atomo pesante più stabile, il bismuto con $Z=83$. Si può dire che, nuclidi con un basso rapporto N/Z e ricchi di protoni hanno la tendenza ad avere decadimenti β con emissione di positroni o con cattura elettronica andando a convertire un protone in neutrone e perciò aumentando il rapporto N/Z . Nuclei ricchi di neutroni, al fine di abbassare il rapporto N/Z subiranno un decadimento β^- con l'emissione di elettroni e la conseguente conversione di un neutrone in un protone.

Nuclei più pesanti del bismuto, cioè con $Z>83$, avranno la tendenza a decadere emettendo particelle α , in questo modo possono abbassare contemporaneamente il numero di protoni e quello di neutroni.

1.2.1 Cinetica del decadimento

I processi di decadimento sono caratterizzati da una loro velocità indipendente da condizioni esterne. Questa velocità caratteristica si può descrivere come la variazione di nuclidi (N) nel tempo

$$v = -\frac{dN}{dt}$$

Il numero di decadimenti per unità di tempo sarà direttamente proporzionale al numero di nuclidi presi in esame essendo infatti

$$v = k[N]$$

Ove k è una costante tipica del nuclide preso in esame.

È possibile ottenere il tempo di emivita, o tempo di dimezzamento, del nuclide preso in esame ponendo $[N]_t = 1/2[N]_0$ e elaborando le due formule di v . Si ottiene così

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Il tempo di emivita mi indica il tempo necessario affinché la metà dei nuclidi di un campione radioattivo preso in esame vada incontro a decadimento, questo tempo, come è osservabile dalla formula, è indipendente dal numero di nuclei ma dipende solo ed esclusivamente da k . Quindi il tempo di emivita dipende unicamente dal tipo di nucleo preso in esame e non dalla sua quantità o da altri parametri.

2 IMAGING DIAGNOSTICO

Con imaging diagnostico si intendono particolari tecniche diagnostiche che permettono di ottenere in maniera non invasiva e in tempo reale informazioni funzionali e morfologiche dei tessuti interni di un organismo. Le informazioni così ottenute permettono l'individuazione precoce o il monitoraggio di numerose patologie. Attraverso l'uso di sonde, cioè sfruttando la loro affinità per un marker o per un tessuto alterato, è perciò possibile andare a individuare e caratterizzare specifici processi biologici in vivo portando ad una precoce diagnosi, al monitoraggio di patologie e al successivo trattamento mirato e immediato con aumento della probabilità di guarigione [1,2]

Esempi di tecniche di imaging sono la **Risonanza Magnetica per Immagini (MRI)**, la **Tomografia Computerizzata (CT)**, la **Tomografia a Emissione di Positroni (PET)** e la **Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo (SPECT)**. Di queste tecniche solo le ultime due, PET e SPECT, fanno parte della medicina nucleare.

Se nel caso del MRI può essere utile, ma non fondamentale, l'utilizzo di molecole studiate appositamente, come gli agenti di contrasto basati su complessi di metalli paramagnetici, al fine di migliorare il contrasto delle immagini, nella PET invece l'utilizzo di un radiofarmaco è necessario all'applicazione della tecnica.[3]

Le tecniche elencate hanno prestazioni differenti (come mostrato in Fig. 2.1): in particolare, SPECT e PET possiedono un'elevata sensibilità che permette l'utilizzo di una minima quantità di radiofarmaco. Al contrario, CT e MRI sono meno sensibili e richiedono perciò una maggior quantità di agente di contrasto per poter osservare un contrasto nell'immagine^[4,5]. Tuttavia l'andamento della risoluzione spaziale è inverso, con PET e SPECT che possiedono una risoluzione spaziale nettamente inferiore rispetto a MRI e CT.

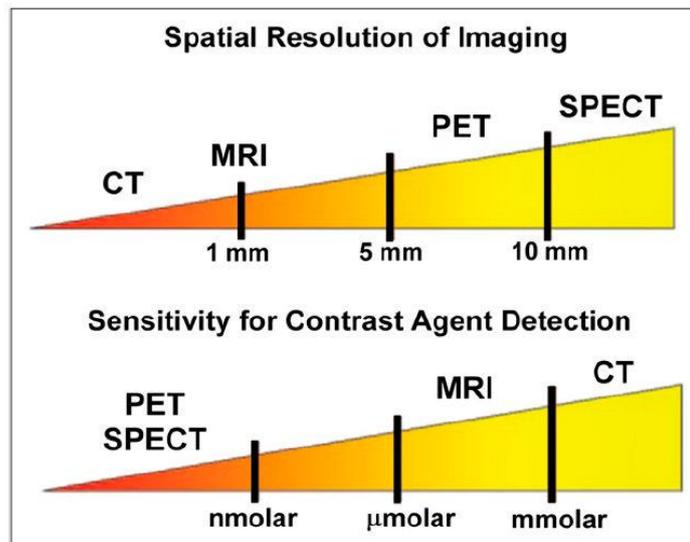


FIG.2.1 confronto di risoluzione e sensibilità delle tecniche di imaging

Al fine di sfruttare i punti di forza di più tecniche è possibile combinare due tecniche di imaging, ottenendo una tecnica ibrida, in modo da avere un miglior risultato diagnostico sullo stato del paziente. È possibile ad esempio accoppiare la PET a una seconda tecnica che permetta di localizzare in modo univoco la fonte delle radiazioni emesse. È comune l'accoppiamento PET/CT, dove la PET fornisce informazioni funzionali mentre la CT, o anche talvolta l'MRI, ci dà la localizzazione del sito preso in esame come mostrato in fig. 2.2.

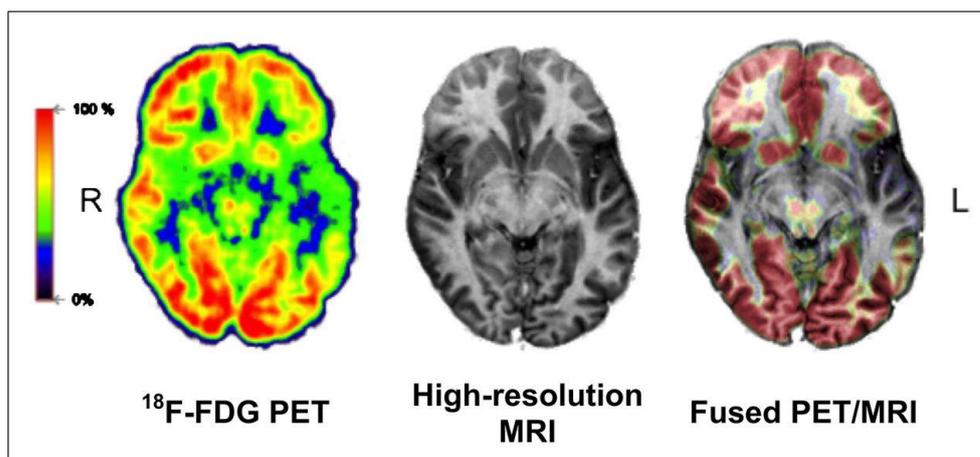


FIG 2.2 Accoppiamento PET/MRI in una scansione del cervello *journal of nuclear medicine*

2.1 MRI

La risonanza magnetica per immagini è una tecnica diagnostica non invasiva che, grazie all'analisi NMR degli ^1H contenuti dell'acqua contenuta nei tessuti, è in grado di produrre immagini in tre dimensioni del corpo umano. In base a come l'acqua interagisce con i tessuti è perciò possibile differenziarli (Fig. 2.3) e anche individuare eventuali tessuti malati.



FIG 2.3 immagine MRI del cervello

La tecnica sfrutta delle radiazioni elettromagnetiche nel campo delle radiofrequenze per produrre il segnale; essendo queste radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti, esse risultano assolutamente innocue per il paziente. L'intensità del campo magnetico applicato inoltre varia a seconda del tipo di tessuto interessato dalla diagnosi.

L'intensità del segnale ottenuto dipende sostanzialmente dal tempo di rilassamento (T_1 e T_2) e dalla concentrazione di acqua, e di conseguenza di ^1H , nella zona interessata.

Per ottenere immagini più definite è possibile sfruttare agenti di contrasto basati su metalli paramagnetici, grazie a loro è possibile andare a evidenziare più nel dettaglio la zona del corpo in cui si accumulano.

2.2 CT

La tomografia computerizzata è una tecnica non invasiva di imaging che impiega i raggi X. La tecnica impiega una sorgente e un rivelatore di raggi X mobili che ruotano attorno al paziente per generare immagini bidimensionali. Queste immagini dei piani analizzati possono essere interpretate singolarmente oppure riunite insieme per ottenere un'immagine in tre dimensioni.

Per migliorare la visualizzazione è possibile impiegare particolari agenti di contrasto (Fig. 2.4). Questi agenti, normalmente assunti per via orale o tramite iniezione, sono di norma a base di solfato di bario o di composti iodurati.

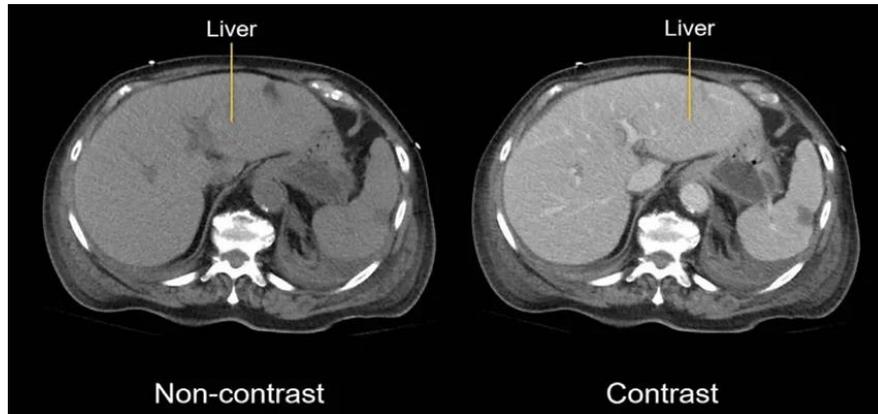


FIG 2.4 scan CT addominale senza contrasto(sinistra) e con contrasto (destra)

2.3 SPECT

La tomografia a emissione di fotone singolo è una tecnica diagnostica che, tramite l'utilizzo di particolari radiofarmaci permette di ottenere informazioni sul tessuto (Fig. 2.5).

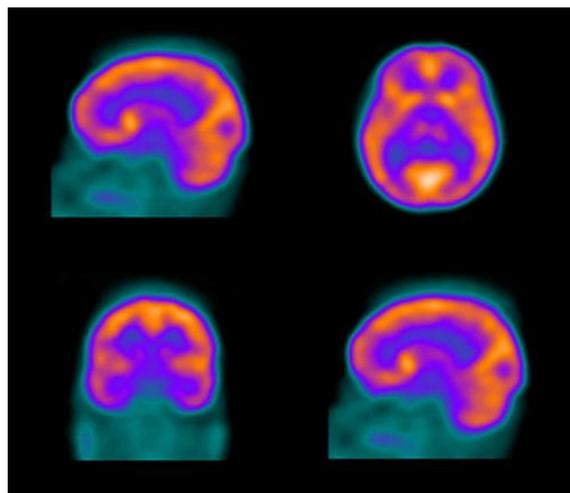


FIG.2.5 Immagine SPECT del cervello

La tecnica permette di ottenere immagini tridimensionali dei tessuti interessati riportate come sezioni assiali della parte del corpo del paziente analizzata.

I radiofarmaci impiegati nella tecnica utilizzano nuclidi instabili che emettono raggi γ in modo diretto e non tramite annichilazione di positroni. Si adopera una gamma camera che ruota attorno al paziente per permettere l'acquisizione di svariate proiezioni bidimensionali a diversi angoli. L'acquisizione delle proiezioni viene generalmente fatta con un intervallo di 6° ; si può

compiere una rotazione completa di 360 ° attorno al paziente per ottenere un'immagine tridimensionale ottimale

Dato che la SPECT permette un'accurata localizzazione nello spazio tridimensionale, può essere impiegata per fornire informazioni su funzionalità localizzate degli organi interni. A seconda della zona interessata vengono impiegati diversi tipi di gamma emettitori.

In neuroimaging viene impiegato il ^{99m}Tc un isomero metastabile del tecnezio in grado di emettere raggi gamma. Quando viene complessato da un chelante adatto, come l'HMPAO (esametil-propilene-amino-ossima) (Fig2.6.), ^{99m}Tc è in grado di essere assorbito dal tessuto cerebrale in modo proporzionale al flusso sanguigno, permettendo la rilevazione del flusso di sangue da parte della gamma camera. Dato che il flusso è strettamente correlato al metabolismo locale l'uso di ^{99m}Tc -HMPAO permette di rilevare il metabolismo cerebrale regione per regione.

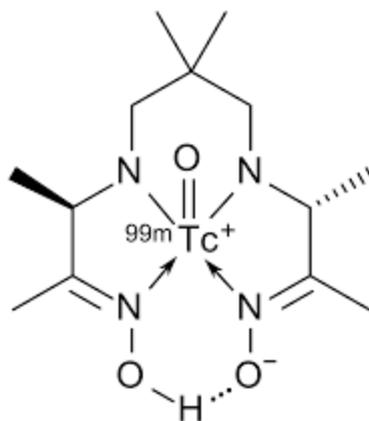


Fig.2.6. struttura di ^{99m}Tc -HMPAO

2.4 PET

La tomografia a emissione di positroni, come la SPECT, è una tecnica diagnostica non invasiva della medicina nucleare. La tecnica necessita l'utilizzo di radiofarmaci basati su isotopi instabili legati ad una molecola in grado di localizzarsi in un tessuto in quanto affine per un determinato marker patologico o a causa del metabolismo cellulare accelerato dei tessuti patologici (come nel caso del ^{18}F -FDG). Questi, decadendo, emettono positroni nella zona patologica.^[6]

Nel corpo umano un positrone emesso da un radio tracciante può muoversi, a seconda della zona di accumulo, al massimo di 1 o 2 mm. Dopo avere percorso questa distanza, il positrone subisce un processo di annichilazione causato da un elettrone nei dintorni.

Il prodotto dell'annichilazione tra un elettrone e un positrone è una coppia di raggi gamma; questi hanno direzione opposta con un angolo tra i due fotoni di 180° , fenomeno detto *back to back*. Secondo l'equazione di Einstein, l'energia rilasciata quando le due particelle non sono in movimento è di 511 keV corrispondente ad una lunghezza d'onda di $2,425 \cdot 10^{-12}$ m, un valore associabile, nello spettro elettromagnetico, a dei raggi gamma.

Gli isotopi più utilizzati appartengono ad elementi già presenti nel corpo umano o al massimo ad elementi che, decadendo, lo diventano; esempi sono ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{238}I e il più utilizzato ^{18}F . Altri elementi o ioni metallici possono essere utilizzati ma, per prevenire la loro dispersione nei tessuti, fenomeno che potrebbe dare problemi di tossicità, devono essere incorporati in molecole organiche. Le scansioni tramite PET permettono di studiare nel dettaglio il metabolismo di una determinata patologia, a seconda del tracciante scelto.

Dopo l'inoculazione del radiofarmaco il paziente viene inserito in una struttura circolare, questo non è altro che un anello di scintillatori (Fig.2.7.) la cui funzione è rilevare entrambi i raggi gamma emessi dall'annichilazione dei positroni prodotti dal tracciante radioattivo.



Fig. 2.7. Un moderno scanner PET.

A differenza della SPECT, nella PET i fotoni colpiscono la gamma camera con un angolo di 180° in un brevissimo lasso di tempo permettendo una migliore acquisizione di immagine. È possibile infatti riprodurre in maniera molto precisa l'esatta posizione di dove l'annichilazione è avvenuta, dando una risoluzione e una definizione più alta del tessuto (Figura 2.8).

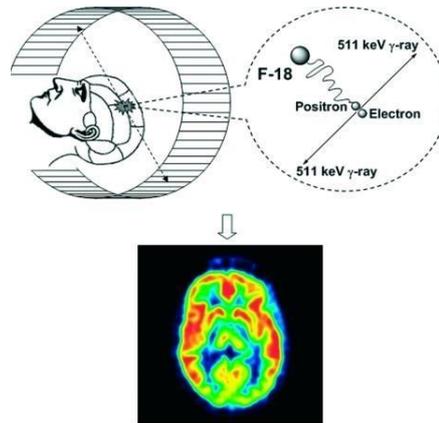


Fig. 2.8. Schema rappresentativo di una scansione PET.

CAPITOLO 3: Sonde

Le sonde più utilizzate al giorno d'oggi sia in tecniche di imaging che in terapia sono principalmente composte da

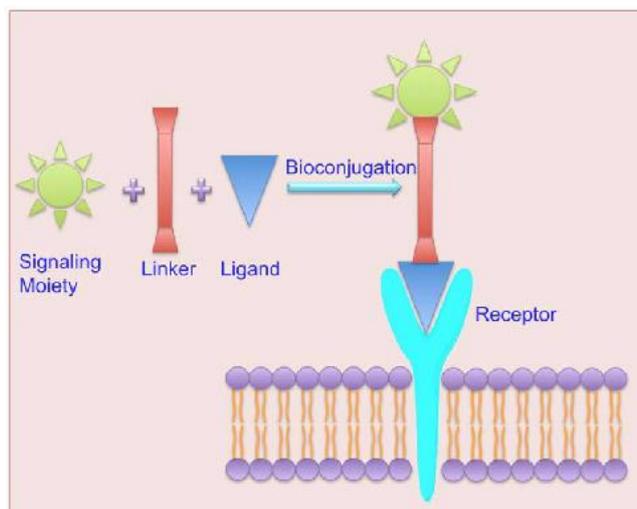


Fig.3.1. schema di una sonda molecolare "researchgate"

- Un imaging reporter, ossia una componente attiva che permette la visualizzazione all'interno del corpo, consente in sostanza la generazione delle particelle α o β oppure la generazione dell'immagine tipica della tecnica; nel caso della terapia radionuclidica la componente attiva permette il rilascio di particelle terapeutiche.
- Un vettore: può essere un anticorpo un peptide o una proteina, il suo scopo è permettere l'accumulo della sonda nella zona di interesse grazie alla sua affinità con una molecola marker;

- Un linker: individuato per minimizzare le interazioni tra le interazioni reciproche esistenti tra le due funzionalizzazioni cui è legato ed inoltre in modo da evitare una modifica nell'effetto e localizzazione del farmaco nell'organismo.^[3]

3.1 Caratteristiche delle sonde

L'agente utilizzato varia a seconda della tecnica impiegata, tuttavia, se si prendono d'esempio le sonde a base di complessi metallici, le proprietà che queste devono presentare sono analoghe tra di loro. Prendendo in considerazione le sonde a base di complessi metallici paramagnetici impiegati in MRI, emettitori di positroni in PET o di particelle alfa o beta per la terapia^[3], queste devono tutte avere:

- alta affinità verso il target: in questo modo posso avere un accumulo nel tessuto di interesse insieme a una lenta espulsione dal corpo;
- alta specificità verso un determinato marker molecolare: questa permette di minimizzare le interazioni con tessuti che non sono di interesse. Nel caso dell'imaging, un'alta specificità permette di ottenere immagini più semplici da interpretare;
- alta sensibilità: il farmaco deve essere in grado di riconoscere il marker anche in concentrazioni molto basse, ossia nei primi stadi di un'eventuale patologia; inoltre una sensibilità alta permette di utilizzare minor quantità di farmaco;
- alta stabilità in vivo: la struttura deve essere stabile ed inerte in ambiente fisiologico

Con stabilità si intende sia quella termodinamica che l'inerzia cinetica. La stabilità termodinamica è una misura della forza di interazione tra il metallo complessato e il legante. È dovuta principalmente dalla compatibilità tra acidi e basi di Lewis prese in esame. Secondo la teoria HSAB (Fig. 3.2) si hanno interazioni forti tra acidi hard e basi hard e tra acidi soft e basi soft

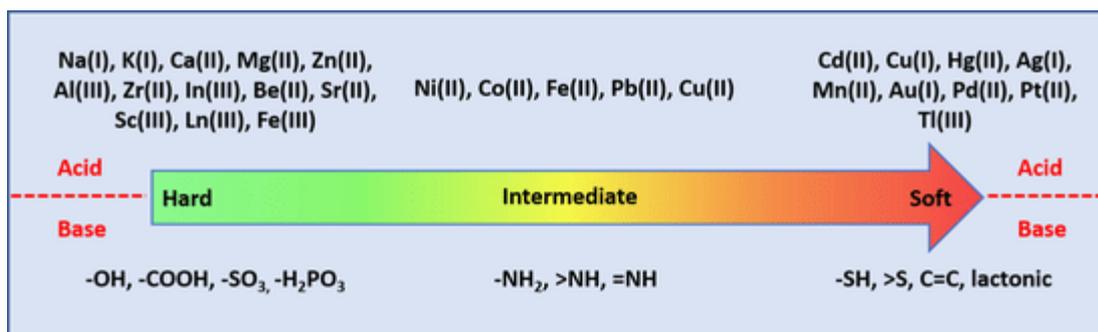


FIG.3.2 scala di acidi e basi hard e soft^{10 tesi pp}

Altro parametro influente è la dimensione dello ione complessato. Questa infatti va a influenzare la struttura del legante da utilizzare. Per cationi metallici di piccole dimensioni gli anelli chelati a 6 termini presentano una stabilità superiore, mentre per i cationi di più grandi dimensioni invece si ha più stabilità con anelli chelati a 5 termini (FIG. 3.3), a causa dell'ottimizzazione degli angoli di legame e della lunghezza dei legami di coordinazione.

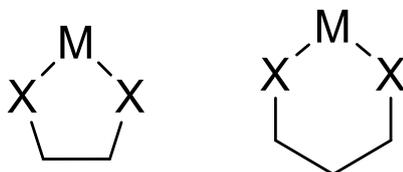


FIG.3.3 Struttura di anelli chelati a 5 o 6 termini

Per ragioni entropiche è anche favorito l'utilizzo di legante polidentati, rispetto alle loro analoghe controparti monodentate, oltre al vantaggio dato da questo effetto chelato, andando a scegliere il giusto legante, si può anche andare a sfruttare il vantaggio entalpico dato dall'effetto macrociclo^[3]

L'inerzia cinetica di questi complessi è da valutare in condizioni fisiologiche: infatti, la presenza di anioni o cationi competitivi o di variazioni di pH non deve portare il complesso a rilasciare il metallo, in quanto quest'ultimo potrebbe avere un'attività tossica o citotossica anche sui tessuti sani del paziente.

Infine il composto deve presentare una bassa tossicità, quindi non deve causare danni al paziente specie a livello renale, in quanto spesso via di espulsione del farmaco dall'organismo. Tuttavia, viste le bassissime quantità di farmaco impiegate, spesso gli effetti sono trascurabili.

3.2 Sonde di uso comune in imaging nucleare

Nel campo della PET una delle sonde più comunemente usate è il fluorodeossiglucosio-¹⁸F (¹⁸F-FDG), che viene impiegato per valutare la presenza di tumori. Questo analogo del glucosio presenta un atomo di ¹⁸F al posto di un OH in posizione 2 (FIG. 3.4)

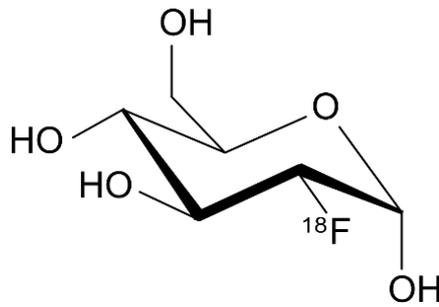


Fig. 3.4 struttura del ^{18}F -FDG

La molecola è in grado di dare informazioni riguardo l'incremento di consumo di glucosio e, di conseguenza, sull'aumento del tasso di glicolisi da parte delle cellule tumorali. Questo processo metabolico appare mesi o addirittura anni prima che avvengano alterazioni morfologiche dell'organo.

La molecola sfrutta l'effetto Warburg^[7] per diagnosticare i tumori. Gran parte dei tessuti tumorali, infatti, a causa dell'incrementata attività glicolitica (circa 200 volte quelle di una cellula normale) mostrano un elevato consumo di glucosio. Il rapido consumo di glucosio potrebbe essere causato dalla sovraespressione dell'enzima esochinasi, il primo enzima della glicolisi che catalizza la conversione del glucosio in glucosio-6-fosfato. Una volta che il glucosio viene trasformato in glucosio-6-fosfato è incapace di lasciare la cellula; perciò nelle cellule tumorali, dove spesso si ha un'assunzione di molecole dall'esterno della cellula più alto del normale, si risconterà un maggiore accumulo di glucosio-6-fosfato. Le caratteristiche di ^{18}F -FDG la rendono un'ottima molecola per studiare l'effetto Warburg, infatti questa può agire come substrato per l'esochinasi venendo "catturata" dalla cellula e stipata al suo interno, l'assunzione della molecola da parte delle cellule sarà nettamente più marcata per le cellule tumorali, il radiotracciante andrà ad accumularsi dunque all'interno della cellula tumorale stessa.

^{18}F -FDG non è specifico solo verso cellule tumorali, l'incremento di attività glicolitica infatti può essere osservata anche in altre tipologie di patologie come malattie autoimmuni, infiammazioni o malattie neurodegenerative^[8], un esito positivo dunque potrebbe non per forza indicare la presenza di un tumore.

Uno svantaggio della molecola è che questa non è molto sensibile verso determinati tipi di tumori, come citato in precedenza ^{18}F -FDG sfrutta principalmente l'effetto Warburg, tuttavia non tutti i tipi di cellule tumorali presentano un netto aumento dell'attività glicolitica, tumori con un basso tasso di glicolisi potrebbero non essere visibili al tracciante.

Allo scopo è necessario lo sviluppo di nuove sonde PET in grado di interagire selettivamente, tramite vettori target specifici, con un dato marker e quindi accumularsi nel tessuto interessato.

3.1.1 Impiego dello ione $[^{18}\text{F}]\text{fluoranilalluminio (Al}^{18}\text{F}^{2+})$

I complessi metallici di alluminio-fluoruro $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$ permettono di combinare l'attività e il decadimento di ^{18}F con la convenienza della radiochimica basta sui complessi metallici. La reazione di radio-marcatura in questi casi risulta molto veloce e può essere condotta in ambiente acquoso. Questa coinvolge l'iniziale formazione del legame Al - ^{18}F (favorito dal carattere Hard di entrambi i componenti) e la successiva complessazione dell'alluminio da parte di un chelante adeguato preferenzialmente già coniugato al vettore di interesse. Anche i complessi di fluoranilalluminio devono essere termodinamicamente stabili e cineticamente inerti per poter essere utilizzati in vivo. Il legame fluoro alluminio è il più forte tra gli altri 60 legami fluoro-metallo (energia di legame di circa 670 kJ/mol)(12 tesi ms)

Il primo chelante ad essere stato valutato per lo ione $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$ è stato l'acido dietilentriammino tetraacetico (EDTA) (Fig.3.5), il complesso così formato però mostrava una scarsa stabilità in vitro durante la sua formulazione, ma anche in siero. Poiché Al(III) tende a formare complessi ottaedrici, è preferibile usare leganti pentadentati in modo da lasciare disponibile un sito per F^- .

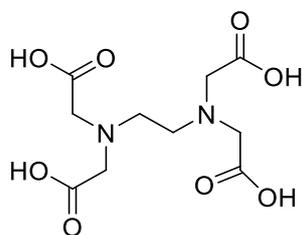


Fig.3.5 Struttura di EDTA

Nel 2009 McBride fu il primo a sperimentare la complessazione dell'alluminio fluoruro col NOTA^[9]. Qualche anno dopo, nel 2011, McBride e Shetty hanno identificato il chelante pentadentato 1,4,7-triazaciclononano-1,4-diacetato (NODA) come il migliore tra quelli testati sinora^[10-12] (Fig.3.6). Alcuni studi hanno anche dimostrato che i complessi di Al(III) risultano più stabili se nella struttura del legante sono presenti due ammine neutre e tre atomi donatori O-carbossilici o fenolici carichi negativamente.

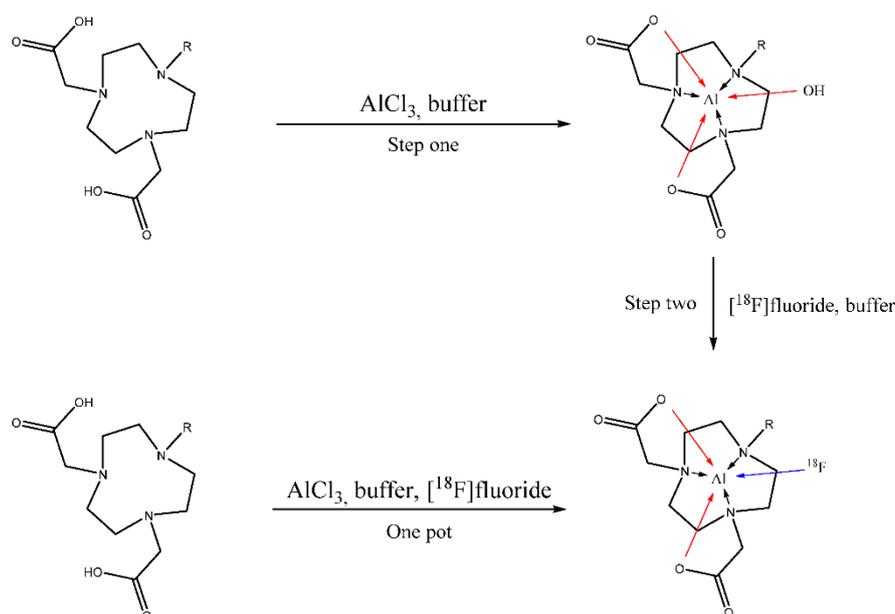


Fig.3.6. Radiomarcatura del NODA con $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$

Sebbene i chelanti macrociclici mostrino un potenziale d'applicazione enorme, le elevate temperature richieste per la complessazione, spesso superiori a 100°C ^[13-15], rappresentano un enorme limite, soprattutto nella radiomarcatura di biomolecole termosensibili. A partire dal 2013 Cleeren e colleghi hanno sviluppato una serie di nuovi chelanti pentadentati^[16,17] a base di etilendiammina e 1,2-cicloesandiammina con tre braccia acetice per il labelling con $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$. Questi chelanti possono essere radiofluorurati a temperature nettamente minori rispetto alle controparti macrocliche (circa 40°C)^[18].

È risaputo che per aumentare l'inerzia di un chelato è fondamentale aumentare la pre-organizzazione e la rigidità del complesso^[19]. Tuttavia, visto che la coniugazione con le biomolecole viene fatta direttamente sul chelante, è più conveniente mantenere una struttura lineare e non macrociclica, in modo da migliorare la cinetica di complessazione ed evitare l'utilizzo di alte temperature che potrebbero denaturare le biomolecole stesse. La struttura ideale perciò dovrebbe presentare un cicloalcano o un eterociclo con braccia pendenti non rigide; per questo è stata studiata una nuova classe di chelanti sulla base della 2-amminometilpiperidina (AMP), con bracci acetici e/o idrossibenilici. Sono stati così sintetizzati i leganti 2-AMPTA, NHB-2-AMPDA e 2-AMPDA-HB (Fig.3.7.), di cui successivamente sono state misurate la capacità di marcatura con $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$ e la stabilità in ambiente fisiologico^[20].

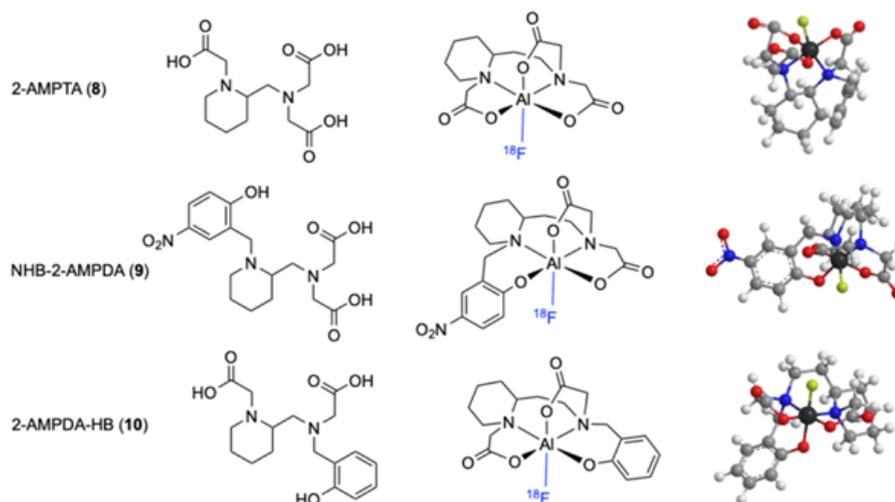


Fig.3.7. strutture di complessazione di 2-AMPDA, NHB-2-AMPDA, 2-AMPDA-HB

CAPITOLO 4- Terapia

La medicina nucleare non comprende solo tecniche di imaging, alcuni radioisotopi possono essere infatti impiegati anche a scopi terapeutici. Gli isotopi necessari a questo scopo devono decadere emettendo particelle α o β^- in modo da sfruttarne il potere citotossico.

Le particelle α , utilizzate nella TAT (Targeted Alpha Therapy), trasportano una grande quantità di energia ed hanno una bassa penetrazione nei tessuti, a differenza delle particelle β^- che trasportano poca energia ma hanno un potere di penetrazione più alto. Le particelle β^- di conseguenza un'un'azione aspecifica sui tessuti (più alto LET linear energy transfer $80\text{keV}/\mu\text{m}$ contro $0.2\text{keV}/\mu\text{m}$ e possono penetrare i tessuti tra i $40\text{-}100\ \mu\text{m}$ contro i $0.05\text{-}12\text{mm}$ delle particelle β).

L'impiego delle particelle α ^[21], oltre a poter permettere un utilizzo in quantità minori di radiofarmaco^[22], permette anche di trattare tumori in stadio avanzato di sviluppo andando a eliminare in maniera specifica le cellule tumorali senza andare a compromettere le cellule sane del paziente^[23]

La terapia che utilizza radioisotopi metallici richiede, come nel caso dei radiodiagnostici, l'utilizzo di complessi stabili termodinamicamente e inerti cineticamente. Tuttavia, dato che l'emissione di particelle α o β^- avviene da parte di elementi con numero atomico elevato che decadendo formano altri elementi radioattivi con caratteristiche diverse, è necessario che il chelante sia in grado di complessare stabilmente non solo il nuclide genitore ma anche i nuclidi

figli ottenuti dal decadimento. Questo per fare in modo che non avvenga il rilascio all'interno del corpo del radionuclide neppure da parte dei figli generati dal decadimento con conseguente danno alle cellule sane. Questo è un aspetto critico nella progettazione del complesso dato che spesso i nuclidi generati dal decadimento possono avere proprietà come dimensioni o affinità per il legante differente da quelle del nuclide genitore da cui sono stati generati. Durante la progettazione bisogna perciò tener conto della tipologia di atomi donatori del legante, ma anche dalle dimensioni dello ione metallico sia genitore che figlio.

Come già detto nel caso delle sonde di imaging, anche per la localizzazione selettiva del farmaco radioterapico nelle zone tumorali è necessario sviluppare leganti bifunzionali. Questi, oltre alla complessazione stabile del radiometallo, devono permettere la bioconiugazione tramite legami covalenti ad una particolare proteina/peptide/piccola molecola vettore in grado di riconoscere in modo specifico le cellule cancerogene e avere un'azione localizzata del radiofarmaco.

Tra i nuclidi studiati per questo scopo figurano ^{213}Bi , ^{211}At e ^{212}Pb (un emettitore β^- che decade nell' α emettitore ^{212}Bi), questi però presentano tempi di emivita troppo brevi per permettere il trattamento di tumori poco accessibili o con lunghi tempi necessari alla penetrazione del radiofarmaco. Per questo si ha la necessità di impiegare altri radioisotopi con tempi di decadimento superiori come ^{223}Ra , ^{224}Ra e ^{225}Ac .

4.1-Impiego di ^{225}Ac

L'attinio-225 è un isotopo radioattivo prodotto dal decadimento del ^{229}Th , è soggetto a una serie di decadimenti successivi (^{221}Fr ; ^{217}At ; ^{213}Bi ; ^{213}Po ; ^{209}Pb ; $^{209}\text{Bi}_{(\text{stabile})}$)(Fig.4.1)

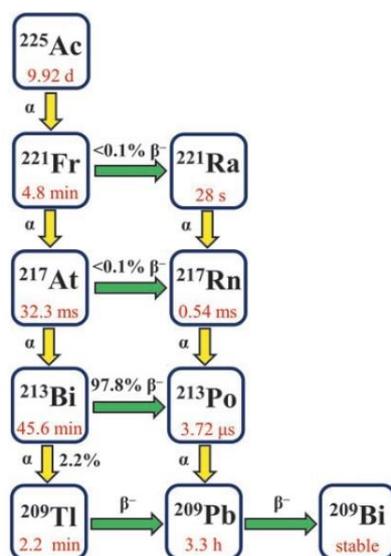


FIG.4.1. Catena di decadimento di ^{225}Ac research gate

L' ^{225}Ac decadendo emette complessivamente 4 particelle α sino al raggiungimento del nuclide stabile ^{209}Bi , cosa che lo rende adatto alla TAT e al trattamento di pazienti oncologici.

Lo studio di ^{225}Ac risulta più complesso rispetto ad altri elementi in quanto non esistono isotopi stabili dell'attinio. È perciò conveniente ricorrere a surrogati come ad esempio La^{3+} , che è infatti lo ione non radioattivo più simile all'attinio e che, nonostante la differenza di raggio ionico, è in grado di formare complessi isomorfi. Usando La^{3+} si possono fare studi di stabilità e cinetica di complessi in modo da simulare il più possibile il comportamento in vitro ed in vivo dei radiofarmaci a base di ^{225}Ac .

Durante la progettazione per un legante adatto a ^{225}Ac bisogna tener in considerazione non solo la stabilità indotta fornita da un legante macrociclico ma anche le dimensioni dello ione metallico, $^{225}\text{Ac}^{3+}$ è infatti uno ione di grandi dimensioni e andrà preferibilmente a formare complessi stabili in presenza di anelli chelati a 5 termini.

Uno dei leganti più comunemente usati nella complessazione dei radioisotopi è il DOTA (FIG. 4.2), il suo impiego però non risulta ottimale nel caso della complessazione dell'attinio [24,25] La complessazione, oltre ad essere lenta, richiede inoltre temperature spesso incompatibili con un vettore proteico, tutti questi svantaggi richiedono lo studio di altri tipi di leganti macrociclici con una cavità più grande di quella del DOTA e che permettano la formazione di complessi stabili di Ac.

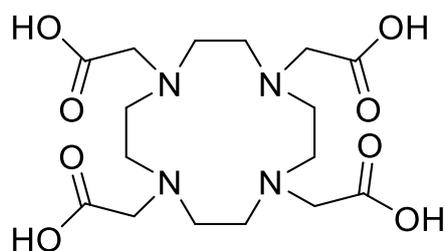


FIG. 4.2. *Struttura del DOTA*

I derivati del macrociclo 4,13-diaza-18-crown-6 ed in particolar modo il derivato con due picolinati come sostituenti chiamato MACROPA (Fig.4.3) ha mostrato proprietà interessanti per il labelling di ^{225}Ac . Infatti, oltre a presentare una maggiore affinità verso cationi metallici più grandi, come Ac^{3+} e La^{3+} , ha anche una cinetica di complessazione nettamente superiore rispetto a DOTA. Dai risultati ottenuti è stato dimostrato come sia possibile ottenere il complesso a temperatura ambiente dopo solo 5 minuti. Test in vivo di questi complessi hanno confermato l'assenza del rilascio del radiofarmaco all'interno del corpo del soggetto.

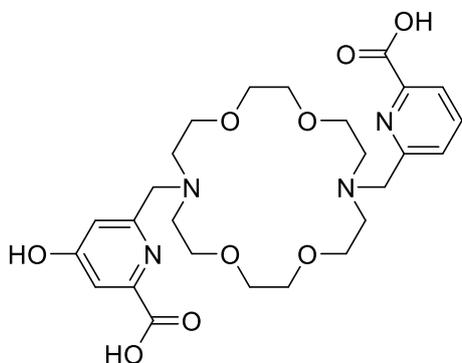


FIG.4.3 *Struttura di MACROPA,*

CAPITOLO 5-Teranostica

Tramite l'utilizzo di particolari nuclidi, o coppie di nuclidi, è possibile sfruttare il loro potenziale teranostico, in cui vengono coniugate la terapia e la diagnostica. La teranostica utilizza radioisotopi con caratteristiche simili in grado di emettere particelle α o β per la terapia e particelle γ o positroni per l'imaging. È necessario lo sviluppo di leganti affini a cationi diversi, anche con dimensioni differenti, in modo tale che i complessi formati abbiano le stesse proprietà di mobilità e localizzazione all'interno dell'organismo e vadano a svolgere, in modo analogo, la propria funzione. L'utilizzo di uno stesso legante bioconiugato ad uno stesso vettore è quindi indispensabile per ottenere imaging e terapia in modo analogo e prevedibile.^[26]

Un esempio di potenziale agente di imaging/terapia è costituito dalla coppia $^{132}\text{La}/^{225}\text{Ac}$ dove si osserva un decadimento β^+ dovuto al decadimento del lantanio che va a generare ^{132}Ba il quale decade emettendo nuovamente emettendo particelle β^+ ottenendo ^{132}Xe stabile

o dal ^{149}Tb ($t_{1/2} = 4.12$ ore) che può dare sia decadimento α con emissione di un $^4\text{He}^{2+}$ (17,3%), sfruttato nella terapia, che cattura elettronica (82,7%) con emissione di fotoni γ sfruttati per l'imaging SPECT. I due decadimenti generano rispettivamente ^{145}Eu (che decade a ^{145}Sm , ^{145}Pm ed infine ai due nuclidi stabili ^{145}Nd e ^{141}Pr) e ^{149}Gd (che a sua volta decade a ^{149}Sm e ^{145}Nd stabile).[25]

Capitolo 6- Obiettivo della tesi

L'obiettivo del lavoro di tesi consiste nella sintesi e nella caratterizzazione di nuovi leganti polidentati macrobicyclici funzionalizzati per la complessazione di La^{3+} con lo scopo di simulare il comportamento di $^{225}\text{Ac}^{3+}$ per un eventuale impiego del legante in TAT, o in teranostica.

Entrambi i leganti/complessi obiettivo del progetto (sono basati sullo scaffold promettente di MACROPA funzionalizzato con braccia picoliniche recanti dei gruppi propargilosi in posizione 4. I leganti ottenuti presentano 10 siti di coordinazione, 6 appartenenti al macrociclo principale (2 atomi di azoto e 4 di ossigeno) e 4 appartenenti alle braccia picoliniche, (2 atomi di azoto degli anelli piridinici e 2 atomi di ossigeno del carbossile).(Fig 6.1)

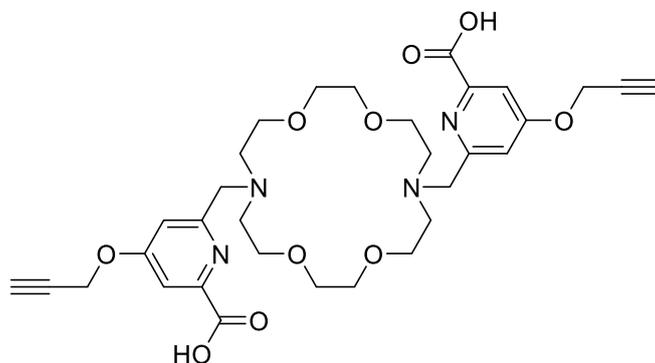


Fig.6.1. struttura del legante sintetizzato

La differenza sostanziale tra i due risiede nella scelta della chiusura bicyclica del legante, in un caso si è optato per utilizzare il serinolo (2-ammino-1,3-propanendiolo) mentre per il secondo legante si è invece usato un derivato della pirrolidina ((3S,4S)-1-benzilpirrolidin-3,4-diolo), entrambi sono stati funzionalizzati con bis-azidi(Fig.6.2.)

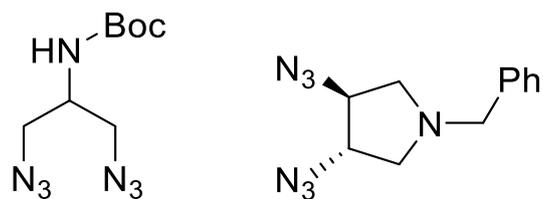


Fig.6.2. struttura delle bis-azidi sintetizzati, a sinistra a partire dal serinolo e a destra dal derivato della pirrolidina

Le due bis-azidi ottenute sono state impiegate come chiusura a ponte del complesso finale tramite reazione click (Fig.6.3)

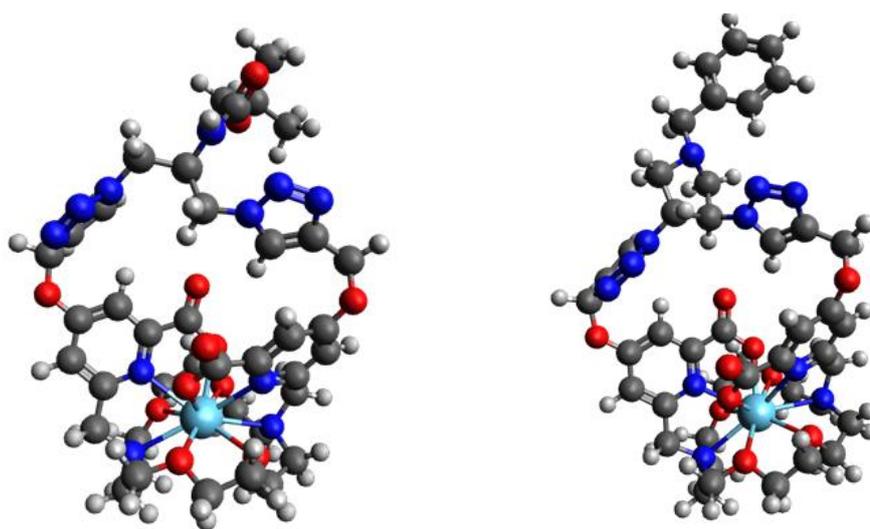


Fig.6.3. Struttura generata tramite software Avogadro dei leganti obiettivo della tesi: a sinistra con serinolo come chiusura e a destra con il ponte pirrolidina,

Capitolo 7- Parte sperimentale

7.1 Materiali e strumentazioni

I reattivi e i solventi impiegati sono disponibili commercialmente sono stati impiegati senza fare ricorso ad ulteriori purificazioni. Le analisi TLC sono state effettuate impiegando lastre di silice Merck 60 F254 e rivelando le macchie tramite luce UV (254 nm) o permanganato di potassio. Le cromatografie su colonna sono state effettuate usando come fase stazionaria silice Merck 70-203. Le composizioni degli eluenti sono riportate nelle procedure. Per gli spettri di massa è stato utilizzato un sistema accoppiato HPLC-MS dotato di un sistema di pompe Waters 1525 binary HPLC pump utilizzando colonne analitiche XBridge Phenyl 3.5 μm (4.6x150 mm). Come analizzatore di massa è stato utilizzato un Waters 3100 Mass Detector con sorgente ESI+ e quadrupolo come analizzatore di massa. Le corse Hplc sono state eseguite in due metodi diversi a seconda del quale varia il gradiente di composizione di fase mobile, il metodo 1 prevede di partire dall'1%ACN e arrivare linearmente al 100% mentre il metodo 10 prevede di partire dal 10% e arrivare linearmente al 100%

Metodo 1

Tempo(minuti)	Flusso(mL/min)	%H ₂ O(TFA 0,1%)	%CH ₃ CN
0.00	1.00	99	1
15.0	1.00	0	100

Metodo 10

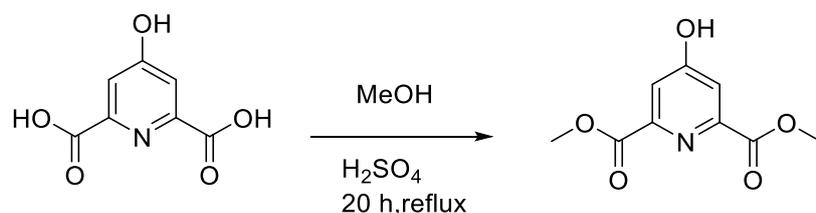
Tempo(minuti)	Flusso(mL/min)	%H ₂ O(TFA 0,1%)	%CH ₃ CN
0.00	1.00	90	10
15.0	1.00	0	100

Gli spettri ¹H e ¹³C NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker Avance III 500 MHz, equipaggiato con un probe da 5 mm PABBO e unità di controllo della temperatura BVT-3000, usando tetrametilsilano (TMS) come riferimento per i chemical shifts (δ [ppm]). Le molteplicità sono state riportate come singoletto (s), singoletto largo (bs), doppietto (d), doppio

doppietto (dd), tripletto (t), quartetto (q) o multipletto (m). I campioni sono stati preparati in tubi NMR da 5 mm disciogliendo i composti in opportuni solventi deuterati.

7.2 SINTESI

7.2.1 Reazione di esterificazione del diacido



La acido 4-idrossipiridin-2,6-dicarbossilico (2 g, 10.9 mmol) viene sciolta in MeOH (25 ml) in un pallone, alla soluzione è stato aggiunto H₂SO₄ (2 ml). La reazione sotto agitazione viene portata a riflusso. Dopo 20 ore è stato eliminato il solvente a pressione ridotta, il solido è recuperato in DCM (20 ml) e lavato 3 volte con brine (3 x 15 mL). La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄, viene poi filtrata con filtro a pieghe e portata a secco al rotavapor.

(1.14g, 5,3mmol)

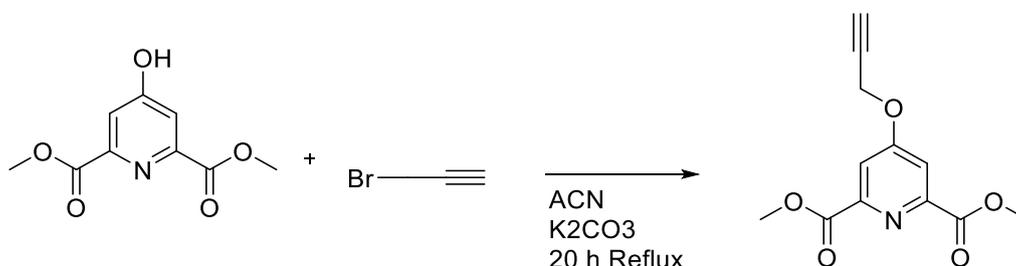
Resa grezzo= 48%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.00 (s, 6H, CH₃), 7.60 (s, 2H, NCCH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 53.3(CH₃), 115.0 (NCCH), 150.0(NC), 165.1 (CCOOC)165.7(CCCHCOH)

ESI+MS, m/z (metodo 10)a t_r=1,72: 212.10 [M+H⁺]; calcolata per C₉H₉NO₅: 211,1

7.2.2 Reazione di alchilazione del diestere



Il composto è stato disciolto in ACN (15 mL), sono stati aggiunti propargilbromuro (1,5 eq, 80% in toluene, 0.800 ml) e K₂CO₃ (3 eq, 2.9 g). Si porta a riflusso e si lascia reagire sotto agitazione Over Night. Si elimina il solvente a pressione ridotta, si riprende il solido bruno in DCM (15 mL) e si lava con H₂O (3 x 10 mL) la fase organica raccolta viene anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e

portata a secco. Il composto ottenuto viene utilizzato senza passare per ulteriori passaggi di purificazione

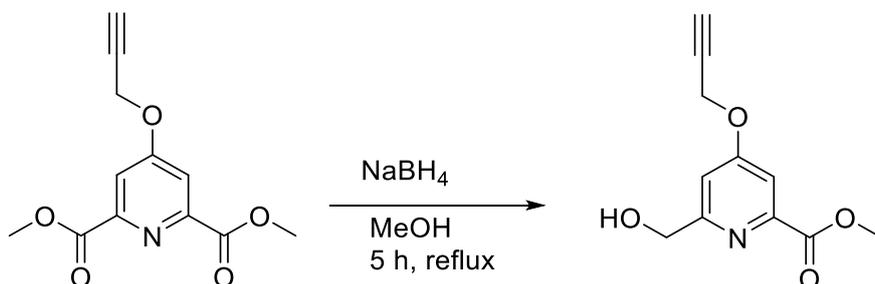
(0.999g, 4.25mmol)

Resa grezzo =79%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2.62(t, 1H, CCH), 4.00(s, 6H, CH_3), 4.86(d,2H, OCH_2C), 7.88(s,2H, NCCH). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 53.4(CH_3), 56.9(OCH_2), 76.3(CH_2CC), 77.8(CH_2CC), 115.0 (NCCH), 150.0(NC), 165.1 (CCOOC), 165.7(COC)

ESI+MS, m/z (metodo 10) a $t_r=$ 1.92: 250.5 [$\text{M}+\text{H}^+$], 247 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 288[$\text{M}+\text{K}$]; calcolata per $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_5$: 249.2

7.2.3 Riduzione dell'estere



Il solido viene sciolto in MeOH (8 mL), viene lentamente aggiunto NaBH_4 (1,1 eq, 0,177 g), la miscela viene portata a riflusso sotto agitazione, la soluzione assume una colorazione gialla. Dopo 5 ore la miscela di reazione viene spenta tramite l'aggiunta di H_2O , fino a che non cessa l'effervescenza. Il solvente è eliminato a pressione ridotta e il solido giallo così ottenuto è sciolto in DCM (10 mL) e lavato con H_2O (3 x 10 mL). La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco a rotavapor. Il solido ottenuto è stato sciolto in un minimo volume di ACN e purificato ulteriormente via cromatografia FLASH con metodo 1

(0.297 g, 1.5 mmol)

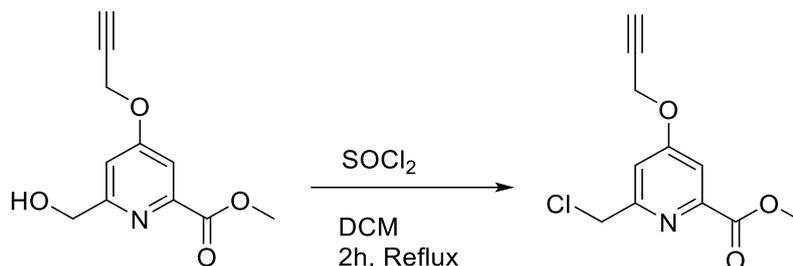
Resa=35%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), 2.59(t, 1H, CCH), 3.96(s, 3H, CH_3), 4.79-4.82(m, 4H $\text{HOCH}_2\text{-OCH}_2$ CC), 7.12(d, 1H, H_{ar}), 7.60(d, 1H, H_{ar})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm) 53.2 (CH_3), 56.2(OCH_2), 76.5(CCH), 78.0(CCH), 110.1(CH_{ar}) 111.4(CH_{ar}), 148.8(NC_{ar}), 162.6(NC_{ar}),165.4(C_{ar}) 165.6(CO)

ESI+MS, m/z (metodo 10) a $t_r=1.92$: 222.12[M+H⁺], 244.36[M+Na]⁺; massa calcolata per C₁₁H₁₁NO₄: 221.2

7.2.4 Clorurazione



Il soldio viene sciolto in DCM (6mL) viene fatto gocciolare lentamente SOCl₂ (2 eq, 0.225 mL), la reazione viene portata a riflusso sotto agitazione. Dopo due ore la reazione viene spenta aggiungendo goccia a goccia una soluzione satura di NaHCO₃, la fase organica viene lavata con H₂O (3 x 5mL). La fase organica viene seccata con Na₂SO₄, filtrata e portata a secco.

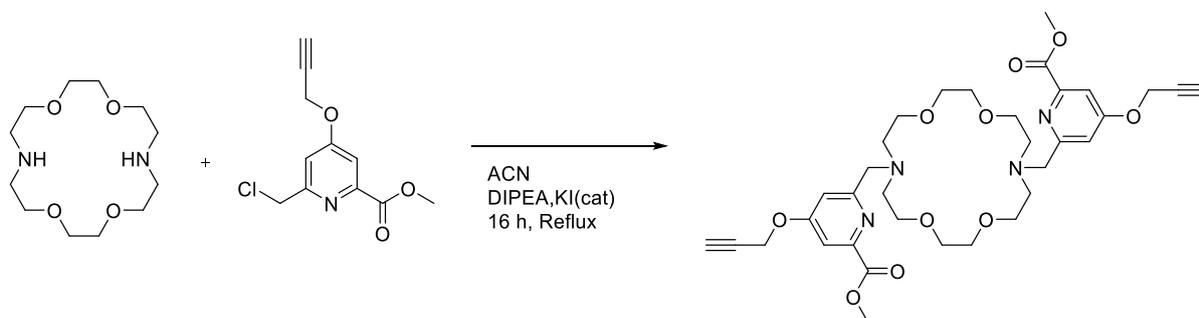
(0,327g, 1.3 mmol)

Resa grezzo= 86%

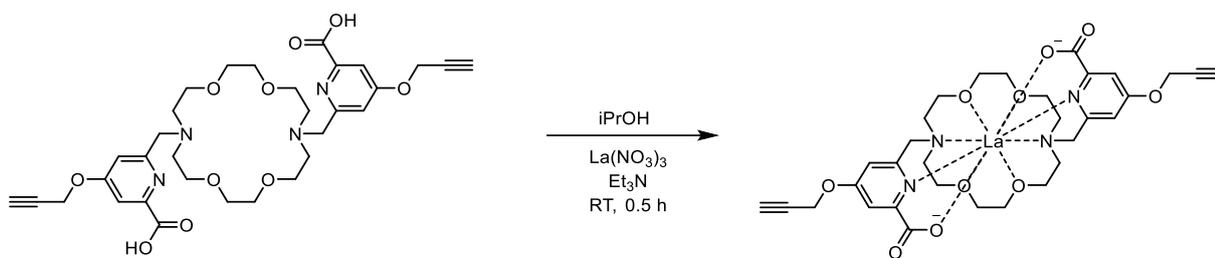
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.61(t,1H,CCH), 3.99(s, 3H, CH₃), 4.72(s, 2H, CCH₂Cl), 4.82(d,2H, OCH₂C), 7.30(s,1H, OCCH_{ar}CCH₂Cl), 7.68(s, 1H, OCCH_{ar}CCOO), ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 46.4 (C_H₃), 53.4 (CCH₂Cl), 56.3 (CH₂CCH), 76.7(CCH), 77.8(CCH), 111.7(OCCHCCOO), 112.8(OCCHCCH₂Cl), 149.3(NCCOO), 159.0(NCCH₂Cl), 165.4(COO), 165.6(C_{ar}O)

ESI+MS, m/z (metodo 1) a $t_r=6.79$: 240.0[M+H⁺]; massa calcolata per C₁₁H₁₀ClNO₃:239.6

7.2.5 Reazione di alchilazione del MACROPA



Il braccio (2.5 eq, 0.183 g, 0.799 mmol) viene disciolto in ACN (6 mL), separatamente viene preparata una soluzione di MACROPA sciogliendo il macrociclo(0.080, 0.306 mmol) in



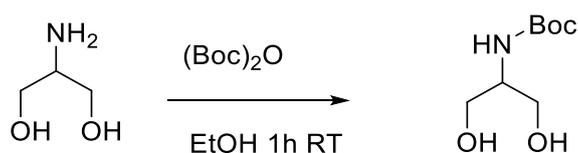
Il legante viene disciolta in isopropanolo(3.5 mL), viene aggiunta Et₃N (4 eq, 0.110 mL), la soluzione viene scaldata a refluxo per 15 minuti, dopodiché viene si fa raffreddare a temperatura ambiente e si fa gocciolare sopra un soluzione di La(NO₃)₃•6H₂O (1,1 eq, 0.095g) disciolto in isopropanolo (2.5 mL), la soluzione viene lasciata reagire a RT per mezz'ora. Passati 30 minuti si osserva la formazione di cristalli bianchi aghiformi, vengono separati dal surnatante tramite centrifugazione . Il solido viene più volte lavato con isopropanolo a caldo (5X3ml), si raccoglie il liquido di lavaggio. Nel surnatante e nell'isopropanolo di lavaggio si formano cristalli di complesso che vengono raccolti.

La resa di reazione è da considerarsi quantitativa.

ESI+MS, m/z (metodo 1) a t_r=4.71 778.1 [M+H]⁺; massa calcolata per [C₃₂H₃₈LaN₄O₁₀]⁺=777,5

È stata anche eseguita una misura cristallografica

7.2.8 Protezione dell'ammina con Boc



Il 2-ammino-1,3propanendiolo (serinolo) 0,059g, 0.65 mmol) viene disciolto in etanolo(5 mL), alla soluzione viene aggiunto (Boc)₂O (1,2 eq, 0.155g). Dopo un'ora a RT si porta a secco il solvente e si riprende il solido in EtOAc(6mL), si lava con H₂O(3X 5mL), la fase organica recuperata viene anidrificata, filtrata e portata a secco, si cristallizza il prodotto in esano caldo.

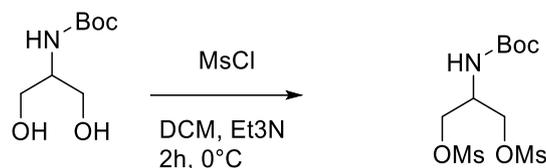
(0,065g, 0.34mmol)

Resa=52.3%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 1.43(s, 9H, CH₃), 3.65(m, 1H, NHCH), 3.71(m, 4H, CH₂OH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 28.5(CH₃), 56.2(NHCH), 62.3 (CH₂O), 80.1(C(CH₃)₃), 165.5(COO)

7.2.9 Mesilazione del serinolo



il solido (0.065g, 0.34mmol) viene disciolto in DCM (6 mL), viene aggiunta Et₃N (3 eq, 0.139 ml) la miscela posta sotto agitazione viene portata a 0 °C in bagno di ghiaccio, si aggiunge lentamente MsCl (2.2eq, 0.06 mL). Dopo 2h lavo in imbuto separatore con H₂O (3X5mL), la fase organica viene raccolta anidrificata con Na₂SO₄ filtrata e portata a secco, il solido bruno ottenuto viene fatto cristallizzare in una miscela di esano/DCM (95/5) a caldo.

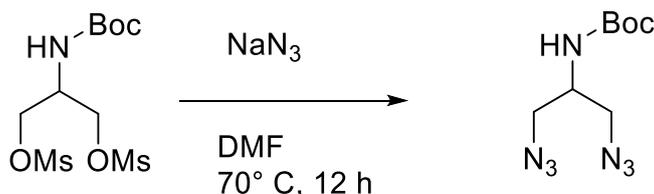
(0.062g, 0.18 mmol)

Resa=53%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 1.44(s, 9H, CH₃), 3.10 (s, 6H,SO₂CH₃), 3.77(d,4H, NCHCH₂),3.90(t, 1H, NCHCH₂)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 28.3(CH₃), 37.7(SO₂CH₃), 51.2(NHCH), 67.2(NHCHCH₂), 80.6(C(CH₃)₃), 155.5(CO)

7.2.10 Reazione di formazione della bis-azide

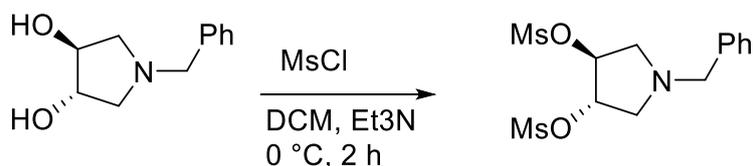


MS-37 viene disciolto in DMF (8 mL), alla miscela viene aggiunta NaN₃(6 eq,0.07g), si scalda a 70 °C e si lascia reagire per 12 h, dopodiché si porta a secco si ridisciogli in AcOEt (5mL) e si lava con H₂O(3X5mL), la fase organica viene anidrificata, filtrata e portata a secco ottenendo un olio bruno

(0.074g, 0.31mmol)

Resa grezza=48%

7.2.11 Mesilazione del (3S, 4S)-benzopirrolindin-3,4-diolo



Il (3S, 4S)-benzopirrolindin-3,4-diolo (0.060g, 0.0003 mol) vengono disciolti in DCM (5mL), alla soluzione viene aggiunta Et₃N (3 eq, 0.125 mL), la miscela viene portata a 0°C in bagno di ghiaccio e si aggiunge MsCl (3.2eq, 0.075mL). Dopo due ore la miscela viene lavata con H₂O (3X5mL), la fase organica viene anidrificata, filtrata e portata a secco.

(0.088g, 0.00025 mol)

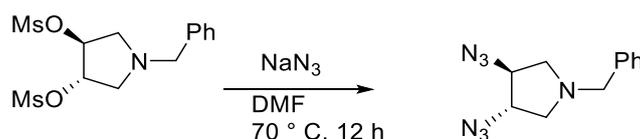
Resa grezza=83%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 2.59-2.99(m, 4H, NCH₂CHO), 3.20(s, 6H, CH₃), 3.65(q, 2H, NCH₂C_{ar}), 5.10(t, 2H, SOCH), 7.30(m, 5H, CH_{ar})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 39.1(CH₃), 59.5(NCH₂CHO), 65.1(NCH₂C_{ar}), 68.79(SOCH), 127.5(C_{ar}CHCHCH), 128.6(C_{ar}CHCHCH), 128.8(C_{ar}CHCHCH), 137.8(C_{ar}CHCHCH).

ESI+MS, m/z (metodo 1) a t_r=4.96: 350.02 [M+H⁺]; massa calcolata per C₁₃H₁₉NO₆S₂=347.42

7.2.12 Formazione della bis-azide



Il solido giallo di MS-45 viene disciolto in DMF (6 mL), alla miscela viene aggiunta NaN₃ (10 eq, 0.163 g), si scalda a 70 °C e si lascia reagire per 12 ore sotto agitazione. La reazione viene portata a secco, il solido viene ridisciolti in AcOEt (10 mL) e lavato con H₂O (3X 10mL), la fase organica raccolta viene portata a secco a rotavapor dopo esser stata anidrificata e filtrata.

(0.052g, 0.00021mol)

Resa grezza=84%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 2.59-2.99(m, 4H, NCH₂CHO), 3.62(q, 2H, , NCH₂C_{ar}), 3.87 (t, 2H N₃CH), 7.30(m, 5H, CH_{ar})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm), 57.8(N₃CH), 59.5(NCH₂C_{ar}), 65.9(NCH₂CH), 127.5 (C_{ar}CHCHCH), 128.6(C_{ar}CHCHCH), 128.8(C_{ar}CHCHCH), 137.8(C_{ar}CHCHCH).

ESI+MS, m/z (metodo 1) a $t_r=5.10$: 244.50 [M+H⁺]; massa calcolata per C₁₁H₁₃N₇=243.27

CAPITOLO 8- Discussione e risultati

8.1- Sintesi del braccio

Il primo step di sintesi prevede una reazione di esterificazione di Fischer (Fig.8.1), l'acido forte usato come catalizzatore va a protonare il carbonile dell'acido carbossilico, questo rende il carbonio più elettrofilo andando a favorire il successivo attacco nucleofilo da parte dell'alcool. Viene a formarsi un intermedio tetraedrico, che a seguito della perdita di una molecola d'acqua genera un intermedio carico positivamente, questo intermedio viene infine deprotonato andando a rigenerare il catalizzatore acido e a formare l'estere.

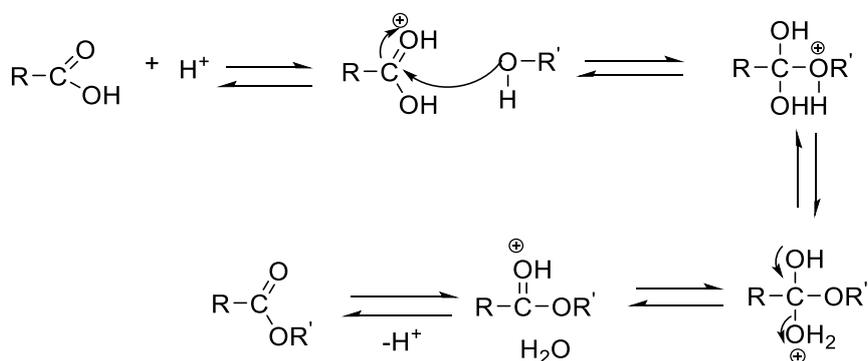
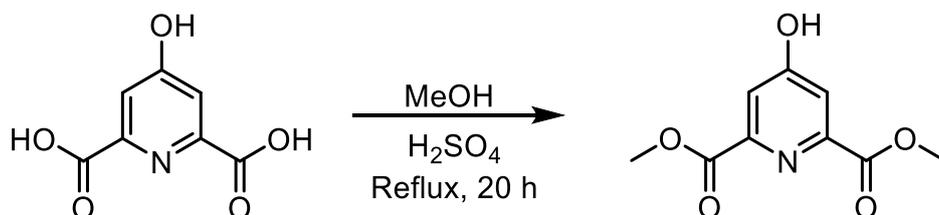


Fig.8.1. Meccanismo generale della reazione di esterificazione

Nel nostro caso la via sintetica prevedeva la doppia esterificazione degli acidi della 4-idrossipiridina-2,6-acido dicarbossilico,



La reazione è stata eseguita facendo sciogliere la 4-idrossipiridina in metanolo, viene aggiunto acido solforico al 98%, si lascia reagire a riflusso per 20 ore sotto agitazione. Dopo 2 ore la reazione assume un colore marrone. Dopo 20 ore è stata eseguita una corsa cromatografica con rivelatore di massa, i dati ottenuti hanno confermato la presenza del prodotto. La reazione è

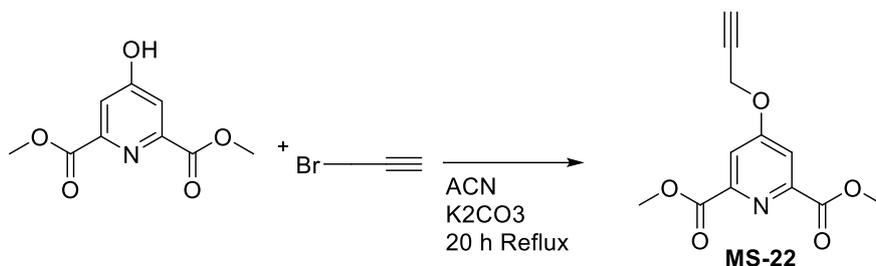
stata portata e secco e successivamente purificata tramite separazione liquido - liquido . Inizialmente si è optato per usare diclorometano e acqua, tuttavia ciò ha portato alla formazione di una emulsione marrone che non permetteva una corretta separazione delle fasi, per ovviare alla sua formazione si è deciso di sostituire l'acqua con il brine (soluzione salina satura). Il diestere così ottenuto segue una via sintetica già presente in letteratura^[27]

Lo step successivo prevedeva la formazione dell'etere tramite attacco nucleofilo dell'alcol deprotonato a un alogenuro alchilico, la reazione è una SN2 (Fig.8.2)



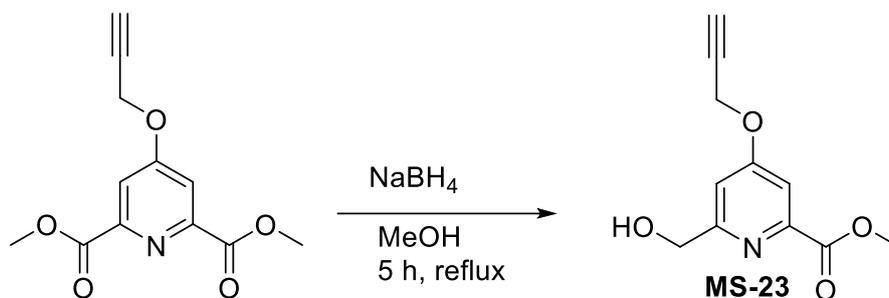
Fig.8.2. Meccanismo generico della reazione di formazione dell'estere

Al prodotto di reazione (un solido marrone scuro dall'aspetto colloso) in acetonitrile sono stati aggiunti 1,5 equivalenti di 3-bromo-propino per permettere la quasi completa sostituzione nucleofila, viene aggiunto carbonato di potassio e si porta la miscela a riflusso lasciandola reagire overnight sotto agitazione.



La soluzione ha subito una decolorazione, passando da marrone a trasparente, un'analisi di spettrometria di massa ottenuta dopo una corsa cromatografica ha evidenziato la presenza del prodotto, portando a secco è stato ottenuto un solido bianco che è stato purificando tramite separazione liquido-liquido con diclorometano e acqua.

MS-22 sottoforma di solido bianco viene sciolto in metanolo, a questa miscela viene aggiunto un equivalente di sodioboro idruro in lieve eccesso per permettere l'idrolisi di solo uno dei due esteri. La miscela viene scaldata a 62 °C e si lascia reagire sotto agitazione per 5 ore



Dopo 5 ore viene eseguita una corsa cromatografica con analisi di spettrometria di massa, questa ha evidenziato la presenza del prodotto desiderato ma anche della molecola diridotta e della piridina non ridotta. Alla reazione viene aggiunta acqua per spegnere eventuali residui di sodio boro idruro non reagiti. Il prodotto è stato purificato tramite estrazione in imbuto separatore con dicloro metano e acqua, si ottiene un solido arancione. Nonostante questo step di purificazione non si è riusciti ad ottenere MS-23 pulito, si è deciso comunque di procedere con la sintesi.

L'ultima reazione della sintesi del braccio consiste nella conversione dell'alcol in cloruro, questo avviene tramite sostituzione nucleofila ad opera del cloruro di tionile (Fig.8.3) il doppietto presente sull'ossigeno dell'alcol attacca lo zolfo andando a formare un alchilclorosolfito, il cloruro prodotto da questa reazione va ad agire come un nucleofilo attaccando l'intermedio alchilclorosolfito, questa reazione avviene con un meccanismo SN2 producendo anidride solforosa, acido cloridrico e l'alogenuro alchilico.

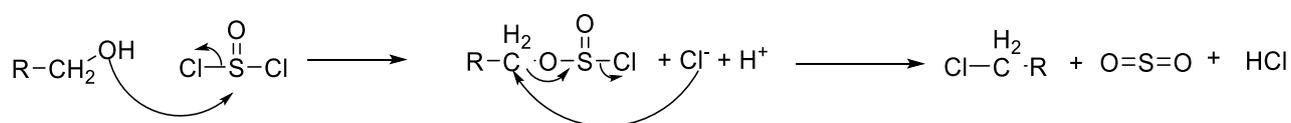
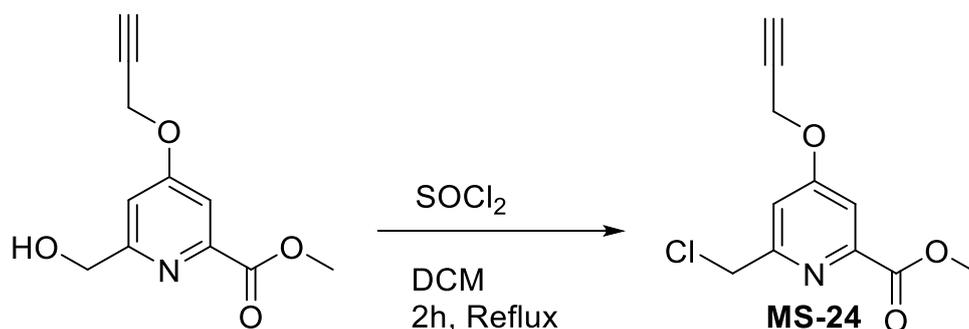


Fig.8.3 Meccanismo generale della reazione tra alcol e cloruro di tionile

Il solido arancione viene disciolto in diclorometano, alla miscela di reazione viene lentamente aggiunto cloruro di tionile in eccesso per permettere una completa sostituzione.



La soluzione viene portata a riflusso e lasciata reagire per 2 ore sotto agitazione. Dopo due ore la soluzione ha assunto una colorazione bruna. Si esegue una corsa cromatografica, i dati ottenuti dalla spettrometria di massa evidenziano la presenza del prodotto. Alla reazione viene lentamente aggiunta una soluzione satura di bicarbonato di sodio per spegnere il cloruro di tionile in eccesso non reagito. Il prodotto è stato purificato tramite estrazione in imbuto separatore con dicloro metano e acqua. Si ottiene un solido bruno..

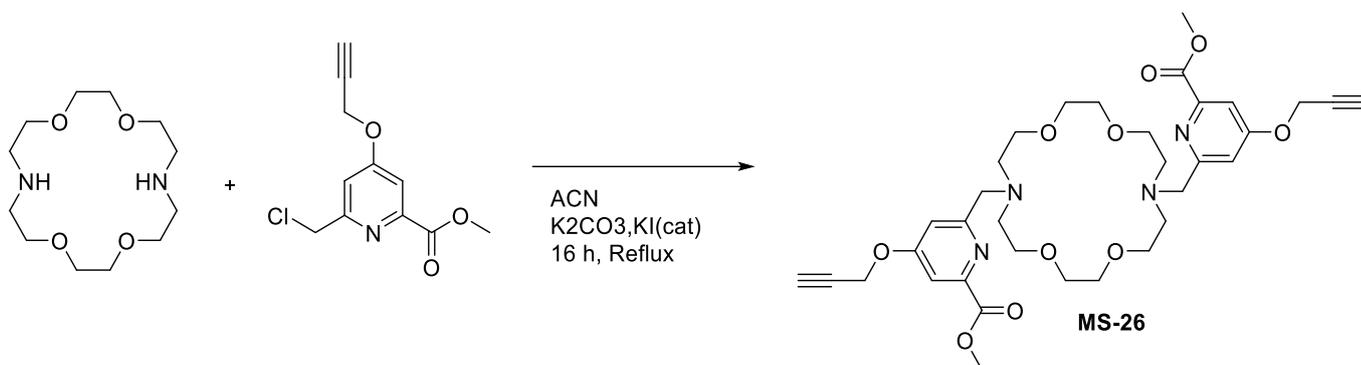
Nel tentativo di eliminare i sottoprodotti indesiderati MS-24 viene purificato ulteriormente tramite colonna cromatografica utilizzando una miscela 8:2 etere di petrolio/acetato di etile. L'analisi di massa sulle frazioni interessate ha mostrato la presenza del prodotto senza sottoprodotti indesiderati. La purezza del composto è stata ulteriormente confermata dalla spettrometria NMR eseguita sulle frazioni raccolte.

8.2 Modifiche alla sintesi del braccio

Questa via sintetica ha portato alla sintesi del prodotto desiderato, tuttavia viste le rese scarse e una purificazione non ottimale degli step intermedi si è deciso di apportare qualche lieve modifica allo step sintetico. Dal momento che lo step critico che ha causato non solo difficoltà nella purificazione, ma anche che ha ridotto notevolmente la resa di reazione è lo step di riduzione, si è deciso di andare a modificare quel passaggio, per prima cosa la quantità di sodio boro idruro passando da 1.2 equivalenti a 1.1, inoltre questo è stato aggiunto ancora più lentamente alla miscela di reazione nel tentativo di favorire la produzione del braccio monoridotto. Successivamente si è optato per non pulire il prodotto tramite separazione in imbuto separatore ma bensì tramite cromatografia FLASH. I tentativi di sintesi del braccio eseguiti in seguito hanno mostrato che, seguendo questa via modificata, non solo ha permesso di ottenere **MS-24** con rese migliori ma è stato ottenuto anche con un grado di purezza superiore, tanto che non è stata necessaria la purificazione via colonna cromatografica.

8.3-Sintesi del legante

MS-24 viene sciolto in acetonitrile, alla miscela viene aggiunto il MACROPA in difetto 1:2,5 per permettere la doppia alchilazione sul macrociclo, alla miscela viene aggiunto carbonato di potassio in eccesso e ioduro di potassio in quantità catalitica per catalizzare la reazione.



La miscela viene lasciata reagire a riflusso Overnight, questa dopo un paio di ore assume un colore arancione.

Viene eseguita un'analisi di massa della reazione, questa ha mostrato la presenza del prodotto desiderato ma anche del macrociclo monoalchilato e di reagenti non reagiti. Alla reazione viene aggiunto un equivalente di DIPEA nel tentativo di spingere la reazione verso i prodotti e ottenere più macrociclo di alchilato. Un'ulteriore analisi di massa, eseguita dopo un paio di ore dall'aggiunta di DIPEA, non ha mostrato particolari cambiamenti nell'ambiente di reazione. La reazione viene purificata prima tramite estrazione in imbuto separatore con dicloro metano e acqua e poi, successivamente tramite colonna cromatografica.

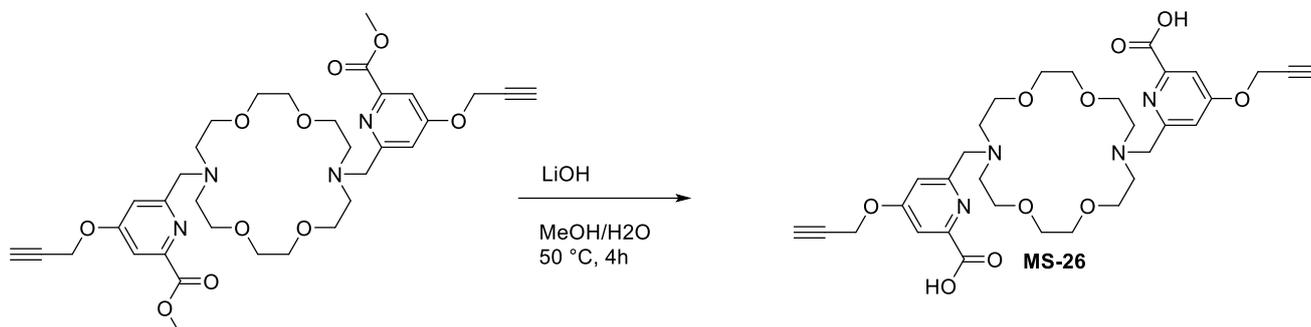
La purificazione per colonna cromatografica ha riscontrato problematiche legate alla scelta dell'eluente adatto per permettere al prodotto di uscire dalla colonna il più pulito possibile. si è optato per utilizzare una miscela 98:2 diclorometano e acqua nel tentativo di separare il prodotto dai sottoprodotti, poi si è passati a una miscela 97:3 sempre di diclorometano e acqua nel tentativo di spingere di più il prodotto ritenuto in colonna. si è dovuto aumentare il gradiente sino ad arrivare a 90:10 aggiungendo un 1% di trietilammina. Un'analisi di massa delle frazioni post colonna mostra una purezza del composto significativamente superiore rispetto al prodotto grezzo.

L'ultimo step per la sintesi del complesso consiste nella deprotezione delle braccia esteree utilizzando idrossido di litio per ottenere un acido carbossilico (Fig.8.4), lo ione idrossido attacca il gruppo R dell'estere andando a generare un alcol e l'anione carbossilato.



Fig.8.4 Meccanismo di reazione della reazione tra idrossido e estere

MS-25 viene disciolto in una miscela metanolo acqua in proporzione 1:1, viene aggiunto idrossido di litio in eccesso 6:1 per permettere la completa deprotezione delle braccia esteriche.



La reazione viene condotta a 50 °C per 4 ore . Un'analisi di spettrometria di massa ha evidenziato la presenza del prodotto desiderato più altri sottoprodotti quali macrociclo non reagito o deprotezionato unicamente su un braccio. In Un primo tentativo di purificazione si è tentato di sciogliere **MS-26** in etanolo con acido cloridrico a freddo nel tentativo di far precipitare il composto desiderato. Questa scelta ha portato però, secondo i dati ottenuti dalla spettrometria di massa, alla riesterificazione del braccio rendendo necessario un altro step di deprotezione con idrossido di litio.

A seguito di un'altra deprotezione si è riusciti a ottenere nuovamente il prodotto desiderato ma molto sporco, ulteriori tentativi di purificazione non hanno dato i risultati sperati.

8.4-Modifiche alla sintesi del legante

Date le difficoltà riscontrate nella sintesi e nella purificazione del legante si è deciso di apportare qualche modifica alla via sintetica nel tentativo di ottenere **MS-26** con buone rese un elevato grado di purezza. Per prima cosa si è deciso di impiegare direttamente DIPEA invece che K₂CO₃ nella sintesi di **MS-25**, questa modifica, comparando i dati della spettrometria di massa ottenuti con quelli dello step non modificato, ha permesso di ottenere **MS-25** nettamente più puro con molti meno sottoprodotti. Successivamente, dato che la purificazione via colonna cromatografica non è stata delle più ottimali, si è optato per pulire il prodotto ottenuto tramite cromatografia FLASH, questo ha permesso di ottenere **MS-25** nettamente più pulito. Per lo step di deprotezione invece non sono state applicate particolari modifiche, una volta terminata la reazione non si è optato per una precipitazione in etere né tantomeno in etanolo acido così da evitare ulteriori riesterificazioni, nonostante non siano stati eseguiti particolari step di

purificazione le analisi eseguite su **MS-26** hanno mostrato un discreto grado di purezza del composto.

8.5-Sintesi della chiusura con serinolo

Secondo la via sintetica riportata in letteratura (articolo serinolo , prevedeva la protezione dell'ammina primaria da parte del boc (Fig.8.5)

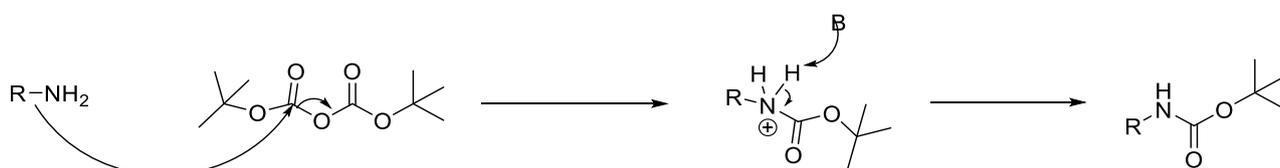
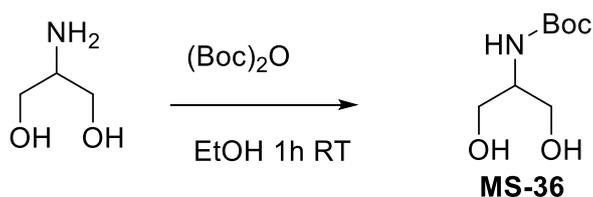


Fig.8.5 Meccanismo generale di protezione di un'ammina col Boc

il serinolo viene disciolto in etanolo, alla miscela di reazione viene aggiunta lentamente di-terbutil-dicarbonato(BOC) in lieve eccesso per permettere una completa protezione dell'ammina



Dopo un'ora sotto agitazione la soluzione rimane incolore, un'analisi di massa ha mostrato la presenza di prodotto. Il solvente è eliminato e successivamente sottoposta ad estrazione liquido liquido in imbuto separatore utilizzando acetato di etile e acqua. A seguito di anidificazione con Na_2SO_4 ed eliminazione del solvente a pressione ridotta, il prodotto si presenta come un solido bianco.

Lo step seguente consiste nella mesilazione degli alcoli, usando il cloruro di mesile si fa avvenire una sostituzione sullo zolfo rompendo un legame O-H e formando un legame O-S (Fig8.6.)

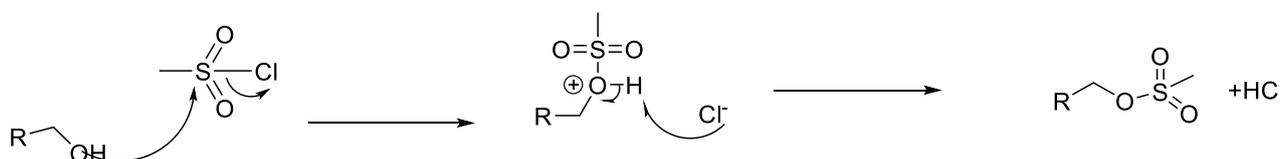
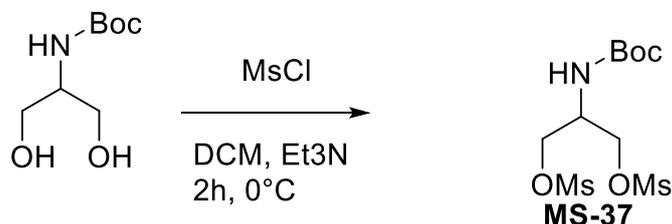


Fig.8.6 Meccanismo della reazione di mesilazione di un alcol

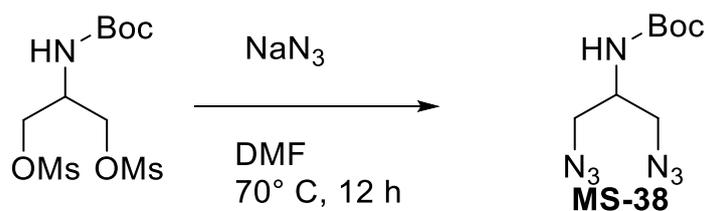
MS-36 viene disciolto in diclorometano, alla miscela viene aggiunto trietilenammina in eccesso 3:1 e mesil cloruro in eccesso 2,2:1 per permettere la completa mesilazione di entrambi gli idrossili della molecola, in modo da renderli gruppi uscenti migliori e permettere la successiva reazione.



La reazione viene condotta a 0°C (bagno di ghiaccio) sotto agitazione. L'analisi tramite spettroscopia di massa non si è rivelata utile per determinare direttamente la presenza del prodotto desiderato. La conferma della presenza del prodotto deriva da misure NMR. , infatti, si è potuto osservare e identificare chiaramente solo il segnale della partenza non reagita, ulteriori segnali presenti sono stati di difficile attribuzione, uno fra tutti potrebbe essere riconducibile, non in modo certo, a un frammento del prodotto desiderato. Osservando i dati raccolti si è deciso di far reagire la miscela per un'altra ora, una seconda analisi di massa non ha nuovamente mostrato la presenza del prodotto, tuttavia si è notato come il segnale relativo alla partenza non reagita fosse sparito, in virtù di ciò si è supposto che la reazione sia completa e che **MS-37** non sia osservabili in massa.

Il grezzo di reazione viene purificato tramite estrazione in imbuto separatore con diclorometano e acqua

MS-37 sottoforma di solido bruno viene disciolto in DMF, si aggiunge sodio azide in eccesso 6:1



La miscela viene scaldata a 70°C e lasciata reagire per 12 ore sotto agitazione, un analisi di massa non ha riscontrato la presenza del prodotto, tuttavia confrontando lo spettro con quello della reazione precedente si è notato come i segnali del presunto frammento di **MS-37** sia assente, da questo possiamo dedurre che la reazione sia completa. Si è tentata una purificazione

tramite estrazione in imbuto separatore con acqua e acetato di etile, tuttavia non potendo osservare il segnale del prodotto tramite spettrometria di massa non è stato possibile determinare come e se il prodotto è stato purificato.

A fronte dei dati ottenuti nel tentativo di riuscire a ottenere **MS-38** si è deciso di seguire nel dettaglio la procedura presa dalla letteratura.

8.6-Tentativo migliorato di sintesi di MS-38

Gran parte delle modifiche apportate riguardano i modi di purificazione degli intermedi, infatti a partire dalla sintesi di **MS-36** oltre all'estrazione si aggiunge uno step di cristallizzazione in una miscela di esano/DCM (95/5) calda, il solido ottenuto viene disciolto in un minimo volume di DCM e fatto gocciolare nella miscela, una volta raffreddata si nota la formazione di un solido bianco, il surnatante viene separato dal solido, un'analisi di massa ha mostrato come effettivamente **MS-36** purificato in questa maniera risulti nettamente più pulito rispetto al metodo precedentemente seguito.

In modo analogo viene trattato **MS-37**, prima della purificazione per cristallizzazione viene però modificato il metodo di estrazione, la miscela infatti viene lavata più volte con HCl 1M e successivamente con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, raccolta la fase organica viene ridotta a un volume minimo e fatta gocciolare in una miscela calda di esano/DCM, una volta raffreddata si osserva la formazione di un precipitato bianco. Un'analisi di massa del precipitato ha mostrato una miglior pulizia del composto, andando infatti a comparare i due spettri di **MS-37**, si nota come il processo aggiuntivo di cristallizzazione in esano mi permette di eliminare numerosi sottoprodotti indesiderati, lo spettro infatti, nonostante non mostri direttamente un segnale riconducibile al prodotto desiderato, presenta molti meno picchi rispetto a quello ottenuto solo estraendo.

La sintesi di **MS-38** viene invece mantenuta inalterata, la diazide finale rimane comunque invisibile alla spettrometria di massa.

La reazione successiva prevede l'attacco click della bis-azide col serinolo agli alchini del complesso di lantanio

8.6- Click chemistry

La click chemistry è una filosofia chimica introdotta agli inizi degli anni 2000 da Barry Sharpless, descrive la chimica fatta su misura per generare rapidamente e in modo sicuro

determinati composti unendo insieme piccole unità. Le reazioni coinvolte nella click chemistry devono: essere modulari, avere alte rese, produrre sottoprodotti innocui, essere stereospecifiche e possedere un vasto campo di applicazione. I processi inoltre non devono essere troppo complessi e devono avvenire in condizioni di reazione semplici, spesso partendo da reattivi facilmente reperibili e di piccole dimensioni, senza l'uso di solventi o, al limite, sfruttando solventi facilmente allontanabili e non dannosi.

Un punto di partenza nel campo delle reazioni applicate nella click chemistry è la cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen, questa reazione impiega azidi e alchini per formare 1,2,3-triazoli 1,5 o 1,4-disostituiti(fig.8.1)

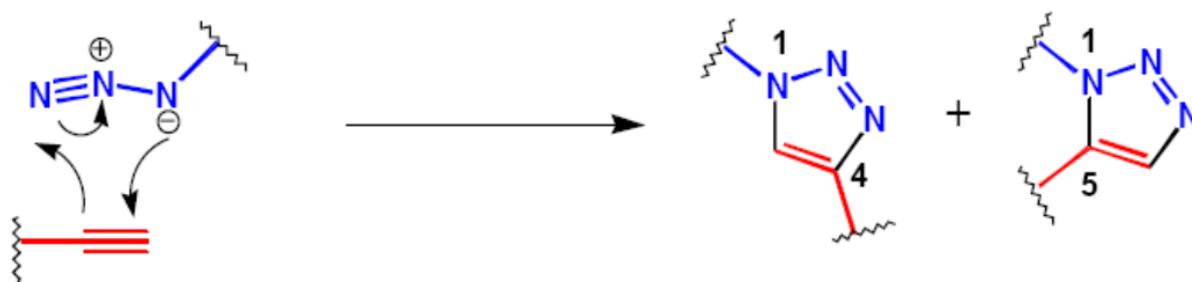


Fig.8.1. Meccanismo di cicloaddizione dipolare di Huisgen

Questa reazione non è regioselttiva, tuttavia è possibile renderla tale apportando una leggera modifica, infatti utilizzando un catalizzatore di rame (I) è possibile ottenere unicamente il prodotto anti.(fig.8.2)

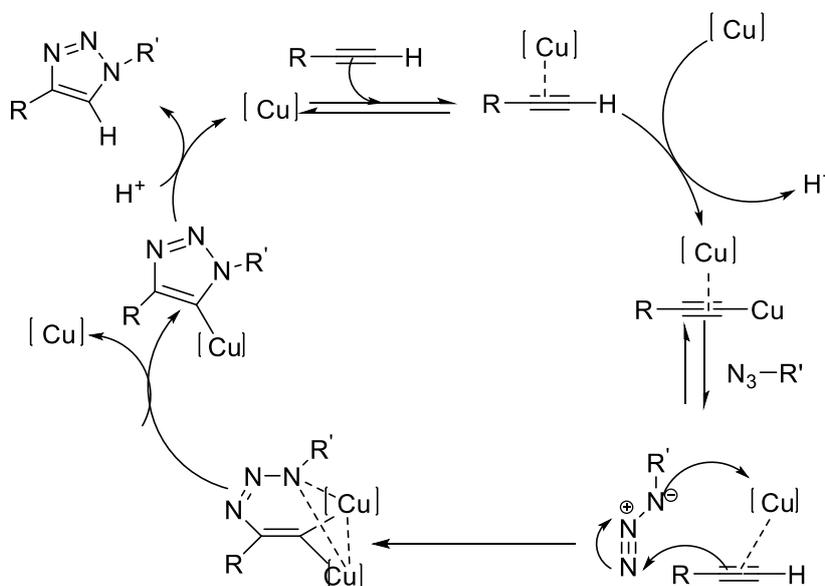
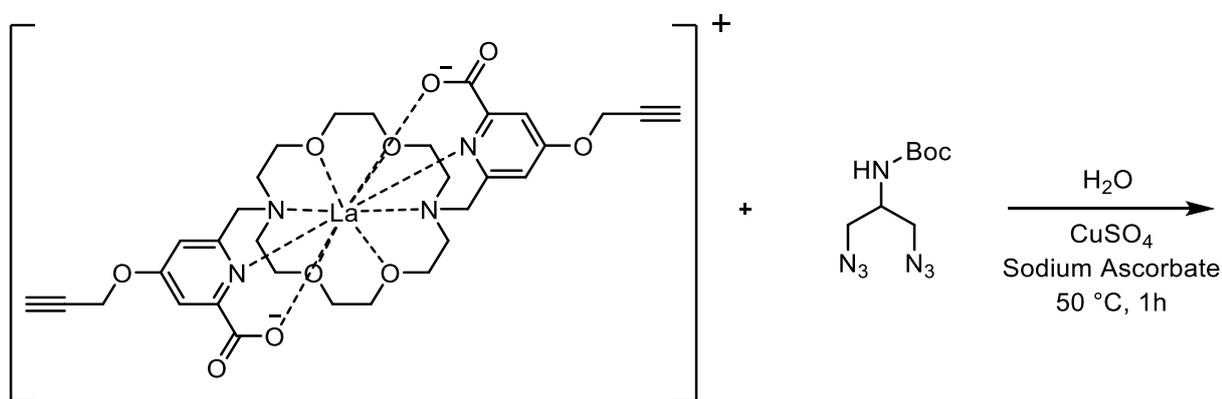


Fig.8.2 Ciclo catalitico della reazione di Huisgen rame catalizzata

8.7- Reazione click di con serinolo

La procedura di chiusura del complesso tramite reazione click prevedeva di disciogliere il complesso in acqua, viene aggiunta alla miscela la bis-azide sintetizzata dal serinolo, si aggiunge alla soluzione 5 μL di una soluzione 1 M di solfato rameico (CuSO_4) e ascorbato di sodio, lo scopo dell'ascorbato è permettere la riduzione del rame facendolo passare da rame(II) a rame (I) per poter così sfruttare la sua attività catalitica, si utilizza un sale di rame (II) poiché Sali di rame (I) sono difficilmente solubili in acqua.

La soluzione di rame viene lentamente aggiunta alla soluzione sotto agitazione, la colorazione della soluzione passa immediatamente da azzurra a gialla. Si lascia reagire per un'ora scaldando a 50°C .



Dopo un'ora si esegue una corsa cromatografica accoppiata a un'analisi di massa, i dati ottenuti da quest'ultima non hanno evidenziato la presenza del prodotto desiderato.

La reazione viene lasciata proseguire per una giornata aumentando la temperatura a 70°C , i dati ottenuti da una seconda corsa cromatografica non hanno nuovamente mostrato la presenza del prodotto desiderato, inoltre i segnali del complesso di lantanio prima visibili non sono più riscontrabili.

A fronte dei risultati ottenuti si è deciso di cambiare molecola di partenza per ottenere la bis-azide andando a utilizzare un derivato della pirrolidina

Bibliografia

- [1] Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular imaging with PET. *Chem Rev.* 2008; 108(5): 1501-16. doi: 10.1021/cr0782426;
- [2] Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol.* 2010; 65(7):500-16. doi: 10.1016/j.crad.2010.03.011;
- [3] Chen K, Chen X. Design and development of molecular imaging probes. *Curr Top Med Chem.* 2010; 10(12):1227-36. doi: 10.2174/156802610791384225;
- [4] Livieratos L. Basic Principles of SPECT and PET Imaging. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging.* 2012; 345–359. doi:10.1007/978-3-642-02400-9_12;
- [5] Sadeghi MM, Glover DK, Lanza GM, Fayad ZA, Johnson LL. Imaging atherosclerosis and vulnerable plaque. *J Nucl Med.* 2010. 51 Suppl 1 (Suppl1):51S-65S. doi: 10.2967/jnumed.109.068163;
- [6] Rangasamy L, Geronimo BD, Ortín I, Coderch C, Zapico JM, Ramos A, de Pascual-Teresa B. Molecular Imaging Probes Based on Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPis). *Molecules.* 2019; 24(16):2982. doi: 10.3390/molecules24162982;
- [7] O. Warburg, "On the origin of cancer cells", *Science*, Vol. 123, 3191, 309-314 (1956)

- [8] Mbakaza O., Vangu M-D-TW. 18F-FDG PET/CT Imaging: Normal Variants, Pitfalls, and Artifacts Musculoskeletal, Infection, and Inflammation. *Front. Nucl. Med.* 2022; 2:847810. doi: 10.3389/fnume.2022.847810;
- [9] W. J. McBride, R. M. Sharkey, H. Karacay, C. A. D'Souza, E. A. Rossi, P. Laverman, C. H. Chang, O. C. Boerman, D. M. Goldenberg, *J. Nucl. Med.* 2009, 50, 991–998.
- [10] C. A. D'Souza, W. J. McBride, R. M. Sharkey, L. J. Todaro, D. M. Goldenberg, *Bioconjug. Chem.* 2011, 22, 1793–1803.
- [11] S. Lütje, G. M. Franssen, R. M. Sharkey, P. Laverman, E. A. Rossi, D. M. Goldenberg, W. J. G. Oyen, O. C. Boerman, W. J. McBride, *Bioconjug. Chem.* 2014, 25, 335–341.
- [12] D. Shetty, S. Y. Choi, J. M. Jeong, J. Y. Lee, L. Hoigebazar, Y. S. Lee, D. S. Lee, J. K. Chung, M. C. Lee, Y. K. Chung, *Chem. Commun.* 2011, 47, 9732–9734
- [13] S. Boschi, J. T. Lee, S. Beykan, R. Slavik, L. Wei, C. Spick, U. Eberlein, A. K. Buck, F. Lodi, G. Cicoria, J. Czernin, M. Lassmann, S. Fanti, K. Herrmann, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2016, 43, 2122–2130.
- [14] K. L. S. Chatalic, G. M. Franssen, W. M. van Weerden, W. J. McBride, P. Laverman, E. de Blois, B. Hajjaj, L. Brunel, D. M. Goldenberg, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, O. C. Boerman, M. de Jong, *J. Nucl. Med.* 2014, 55, 2050–2056.
- [15] J. M. U. Silvola, X.-G. Li, J. Virta, P. Marjamäki, H. Liljenbäck, J. P. Hytönen, M. Tarkia, V. Saunavaara, S. Hurme, S. Palani, H. Hakovirta, S. Ylä-Herttuala, P. Saukko, Q. Chen, P. S. Low, J. Knuuti, A. Saraste, A. Roivainen, *Sci. Rep.* 2018, 8, 9720.
- [16] F. Cleeren, J. Lecina, M. Ahamed, G. Raes, N. Devoogdt, V. Caveliers, P. McQuade, D. J. Rubins, W. Li, A. Verbruggen, C. Xavier, G. Bormans, *Theranostics* 2017, 7, 2924–2939
- [17] A. Vagner, C. D'Alessandria, G. Gambino, M. Schwaiger, S. Aime, A. Maiocchi, I. Toth, Z. Baranyai, L. Tei, *Chemistryselect* 2016, 1, 163–171.

- [18] F. K. Kalman, G. Tircso, *Inorg. Chem.* 2012, 51, 10065–10067.
- [19] J. Martinelli, E. Callegari, Z. Baranyai, A. Fraccarollo, M. Cossi, L. Tei, *Mol.* 2021, 26, DOI 10.3390/molecules26195993
- [20] L. Russelli, J. Martinelli, F. De Rose, S. Reder, M. Herz, M. Schwaiger, W. Weber, L. Tei, C. D'Alessandria, *ChemMedChem* 2020, 15, 284–292.
- [21] de Kruijff RM, Wolterbeek HT, Denkova AG. A Critical Review of Alpha Radionuclide Therapy-How to Deal with Recoiling Daughters? *Pharmaceuticals*, 2015; 8(2), 321-336. doi: 10.3390/ph8020321
- [22] Hu A, Wilson JJ. Advancing Chelation Strategies for Large Metal Ions for Nuclear Medicine Applications. *Acc Chem Res.* 2022 Mar 15;55(6):904-915. doi: 10.1021/acs.accounts.2c00003;
- [23] Thiele NA, Wilson JJ. Actinium-225 for Targeted α Therapy: Coordination Chemistry and Current Chelation Approaches. *Cancer Biother Radiopharm.* 2018; 33(8):336-348. doi: 10.1089/cbr.2018.2494;
- [24] Yang H, Wilson JJ, Orvig C, Li Y, Wilbur DS, Ramogida CF, Radchenko V, Schaffer P. Harnessing α -Emitting Radionuclides for Therapy: Radiolabeling Method Review. *J Nucl Med.* 2022; 63(1):5-13. doi: 10.2967/jnumed.121.262687;
- [25] Naskar N, Lahiri S. Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Front Med.* 2021, 31;8:675014. doi: 10.3389/fmed.2021.675014.
- [26] Pruis IJ, van Dongen GAMS, Veldhuijzen van Zanten SEM. The Added Value of Diagnostic and Theranostic PET Imaging for the Treatment of CNS Tumors. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(3):1029. doi: 10.3390/ijms21031029;
- [27] Falco Reissig, David Bauer, Kristof Zarschler, Zbynek Novy, Katerina Bendova, Marie-Charlotte Ludik, Klaus Kopka, Hans-Jürgen Pietzsch, Milos Petrik and Constantin Mamat, Towards Targeted Alpha Therapy with Actinium-225: Chelators for Mild Condition Radiolabeling and Targeting PSMA-A Proof of Concept Study 2021 Apr 20;13(8):1974.doi:10.3390

