

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Studi di stabilità chimica, metabolica e plasmatica di potenziali agenti
glucotrifluoroborati per la Terapia a Cattura Neutronica del Boro

Relatore:

Prof.ssa Erika Del Grosso

Correlatori:

Dott. Salvatore Villani

Prof.ssa Daniela Imperio

Candidato:

Francesca LETTIERI

Matricola 20023135

Anno accademico 2022/2023

Sessione Straordinaria

LISTA ABBREVIAZIONI

BNCT *Boron Neutron Capture Therapy*

LET alto trasferimento lineare di energia

BSH disodio mercaptoundecaidro-closo-dodecarborano

BPA (L)-4-idrossi-borofenilalanina

PMDA *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*

NMR risonanza magnetica nucleare

PEG glicole trietilenico

PET *positron emission tomography*

MTT 3 - (bromuro di 4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio

ADMET assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione, tossicità

NCE nuove entità chimiche

K_m costante di Michaelis-Menten

CL clearance

NADPH nicotinammide adenina dinucleotide fosfato

LC-MS *Liquid Chromatography-mass Spectrometry*

ESI ionizzazione elettrospray

MS/MS spettrometria di massa tandem

FBS siero bovino fetale

UHPLC *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

MLM *Mouse Liver Microsomes*

G6PDH glucosio 6 fosfato deidrogenasi

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EMEM *Eagles's Minimum Essential Medium*

RSD *Relative Standard Deviation*

ACS *American Chemical Society*

RT Tempo di ritenzione

HRMS *High Resolution Mass Spectrometry*

INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	3
1.1 BNCT: principi di base e requisiti fondamentali	3
1.2 Storia della BNCT	4
1.3 Generazioni dei composti boronati	6
1.3.1 Ruolo centrale dei dicarbacloso-dodecarborani nella sintesi di agenti BNCT	7
1.3.2 Utilizzo dei carboidrati e zuccheri semplici come nuovo approccio sintetico per agenti BNCT	8
1.3.3 Organotrifluoroborati	10
1.4 Ruolo degli studi di metabolismo nel processo di sviluppo di nuovi farmaci.....	14
1.4.1 Test di stabilità metabolica <i>in vitro</i>	15
1.4.2 Applicazione della spettrometria di massa negli studi di metabolismo.....	16
1.5 Studio di potenziali agenti BNCT mediante analisi LC-MS	18
CAPITOLO 2. SCOPO E DEFINIZIONE DEL LAVORO	20
CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI	22
3.1 Materiali utilizzati.....	22
3.1.1 Reattivi	22
3.1.2 Solventi	23
3.1.3 Apparecchiature usate	23
3.2 METODO LC-MS	25
3.3 Preparazione fasi mobili	26
3.3.1 Preparazione soluzione madre	26
3.4 Studio di stabilità chimica	27
3.4.1 Analisi LC-MS/MS ed elaborazione dati.....	28
3.5 Stabilità plasmatica.....	29

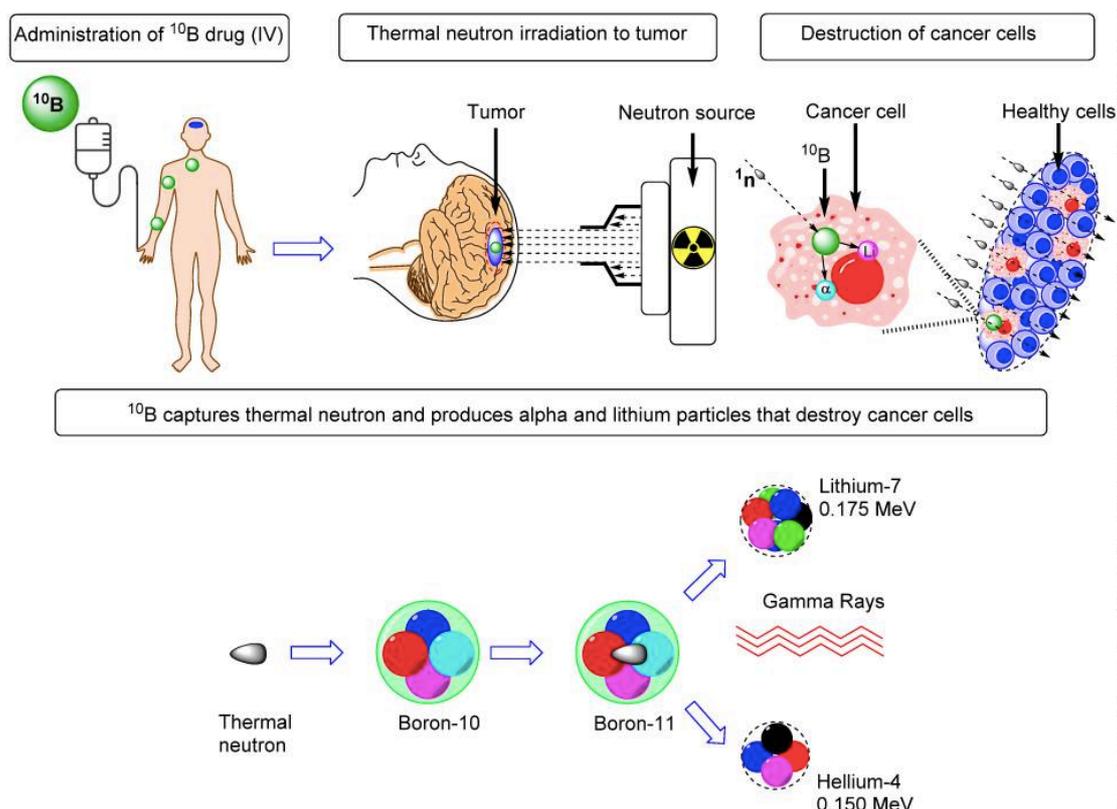
3.6 Analisi dei derivati boronici mediante LC-MS e spettroscopia NMR in D ₂ O.....	30
3.7 Studio di metabolismo.....	30
3.7.1 Studio di stabilità metabolica: analisi LC-MS/MS.....	32
3.8 Saggio MTT.....	32
3.8.1 Preparazione delle cellule per il saggio MTT.....	32
3.8.2 Procedura saggio MTT.....	33
<i>CAPITOLO 4. RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	34
4.1 Sviluppo metodo LC-MS.....	36
4.2 Studio di stabilità chimica.....	40
4.3 Studio di stabilità plasmatica.....	47
4.4 Esperimento ortogonale tramite LC-MS e ¹ H NMR per la verifica della struttura dei derivati boronici.....	51
4.5 Studio di metabolismo.....	56
4.6 Saggio MTT della sonda boronata AMF28 sulle linee cellulari A375 e U87.....	61
<i>CAPITOLO 5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI</i>	63
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	65

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 BNCT: principi di base e requisiti fondamentali

La *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT) è una radioterapia sperimentale tumore-selettiva che si basa sulla somministrazione di un carrier, contenente l'isotopo non radioattivo del boro-10 [^{10}B], che viene irradiato con neutroni termici a bassa energia (0,025 eV).¹ L'interazione tra neutrone termico e ^{10}B dà origine a isotopi instabili di boro [^{11}B] che, subendo reazioni di fissione nucleare, producono due particelle ad alto trasferimento lineare di energia (LET), vale a dire una particella alfa [^4He], uno ione di litio-7 [^7Li] e raggi gamma (Figura 1.1).² Questi ultimi si formano in seguito alla cattura di neutroni termici da parte degli atomi di idrogeno nei tessuti.

Figura 1.1 Panoramica schematica del principio BNCT e del suo impatto sulle cellule tumorali.²



La BNCT è un approccio binario in quanto i singoli componenti (atomi di boro e neutroni) di per sé non sono farmacologicamente attivi. Tuttavia, se combinati tra loro, attraverso le reazioni di cattura e fissione nucleare, permettono una terapia mirata. Questo perché i prodotti che ne derivano, particella alfa e ione di litio,

percorrono una distanza inferiore ai 10 μm , che è quasi uguale al diametro di una cellula. Pertanto, è possibile irradiare selettivamente le cellule tumorali che hanno assorbito una quantità sufficiente di [^{10}B], risparmiando quanto più possibile le cellule sane.

Per aumentare la profondità di penetrazione del fascio di neutroni, la pratica clinica, che tradizionalmente utilizzava un fascio di neutroni termici a bassa energia, si è adattata all'utilizzo di un fascio di neutroni epidermici ($0,5 \text{ eV} < E_n < 10 \text{ keV}$).³ L'utilizzo di un fascio di neutroni ad energia più elevata è fondamentale per far in modo che il fascio di neutroni riesca ad attraversare il cranio e i tessuti più spessi.

Per garantire i migliori risultati terapeutici, l'irradiazione del cancro deve essere eseguita quando la concentrazione del carrier di Boro all'interno del tumore è la più alta possibile, ovvero superiore a 2 mM.⁴ Oltre a questo requisito, un candidato per la BNCT affinché abbia successo dovrebbe presentare: (1) un rapporto di concentrazione tumore-specifico/tessuto normale (T/N) e un rapporto tumore/sangue (T/B) superiori all'unità, preferibilmente 3:1 o superiori. Tuttavia, nel 2002 Valliant *et al.* hanno riportato come rapporto ottimale tumore/sangue 5:1;³ (2) citotossicità sistemica minima e rapida eliminazione dal sangue e dai tessuti normali;⁵ (3) il veicolo di rilascio del boro non sia tossico. Questo è un aspetto critico dello sviluppo degli agenti BNCT se si considerano le elevate concentrazioni che devono essere somministrate per raggiungere i livelli richiesti di boro nel tumore.

1.2 Storia della BNCT

Il primo tentativo di dimostrare l'efficacia della BNCT è stato eseguito nel 1951 dal neurochirurgo William Herbert Sweet e il fisico Gordon Lee Brownell, rispettivamente del *Massachusetts General Hospital* e del *Massachusetts Institute of Technology* (MIT). Dopo aver eseguito la craniotomia chirurgica primaria su pazienti con glioma ad alto grado a Cambridge, Massachusetts, Sweet li ha trasportati a Upton, New York, per l'infusione endovenosa di borace arricchito con ^{10}B (tetraborato di sodio).⁶

Seguirono gli studi di Archambeau (1970), geofisico americano, che portarono alla luce gli effetti collaterali dovuti all'aumento dell'esposizione alla reazione

$^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ sulla pelle dell'uomo. In particolare, si evidenziarono effetti collaterali simili a quelli della radioterapia convenzionale, cioè radio dermatosi incurabili del cuoio capelluto, ulcerazioni profonde e shock intrattabile entro due settimane dall'irradiazione.

Nello stesso periodo negli USA, la BNCT venne sospesa a causa dei gravi effetti collaterali riscontrati, in particolare la comparsa di necrosi cerebrali.

Nel 1968, il neurochirurgo Hiroshi Hatanaka introdusse la BNCT nell'applicazione clinica in Giappone, utilizzando il composto migliorato del boro chiamato disodio mercaptoundecaidro-closo-dodecarborano, cioè $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ (BSH).⁷

Questo composto fu utilizzato in un piccolo gruppo di pazienti selezionati affetti da glioma maligno di grado III e IV. I risultati furono entusiasmanti con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 58%.

Tuttavia, queste applicazioni cliniche non rispettavano le regole europee degli studi clinici prospettici controllati. Nonostante ciò, i risultati sorprendenti di Hatanaka e collaboratori hanno portato ad una riconsiderazione delle potenziali applicazioni cliniche della BNCT negli Stati Uniti e in Europa.

Nel 1987, in Giappone, Mishima, professore di dermatologia all'università di Kobe, iniziò a trattare il melanoma maligno superficiale utilizzando un composto noto come (L)-4-idrossi-borofenilalanina (BPA), un amminoacido contenente boro.

Questo trattamento si rivelò possibile a causa delle caratteristiche superficiali del melanoma cutaneo, che consentirono l'utilizzo di fasci di neutroni termici. Questo approccio è stato un passo importante per applicare la BNCT ad altri tumori al di fuori del sistema nervoso centrale.⁷

Negli anni 90', la Commissione Europea, proprietaria del reattore ad alto flusso HFR a Patten (Paesi Bassi), decise di attuare un approccio internazionale per eseguire la prima sperimentazione clinica in Europa sulla BNCT.⁸

L'obiettivo dello studio è stato quello di determinare la dose sicura del composto BSH per i tumori cranici.

Grazie al ritorno in auge della BNCT, è stato possibile lo sviluppo di tecniche più avanzate di irradiazione, grazie all'utilizzo di reattori che utilizzavano fasci di neutroni epidermici, che davano una migliore penetrazione dei neutroni all'interno

dei tessuti rispetto al fascio termico, oltre a garantire un uso più controllato di BSH e BPA.

Ancora oggi, BSH e BPA sono gli unici due farmaci utilizzati negli studi clinici per la BNCT (Figura 1.2).⁵

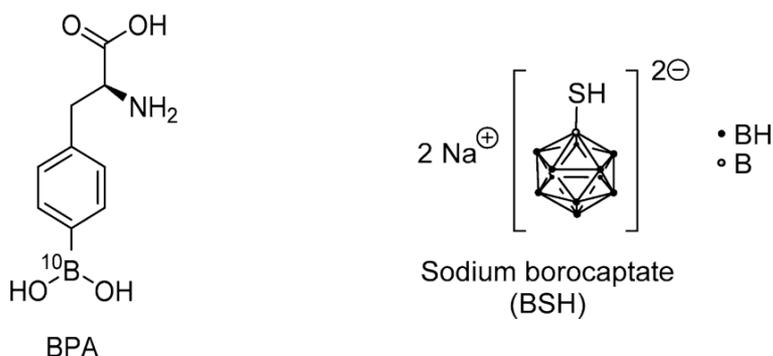
1.3 Generazioni dei composti boronati

Ad oggi esistono tre generazioni di composti boronati. I composti di prima generazione includevano l'acido borico e i suoi derivati.⁶ Tali agenti, nonostante la facile reperibilità e stabilità, vennero abbandonati, a causa delle scarse qualità di ritenzione del tumore e un basso rapporto T/N, a favore della generazione successiva.

Gli agenti di seconda generazione presentavano un profilo di tossicità e selettività migliore, infatti i rapporti T/N erano >1. I capostipiti di questa generazione sono BSH e BPA, entrambi incorporabili in veicoli di trasporto come fruttosio, poli arginina, peptidi, acido cogico (Figura 1.2).⁹ La BPA è stata riconosciuta come medicinale dalla *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA, l'equivalente giapponese della *Food and Drugs Administration* statunitense).

Recenti sforzi per migliorare la selettività degli agenti di rilascio del boro hanno comportato la loro incorporazione in molecole che mirano al tumore, come peptidi, proteine, anticorpi, nucleosidi, zuccheri, porfirine, liposomi e nanoparticelle.¹⁰ Questi appartengono alla terza generazione di agenti BNCT.

Figura 1.2 Strutture del disodio mercaptoundecaidro-closo-dodecarborano (BSH) e della (L)-4-idrossi-borofenilalanina (BPA).¹



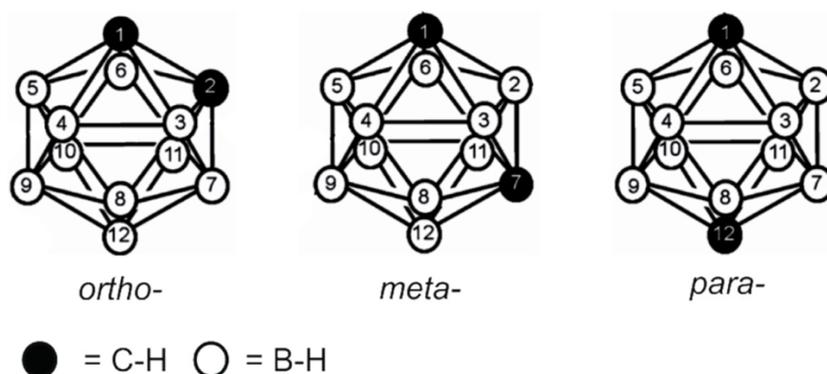
1.3.1 Ruolo centrale dei dicarbacloso-dodecarborani nella sintesi di agenti BNCT

Durante il processo di sviluppo degli agenti BNCT, si è cercato di individuare composti che avessero un contenuto elevato di boro e un'ottima stabilità al catabolismo, due criteri fondamentali per i potenziali candidati BNCT.

La classe di composti che meglio sembra rispettare questi requisiti è quella dei dicarba-closododecarborani, comunemente noti come carborani (abbreviazione del nome IUPAC carbaborani) e appartenenti al gruppo degli eteroborani poliedrici. Grazie alle loro proprietà chimico-fisiche, i carborani sono stati utilizzati per preparare catalizzatori, radiofarmaci, polimeri e un assortimento di composti di coordinazione unici.³

I carborani sono dei composti organometallici, con una geometria quasi icosaedrica, in cui gli atomi carbonio e di boro sono esacoordinati. La formula chimica generale di questi tetraedri è $C_2B_{10}H_{12}$ ed esistono come isomeri orto (1), meta (2) e para (3), che differiscono per la posizione relativa dei due atomi di carbonio nei cluster (Figura 1.3).¹¹

Figura 1.3 Rappresentazione grafica degli isomeri del carborano (chiuso $C_2B_{10}H_{12}$) con numerazione dei vertici.¹¹



Nei dicarba-closododecarborani il legame che intercorre tra carbonio e boro è un legame di tipo covalente. Questo significa che gli atomi di carbonio e boro condividono una coppia di elettroni, formando un legame stabile, che rende i carborani cineticamente stabili all'idrolisi. La stabilità di questi legami è

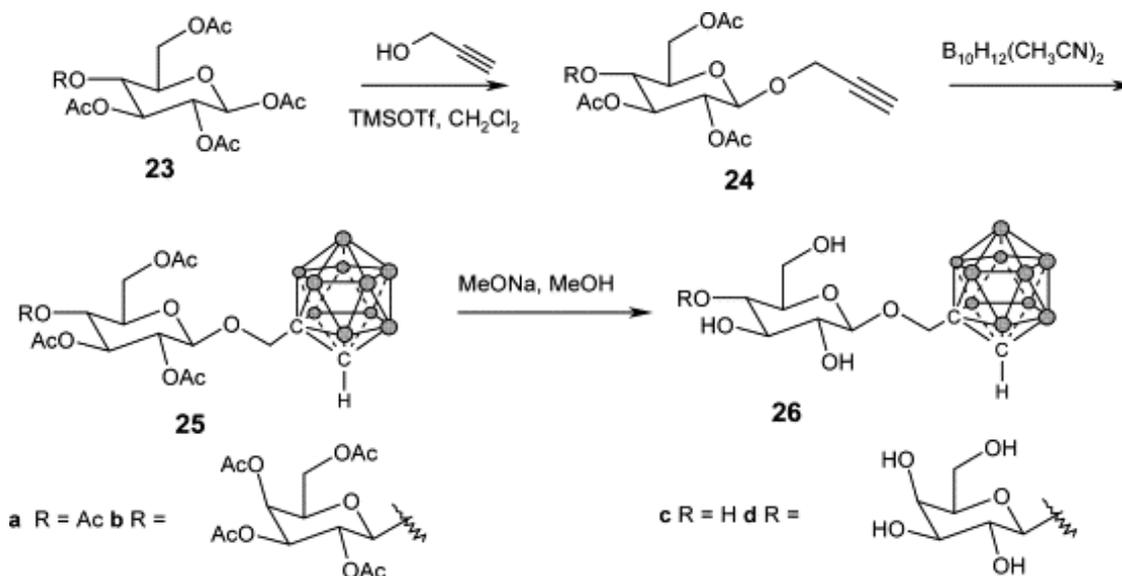
nettamente superiore rispetto ai legami carbonio-idrogeno presenti in molti composti organici, che di conseguenza sono più facilmente suscettibili all'idrolisi. I closo-carborani sono caratterizzati da legami carenti di elettroni, delocalizzazione elettronica ed estrema idrofobicità in virtù del carattere simile all'idruro degli atomi di idrogeno nella gabbia di boro, che impedisce loro di partecipare alle classiche interazioni tramite legami idrogeno.¹²

Per tali ragioni, i carborani rappresentano un tipo unico di farmacoforo che è in grado di migliorare nettamente le proprietà chimico-fisiche di un farmaco come la lipofilia. In questo modo si implementa il trasporto dell'attivo attraverso le membrane cellulari, nonché attraverso la barriera ematoencefalica (BEE), il sistema nervoso centrale (SNC) e la sua interazione con tasche idrofobiche nel sito di legame del suo target molecolare.⁹

1.3.2 Utilizzo dei carboidrati e zuccheri semplici come nuovo approccio sintetico per agenti BNCT

Nel tentativo di aumentare la capacità dei carborani di essere incorporati nella membrana cellulare, sono stati valutati diversi sostituenti, che fossero anche in grado di garantire una geometria spaziale adeguata a mantenere l'attività biologica. Un possibile approccio che è stato valutato è quello di sfruttare i carboidrati, ligandi delle lectine endogene (recettori di natura proteica situati sulla superficie di molte cellule normali, ma over espressi nelle cellule tumorali, come quelle di melanoma)¹³. Per questa ragione, i coniugati dodecarborano-carboidrati sono candidati promettenti per la BNCT, in quanto i carboidrati favoriscono l'incorporazione del farmaco nell'ambiente intracellulare. Il processo di progettazione degli ibridi di carboidrati e carborani richiede un delicato equilibrio tra lipofilia e idrofobicità (cioè il carattere anfifilico) della molecola (Figura 1.4).¹⁴ Tenendo conto di queste caratteristiche chimiche, si è pensato di utilizzare come farmacoforo la gabbia lipofila del carborano e il carboidrato idrofilo come scaffold, che direziona la porzione boronata preferenzialmente sulla superficie delle cellule tumorali.

Figura 1.4 Sintesi di derivati carborano-carboidrati proposta da Giovenzana et al.¹⁴



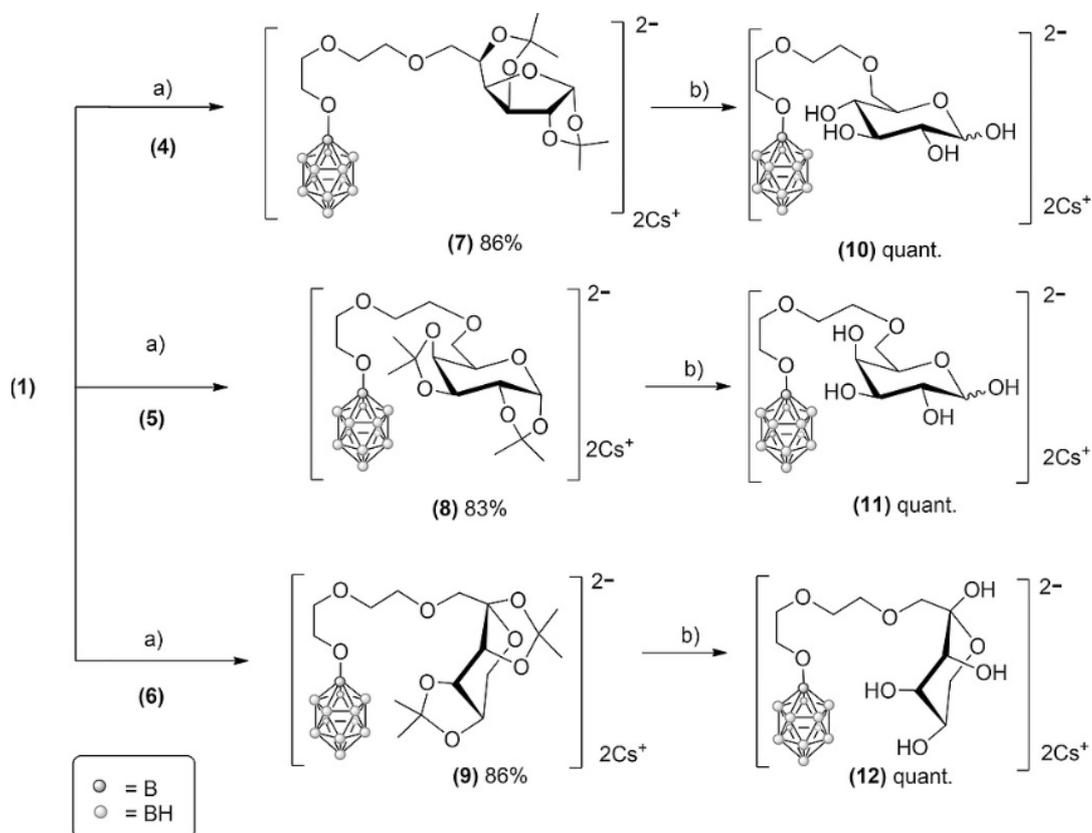
Questo gruppo ha riportato un derivato dei carboidrati innovativo in cui il carborano era inserito tra due unità di zucchero.¹⁴

Gli zuccheri semplici, in particolare, glucosio, galattosio e fruttosio rappresentano un veicolo innovativo nel direzionare il boro verso le cellule maligne, sfruttando il loro metabolismo alterato. Nello specifico, la maggior parte delle cellule neoplastiche produce energia attraverso glicolisi, seguita dalla fermentazione dell'acido lattico, arrivando ad un tasso glicolitico 200 volte superiore rispetto ai tessuti sani. Il glucosio viene utilizzato per generare intermedi metabolici, che hanno l'obiettivo di favorire la proliferazione delle cellule tumorali.

Partendo da queste considerazioni, sono stati sintetizzati composti caratterizzati dalla presenza di tre porzioni principali: un cluster di boro, uno spaziatore e uno zucchero.

La strategia sintetica che è stata messa in atto è descritta nella Figura 1.5.¹

Figura 1.5 Sintesi dei coniugati zucchero-dodecarborano. a) i. NaH, CH₃CN ii. CsF, MeOH; b) CF₃COOH aq. 90%.¹



1.3.3 Organotrifluoroborati

Gli organotrifluoroborati (R-BF₃⁻) rappresentano una valida alternativa agli acidi boronici, agli esteri boronati e agli organoborani. Grazie alla natura tetracoordinata del boro, fortificata da forti legami boro-fluoro, si è prevista un'inibizione meccanicistica delle reazioni indesiderate tipiche degli organoborati trivalenti.¹⁵

La sintesi di questi composti è stata descritta per la prima volta da Vedejs e collaboratori, partendo da acidi boronici e utilizzando KHF₂.¹⁶

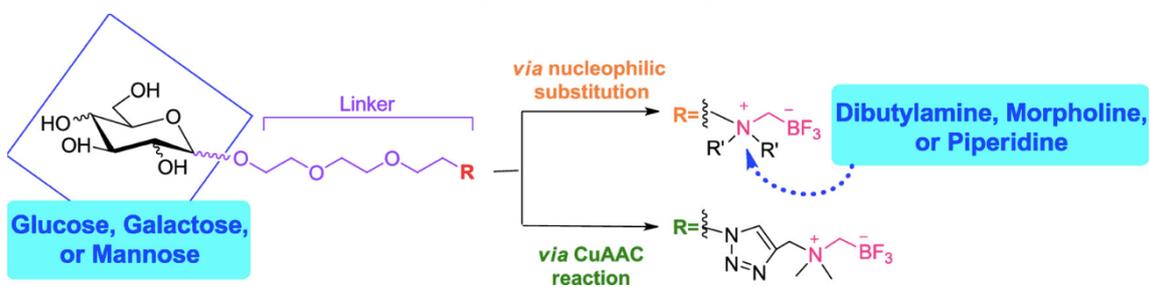
Studiando la stabilità cinetica dei reagenti organotrifluoroborati in solventi organici e acqua, si è evidenziato che i cambiamenti strutturali possono influenzare la loro stabilità. I sostituenti elettron-attrattori (eteroatomo carico positivamente in posizione beta) possono aumentare la stabilità cinetica in acqua, mentre i gruppi donatori di elettroni la diminuiscono.⁴

Prendendo in considerazione gli organotrifluoroborati non aromatici, dove $-\text{BF}_3^-$ può essere collegato ad un carbonio ibridato sp^3 , sp^2 o sp , si è cercato di valutare le costanti di velocità di solvolisi a pH 7,5 (tampono fosfato), per imitare le condizioni fisiologiche del sangue, in relazione agli effetti dei sostituenti. Dai dati di spettroscopia NMR [^{19}F] si è evidenziato che l'introduzione di una struttura zwitterionica aumenta la stabilità in soluzione per giorni o addirittura mesi. Si è, inoltre, avanzata l'ipotesi di una possibile correlazione tra la $\text{pK}_{(\text{B-F})}$ e pK_a del corrispondente acido carbossilico.¹⁷ Tale relazione, ancora non confermata, potrebbe essere utilizzata per progettare organotrifluoroborati con stabilità prevedibile.

1.3.3.1 Sintesi di promettenti agenti BNCT contenuti organotrifluoroborati

In un recente articolo viene riportata la sintesi di 12 composti aventi come struttura generica: monosaccaride-linker-gruppo trifluoroborato di ammonio (Figura 1.6).⁴

Figura 1.6 Struttura generale dei coniugati di zucchero.⁴



La struttura dei composti differisce per il tipo di monosaccaride legato (glucosio, galattosio, mannosio) e per il residuo alchilico della porzione ammoniacale, che è in grado di modulare l'idrofobicità e l'ingombro sterico della porzione zwitterionica. Il linker, che caratterizza tutte le strutture, è rappresentato dal glicole trietilenico (PEG). È noto che la PEGilazione aumenta l'interazione tra i trasportatori dei farmaci e le cellule tumorali (riducendo l'assorbimento aspecifico), aumenta la solubilità di composti idrofobici in mezzo acquoso, migliora la penetrazione nei tessuti tumorali ed estende il tempo di circolazione.¹⁸

Il gruppo BF_3^- introduce nella struttura dei composti l'atomo di boro, necessario per la BNCT, creando una specie zwitterionica. La dimostrazione dell'eccellente stabilità, idrofilicità e resistenza all'idrolisi del gruppo BF_3^- lo rendono di fondamentale importanza per le caratteristiche chimico-fisiche che tali composti devono rispettare. Inoltre, la porzione trifluoroborato consente la radiomarcatura dei composti con ^{18}F , ottenendo così una classe di traccianti utilizzabili nella scansione PET, i quali, rispetto ai traccianti tradizionali, presentano un rapporto T/N più alto nei tumori cerebrali maligni di 18.7 ± 5.5 .¹⁹ Grazie all'imaging PET è possibile effettuare uno screening iniziale sui possibili pazienti candidati per la BNCT.

In futuro, con la stessa struttura chimica si potrebbe raggiungere sia lo scopo diagnostico, sfruttando la scansione PET, sia quello terapeutico con la BNCT, modificando il ^{18}F con il ^{19}F .²⁰

Il percorso sintetico dei composti target si basa su due strategie sintetiche, che sfruttano un intermedio comune, ma una si basa su una sostituzione nucleofila (Figura 1.7) e l'altra una reazione click, reazione di cicloadizione azide-alchino catalizzata da rame, CuAAC (Figura 1.8).⁴

Figura 1.7 Sintesi di Glc1: (i) Dibutilammina, CH_3CN , 82°C ; (ii) Iodometilboronil pinacolato, Et_2O ; (iii) KHF_2 , CH_3CN , H_2O e (iv) KOH , MeOH .⁴

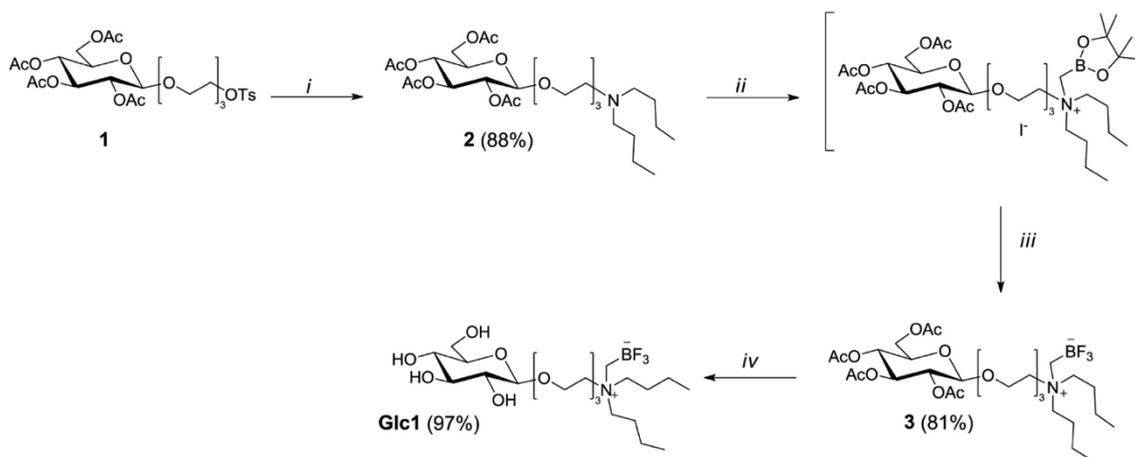
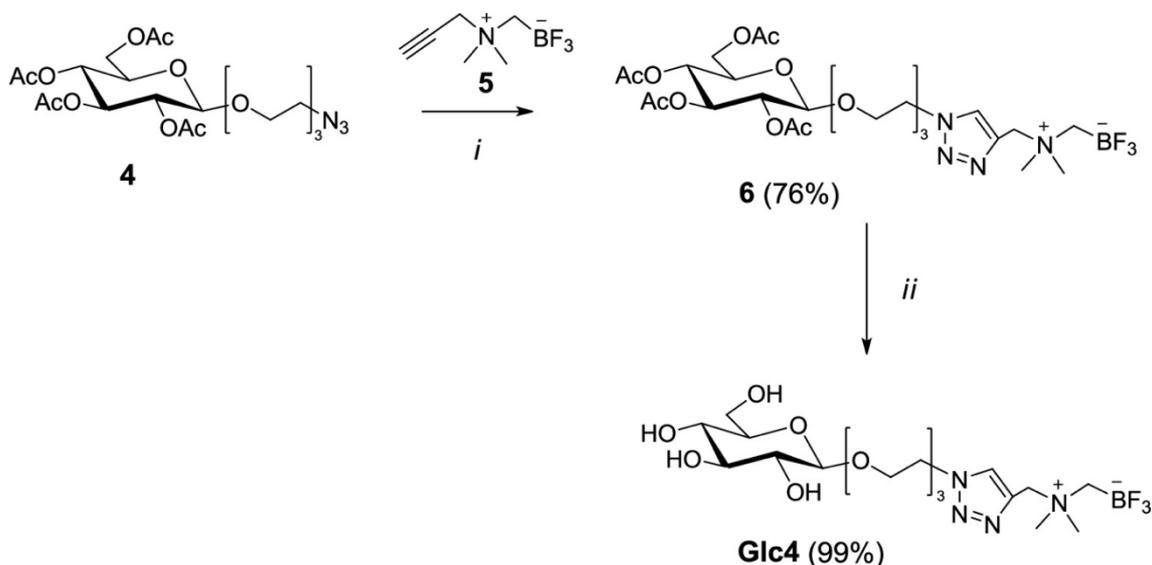


Figura 1.8 Sintesi di Glc4: (i) Ascorbato di sodio, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $t\text{-BuOH}$, H_2O , (ii) KOH , MeOH .⁴



I 12 composti sono stati analizzati sotto il profilo della stabilità dei gruppi trifluoroborato in condizioni pseudofisiologiche mediante spettroscopia NMR [¹⁹F] e della citotossicità *in vivo*, utilizzando fibroblasti primari umani, mentre Glc1 e Glc4 sono stati sottoposti a studi di stabilità HR-MS per l'ottimizzazione delle condizioni di marcatura.⁴

I risultati hanno evidenziato che Glc3 è il composto meno stabile con una costante di velocità (k) di 4×10^{-2} e un valore di emivita ($t_{1/2}$) di 24 ore.

Glc4 è risultata la molecola più stabile con un k di due ordini di grandezza inferiore rispetto a Glc3 e un'emivita di 40 giorni.⁴

Glc1 e Glc2 hanno mostrato valori di emivita di 72 e 120 ore, rispettivamente.⁴

Inoltre, la stabilità delle soluzioni di Glc1 e Glc4 (1 mg di composto in 0,5 mL di acqua demineralizzata) è stata valutata in diverse condizioni di temperatura e pH, tramite cromatografia su strato sottile (TLC).⁴

A pH 2 si è osservata una degradazione parziale e tramite esperimenti di spettrometria di massa, per il composto Glc1, si è cercato di caratterizzare possibili sottoprodotti, ottenuti a seguito della degradazione acida.

Il sottoprodotto principale è stato il derivato dell'acido boronico, la cui concentrazione tende ad aumentare in funzione del tempo.

La vitalità cellulare è stata valutata tramite un test MTT e nessuna tossicità è stata riscontrata fino a 100 μM , ma a 1 mM si sono evidenziati diversi comportamenti per i vari composti.⁴

In particolare, Glc4, Gal4, Man4 e Man3 non hanno mostrato tossicità anche a 1 mM, mentre Glc1-3, Gal1-3 e Man1-2 a questa concentrazione hanno indotto una riduzione della vitalità cellulare significativa.⁴

Tenendo in considerazione la messa a punto di una strategia sintetica ottimale e l'ottenimento di risultati preliminari incoraggianti, aprono la speranza verso la scoperta di nuovi agenti BNCT, fondamentali per sviluppare trattamenti più mirati e meno invasivi per combattere il cancro.

1.4 Ruolo degli studi di metabolismo nel processo di sviluppo di nuovi farmaci

Il processo di sviluppo di un farmaco è costituito da diverse fasi, che vanno dall'identificazione e ottimizzazione del lead, agli studi preclinici e clinici (fase I, II, III), fino alla sua definitiva registrazione da parte delle Agenzie Regolatorie.

Durante le fasi che portano alla scoperta di nuovi farmaci, è importante ottimizzare l'affinità per il target e le proprietà della molecola che influenzano l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo, l'escrezione e la tossicità (ADMET).²¹

In particolare, gli studi predittivi delle proprietà chimico-fisiche (costante di dissociazione acida, lipofilia, stabilità chimica, solubilità e la farmacocinetica) e di stabilità metabolica sono fondamentali per attuare una strategia di profilazione efficace delle NCE (nuove entità chimiche).²²

Quando si parla di metabolismo di un farmaco, si fa riferimento al processo di conversione di un composto lipofilo in metaboliti più solubili, che possono essere più facilmente eliminabili. Nello specifico, il farmaco subisce: (1) un metabolismo di fase I, caratterizzato da reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi; (2) un metabolismo di fase II che coinvolge la coniugazione del composto o dei suoi metaboliti di fase I con molecole endogene, come acidi glucuronici, solfati, glicine o glutammina. Le reazioni di coniugazione rendono i metaboliti più idrosolubili, facilitando la loro escrezione principalmente attraverso la via renale o biliare.

Il metabolismo può influenzare l'efficacia e la tossicità di un farmaco, poiché durante le reazioni a cui può andare incontro, può produrre metaboliti attivi o tossici che possono interagire con bersagli biologici. Pertanto, la comprensione del metabolismo di un farmaco è fondamentale per poter garantire sicurezza ed efficacia di un trattamento farmacologico.

1.4.1 Test di stabilità metabolica *in vitro*

Il fegato rappresenta il principale sito di metabolismo della maggior parte dei farmaci scoperti. La superfamiglia dei citocromi (CYP) è la famiglia di enzimi maggiormente coinvolta in questo processo.

L'identificazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del farmaco e la determinazione dei parametri cinetici (K_m , V_{max} e CL_{int}) sono fondamentali per la comprensione della farmacocinetica nell'uomo e per migliorare la stabilità e di conseguenza l'efficacia del farmaco, attraverso modifiche strutturali.²¹

Prima di eseguire lo studio di stabilità metabolica delle NCE, vengono determinate la purezza (preferibilmente superiore al 90%), la stabilità chimica e la solubilità (preferibilmente superiore a $10 \mu M$).²²

I test *in vitro* di stabilità metabolica vengono condotti con epatociti, microsomi epatici o altre frazioni subcellulari come la frazione S9, ottenibile da 9 g di surnatante di omogenato epatico.

I microsomi si ricavano tramite ultracentrifugazione da diversi tessuti, come il fegato di animali e donatori umani. Questi artefatti cellulari vescicolari rappresentano il sistema più semplice ed economico da utilizzare negli studi di metabolismo perché contengono gli enzimi CYP. In questo modo i microsomi rappresentano un importante fonte per gli studi di metabolismo *in vitro*.

Tuttavia, è importante notare che gli studi *in vitro* che utilizzano microsomi epatici hanno delle limitazioni: (1) l'ambiente di laboratorio può essere molto diverso da quello fisiologico, il che può influenzare le reazioni metaboliche; (2) le reazioni metaboliche mediate dai microsomi possono non essere rappresentative di ciò che avviene nel corpo; (3) il tempo di incubazione è limitato (le attività enzimatiche diminuiscono dopo due ore di incubazione).²²

1.4.1.2 Aspetti pratici di screening della stabilità metabolica

Di seguito è riportata una possibile procedura di come può essere impostato lo screening di stabilità metabolica, descritta in letteratura.²² Il composto in analisi (concentrazione finale 1 μM) è sottoposto ad incubazione a 37°C insieme a microsomi epatici e/o animali selezionati (ratto, topo, cane, scimmia). Il tutto avviene in presenza di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ di proteina microsomiale e NADPH 1 mM (cofattore di CYP), in un volume totale di 150 μL di tampone fosfato 100 mM, pH 7,4. All'inizio dell'incubazione viene aggiunto NADPH e per arrestare le reazioni enzimatiche si aggiunge acetonitrile freddo ad intervalli di tempo prestabiliti. Le proteine precipitate vengono rimosse per centrifugazione a 3.200 giri/minuto. Infine, viene analizzato il surnatante, utilizzando la tecnica della cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). I bianchi e i campioni in presenza o assenza di cofattore e microsomi vengono poi confrontati per valutare ed evidenziare la formazione dei possibili metaboliti.

1.4.2 Applicazione della spettrometria di massa negli studi di metabolismo

Nella valutazione dell'attività di una nuova entità chimica, è necessario caratterizzare, identificare e quantificare completamente i suoi metaboliti, poiché tali informazioni possono essere sfruttate per migliorare il *lead compound* e sintetizzare NCE metabolicamente più resistenti.

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica altamente specifica e sensibile che svolge tre funzioni principali: (1) la ionizzazione delle molecole, (2) la separazione delle stesse in base al loro rapporto massa/carica (m/z) e (3) la determinazione della corrispettiva abbondanza di ciascuno ione prodotto.²³

Grazie alle caratteristiche appena descritte, questa tecnica può essere impiegata per determinare il peso molecolare, fornire informazioni riguardanti la struttura, portando all'identificazione di metaboliti.

Grazie all'introduzione della tecnica di ionizzazione elettrospray (ESI), accoppiata a sistemi LC-MS, si sono fatti enormi passi avanti nell'analisi di biomolecole.

Attualmente, la spettrometria di massa tandem (MS/MS), è utilizzata in ambito metabolomico per studiare la presenza e la quantità di metaboliti in matrici complesse. Utilizzando una serie di collisioni controllate con gas inerte all'interno del sistema di analisi, gli ioni precursori selezionati in base al loro rapporto m/z possono essere frammentati generando ioni prodotto, riconducibili a una o più porzioni della molecola di origine (Tabella 1.1).²⁴ Di solito, la struttura del composto da analizzare è ben nota, facilitando così la sua identificazione. Per quanto riguarda gli esperimenti di spettrometria di massa tandem, invece, consentono lo studio del comportamento di ionizzazione e frammentazione dei metaboliti eventuali, fornendo così le informazioni necessarie per caratterizzarne la struttura.²⁵

Tabella 1.1 Frammentazione caratteristica della classe dei coniugati dei farmaci mediante MS/MS.²⁴

Coniugare	Modalità	Scansione ^a
Glucuronidi	+/-	NL 176 u (-C ₆ H ₈ O ₆)
Solfati fenolici	+	NL 80 u (-SO ₃)
Solfati alifatici	-	Precursori di m/z 97 (HSO ₄)
Solfonati	-	Precursori di m/z 81 (HSO ₃)
Solfinati	-	NL 64 u (-SO ₂)
Aril-GSH	+	NL 275 u (-C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆)
Alifatico-GSH	+	NL 129 u (-C ₅ H ₇ NO ₃)
N -acetilcisteine	-	NL 129 u (-C ₅ H ₇ NO ₃)
Coenzima A tioesteri	+	Precursori di m/z 428 (ADP ⁺)
	-	Precursori di m/z 339 e 358
Esteri butilici della carnitina	+	Precursori di m/z 103 (C ₄ H ₇ O ₃)
Taurine	+	Precursori di m/z 126 (Tau+H ⁺)
Fosfati	-	Precursori di m/z 63 (PO ₂ ⁻) e m/z 79 (PO ₃ ⁻)

L'utilizzo di software in grado di elaborare i dati post-acquisizione è una pratica che non è nuova negli studi di metabolomica. Infatti, in letteratura si evidenzia l'utilizzo di software come Compound Discoverer, MetaboLynx e MetWorks.²⁶

Nello specifico, questi programmi sono in grado di confrontare i cromatogrammi di massa dei campioni, raccolti in diversi punti temporali, contro matrice bianca.

1.5 Studio di potenziali agenti BNCT mediante analisi LC-MS

L'analisi di potenziali agenti BNCT mediante LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) consente la rilevazione, l'identificazione e la caratterizzazione dei composti utilizzati nella terapia neutronica di cattura del boro.²⁷ Questa tecnica può fornire informazioni cruciali sulla composizione, sulla stabilità e sul metabolismo di tali composti, inoltre può essere utilizzata per valutarne l'efficacia e la sicurezza.²⁸

LC-MS è una tecnica relativamente rapida, che consente l'analisi di un gran numero di campioni in un breve lasso di tempo.

I parametri di separazione come la fase mobile, il tipo di colonna cromatografica e i parametri di eluzione devono essere ottimizzati per garantire la massima separazione e rilevazione dei composti di interesse.

La selezione della colonna appropriata è cruciale per garantire una separazione efficiente e una migliore risoluzione dei composti contenenti il gruppo trifluoroborato. Alcune delle colonne più comuni includono²⁹:

- Colonne a fase inversa: utilizzano una fase stazionaria apolare e una fase mobile composta da una miscela acquosa e un modificatore organico, come acetonitrile o metanolo. Garantiscono una buona risoluzione per un'ampia gamma di composti e sono comunemente impiegate per l'analisi di composti apolari.

Le colonne C18 e C8 sono entrambe colonne a fase inversa, e la scelta tra le due dipende dalle esigenze specifiche dell'analisi. Le colonne C8, in particolare, offrono una minore ritenzione idrofobica rispetto alle colonne C18, risultando in tempi di ritenzione inferiori per i composti idrofobici.

- Colonne a scambio ionico: queste colonne si basano sulla capacità dei composti ionici di interagire con gruppi funzionali caricati sulla fase stazionaria. La scelta della colonna a scambio ionico dipende dall'applicazione specifica e dalla composizione dei composti da analizzare. Le colonne a scambio cationico e anionico potrebbero essere utilizzate, ad esempio, per separare ioni contenenti il gruppo

trifluoroborato di ammonio ($R_3-N^+-CH_2-BF_3^-$) da altre componenti presenti nella matrice.

- Colonne a fase normale: queste colonne sono composte da una matrice solida polare, tipicamente silice o resina, e una fase mobile con un alto contenuto di modificatore organico come metanolo, isopropanolo, acetonitrile o acetone in ordine decrescente di forza. Incrementando il contenuto di acqua, invece, è possibile accelerare l'eluizione dei composti polari. Le colonne a fase normale possono essere impiegate per la separazione di molecole che contengono il gruppo trifluoroborato di ammonio, data la sua elevata polarità.

Per quanto riguarda la fase mobile, questa è costituita da una miscela di acqua o tampone con solventi organici. L'aggiunta di una piccola quantità di acido formico o acido trifluoroacetico all'acqua e al solvente organico può migliorare la separazione cromatografica, poiché tendono a neutralizzare i gruppi silanolicci liberi, riducendo così le interazioni secondarie con la colonna che influenzano negativamente la forma del picco, causando fenomeni come il *tailing*.²⁹

Inoltre, in LC-MS, è importante utilizzare tamponi volatili per regolare il pH della fase mobile. La selezione del tampone dipende dalle proprietà chimiche dei composti in analisi e dalla loro stabilità in relazione al pH..²⁹

Un altro parametro da regolare è il flusso della fase mobile che dipende dalla colonna utilizzata e dalla natura dei composti in analisi. Regolando accuratamente il flusso, è possibile ottenere una separazione adeguata e una migliore risoluzione dei picchi. In conclusione, l'analisi LC-MS dei composti contenenti il gruppo trifluoroborato offre significativi vantaggi in termini di sensibilità, specificità, quantificazione e velocità di analisi, rendendo questa tecnica estremamente utile per la caratterizzazione di potenziali agenti BNCT.

CAPITOLO 2. SCOPO E DEFINIZIONE DEL LAVORO

La BNCT è una radioterapia basata sulla cattura neutronica del boro che sfrutta meccanismi biologici per colpire selettivamente le cellule tumorali risparmiando dal danno i tessuti sani. I prodotti delle reazioni che rendono possibile la BNCT, vale a dire la particella alfa [^4He], responsabile dell'attività farmacologica, e l'atomo di litio [^7Li] percorrono una distanza paragonabile al diametro delle cellule (circa 10 μm); per questo motivo un agente BNCT non necessariamente deve riuscire ad entrare all'interno del nucleo della cellula per causare un danno al DNA. Questo rappresenta un enorme vantaggio in quanto l'ambiente tumorale rende difficile la progettazione di molecole in grado di essere trasportate attraverso la membrana citoplasmatica e ancora di più all'interno del nucleo.

Un agente BNCT per avere i risultati desiderati attesi deve: (1) presentare, all'interno della cellula tumorale, una concentrazione elevata di boro (2 mM); (2) avere un rapporto T/N e un rapporto T/B superiori all'unità; (3) presentare una citotossicità sistemica minima e una rapida eliminazione; (4) in ultimo, il veicolo di trasporto del boro non deve essere tossico. Questo aspetto rappresenta una delle sfide più importanti per i ricercatori, se si considera il fatto che il farmaco deve essere somministrato a concentrazioni elevate per raggiungere i range di concentrazioni di boro utili per l'attività farmacologica.

Per questa ragione, durante il processo di sviluppo e di approvazione, di un nuovo agente BNCT è fondamentale conoscere il suo metabolismo e gli aspetti che caratterizzano la sua stabilità all'interno dell'ambiente fisiologico. In questo modo si può predire il suo comportamento all'interno dei fluidi biologici per determinare da una parte l'eventuale sviluppo di composti tossici durante le reazioni di metabolismo e dall'altra, attraverso studi di stabilità chimica (ambiente acido, basico, fisiologico) e plasmatica si può capire se effettivamente l'agente BNCT può essere utilizzato nella pratica clinica.

Metodi analitici (come LC-MS) possono essere di fondamentale importanza per avere tutti i dati utili a descrivere il profilo di un possibile agente BNCT.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di applicare la tecnica LC-HRMS agli studi di stabilità chimica, plasmatica e metabolica utili alla caratterizzazione completa di nuovi potenziali agenti BNCT-PET.

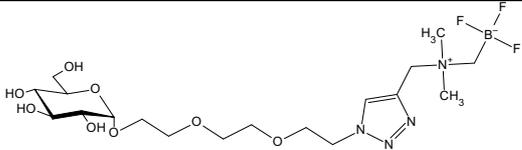
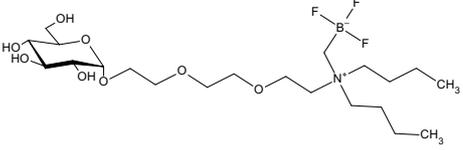
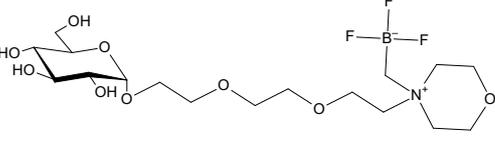
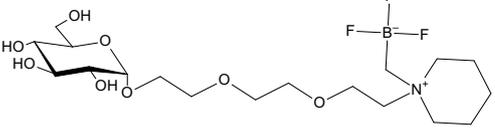
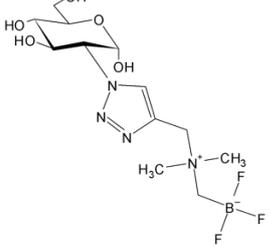
CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali utilizzati

3.1.1 Reattivi

- Trizma base (Tris-HCl), Dimetilsolfossido (DMSO, Carlo Erba, Milano, Italia);
- Sonde boronate BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e AMF28 (Tabella 3.1), fornite dal laboratorio del Professor Panza, UPO, DSF e sintetizzati secondo procedure descritte in letteratura⁴ o riportate nella tesi di laurea “Nuovi derivati della Glucosammina per la Terapia a Cattura Neutronica del Boro” di Federico Airoidi, UPO, DSF.

Tabella 3.1 Strutture delle sonde boronate analizzate.

Nome comune	Struttura	Formula molecolare	Peso molecolare [g/mol]
BNCT153		$C_{18}H_{34}BF_3N_4O_8$	502.2907696
BNCT154		$C_{21}H_{43}BF_3NO_8$	505.3742296
CG6.20		$C_{17}H_{33}BF_3NO_9$	463.2514296
CG10.28		$C_{18}H_{35}BF_3NO_8$	461.2786096
AMF28		$C_{12}H_{22}BF_3N_4O_5$	370.1330896

- Acido cloridrico (HCl), idrossido di sodio (NaOH), soluzione fisiologica sodio cloruro 0,9%, plasma di topo;
- 3-(bromuro di 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), siero bovino fetale (FBS), glutammina, penicillina, streptomina.
- Microsomi di topo, cloruro di magnesio (MgCl₂), glucosio-6-fosfato (G6P), nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP⁺), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD).

3.1.2 Solventi

- Acqua deionizzata purezza MilliQ ottenuta mediante SISTEMA PER LA PRODUZIONE DI ACQUA OSMOTIZZATA E ULTRAPURA, modello 1760 (G. Maina, sistemi per la produzione di acqua pura, Torino, Italia);
- Acqua, acetonitrile e acido formico grado UHPLC (Carlo Erba, Milano, Italia).

3.1.3 Apparecchiature usate

LC-MS

Spettrometro di massa Q-Exactive Plus UHMR Hybrid Quadrupole Orbitrap equipaggiato di:

- Sistema UHPLC Vanquish Duo.

COLONNE CROMATOGRAFICHE

- Colonna Luna Omega Polar C18 5 µm 100 Å, 150 x 2 mm;
- Colonna Kinetex 2.6 µm C18 100 Å, 150 x 2.1 mm.

BAGNO TERMOSTATICO

Bagno termostatico DUBNOFF a scuotimento orizzontale.

CENTRIFUGHE

Eppendorf 5452 mini-spin.

BILANCE

- Bilancia tecnica: LIBROR EB-4300SW;
- Bilancia analitica: Precisa XR 205 SM-DR.

VORTEX

VELP SCIENTIFIC 2X.

ULTRASUONI

SWEEPZONE TECHNOLOGY QUANTREX S200.

SPETTROFOTOMETRO PER MICROPIASTRE

Ultramark microplate imaging system, Bio-Rad.

MISURATORE pH

METTLE TOLEDO MP220 pH Meter.

PIPETTE

GILSON pipetman classic: P10, P20, P200, P1000.

LETTORE DI MICROPIASTRE

MICROPLATE READER BIO-RADN.

EVAPORATORE CENTRIFUGO

CHRIST RVC 218 DELTEK Italia.

VETRERIA DA LABORATORIO

3.2 METODO LC-MS

Nelle Tabelle 3.2 e 3.2.1 sono riportati il metodo cromatografico e il settaggio della sorgente ESI adottati nello studio di stabilità chimica, metabolica e plasmatica oggetto del presente progetto di tesi.

Tabella 3.2 Metodo cromatografico LC-MS

Metodo cromatografico LC-MS	
Colonna	Kinetex ® C18 2.6 µm 100 Å, 150 x 2.1 mm
Eluente A	H ₂ O 0.1% Acido formico (v/v)
Eluente B	ACN 0.1% Acido formico (v/v)
Flusso	300 µL/min
Volume di iniezione [µL]	2 µL
Tempo analisi [min]	15 minuti
Rivelatore	ESI-Orbitrap-MS
Gradiente	5 %B (0-3 min), 5-90 %B (3-10 min), 90 %B (10,0-11,5 min), 90-5 %B (11,5-15 min)

Tabella 3.2.1 Condizioni MS

Source Type	ESI +/-
Spray Voltage [kV]	3.5 kV
Capillary Temperature [°C]	300 °C
Sheath gas flow [N₂; L/min]	45.00 L/min
Sweep gas flow [N₂; L/min]	1.00 L/min
Max Spray Current [µA]	100.00 µA

3.3 Preparazione fasi mobili

Fase mobile A è stata preparata come segue:

- 1.0 mL di acido formico in 1.0 L di H₂O grado LC-MS, ossia H₂O 0.1% v/v FA.

Fase mobile B è stata preparata come segue:

- 1.0 mL di acido formico in 1.0 L di ACN grado LC-MS, ossia ACN 0.1% v/v FA.

3.3.1 Preparazione soluzione madre

Le soluzioni madre delle sonde boronate oggetto degli studi di stabilità (BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e AMF28) sono state ottenute dissolvendo 5.0 mg di sostanza in 1 mL di DMSO al fine di ottenere delle soluzioni 5.0 mg/mL da cui procedere negli step successivi di diluizione.

Lo schema di diluizione è riportato in basso:

5,0 mg sonda boronata
↓
1 mL DMSO (5,0 mg/mL)

3.3.2 Preparazione dei tamponi

Il tampone a pH fisiologico Tris-HCl 50 mM, utilizzato per condurre lo studio di stabilità chimica riportato nella sezione 4.2 dei Risultati e Discussione, è stato allestito come segue:

- Trizma base 6.02 g (pKa= 8.30) + 11.2 g KCl + 476.1 mg MgCl₂ vengono solubilizzati in 1 L di H₂O milliQ;
- Aggiunta q.b. di HCl 37% *p/p* per arrivare a pH 7.70 misurato a 25°C, il quale a 37°C corrisponde a 7.40.

Il tampone fosfato 0.1 M pH = 7.4, utilizzato per condurre le analisi 1H NMR riportate nella sezione 4.4 dei Risultati e Discussione, è stato preparato come segue:

- 13.8 mg di NaH₂PO₄ • H₂O + 69.7 mg di K₂HPO₄ + 55.9 mg di KCl in 5 mL di D₂O.

3.4 Studio di stabilità chimica

Le prove di stabilità chimica vengono effettuate sulle sonde boronate derivate da Glc (BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28, AMF28), in presenza di HCl 0.05 M, NaOH 0.5 M, Tris-HCl 50 mM pH = 7.4, soluzione fisiologica 0,9% sodio cloruro. Le condizioni sono schematizzate nella Tabella 3.3.

Tabella 3.3 Parametri della stabilità chimica

Temperatura[° C]	Conc. HCl [M]	Conc. NaOH [M]	Conc. Tris-HCl pH = 7.4 [M]	Soluzione fisiologica 0.9% NaCl	Tempo [h]
37	0.05	0.5	1		1

Le soluzioni madre (SS) da 5 mg/mL sono state diluite come segue:

- 20 μL di SS + 80 μL di soluzione da testare per ciascuna condizione di stabilità.

Le soluzioni risultanti (WS) da 1 mg/mL sono state rapidamente agitate e incubate per 60 minuti a 37 °C sotto agitazione.

Dopo il periodo di incubazione, i campioni sono stati trattati come segue:

- Tris-HCl pH 7.4 samples: WS + 80.0 μL di H_2O
- 0.05 M HCl samples: WS + 80.0 μL di 0.04 M NaOH (neutralizzante)
- 0.5 M NaOH samples: WS + 80.0 μL di 0.4 M HCl (neutralizzante)
- soluzione fisiologica 0,9% sodio cloruro: WS + 80.0 μL di H_2O

I controlli positivi (CTRL +) sono stati ottenuti nello stesso modo, ad eccezione dell'assenza del periodo di incubazione che fungeva da t_0 :

- WS + 80.0 μL di H_2O .

I campioni bianchi di ciascuna condizione del test sono stati ottenuti in modo analogo senza includere gli analiti di interesse.

Dopo aver aggiunto la controparte neutralizzante, i campioni sono stati sottoposti a rapida agitazione e centrifugazione a 13.000 giri al minuto per 5 minuti. In seguito, è stata eseguita una diluizione 1:100 utilizzando H_2O grado LC-MS prima delle analisi LC-MS, utilizzando la colonna C18 Kinetex.

3.4.1 Analisi LC-MS/MS ed elaborazione dati

Le analisi vengono eseguite tramite l'impostazione Full MS Top 5 in entrambe le polarità (ESI +/-) nell'intervallo [50.00-750.00 m/z]. I dati grezzi risultanti, contenenti gli spettri Full-MS e MS^2 , sono stati elaborati manualmente.

Lo studio di stabilità chimica oggetto della presente tesi è stato strutturato come analisi semi-quantitativa. Di conseguenza, sono state considerate le risposte strumentali relative impostando i t_0 come controllo al 100%, anziché riportare

delle concentrazioni assolute. La risposta strumentale relativa è stata calcolata tramite la seguente formula:

$$\frac{\text{Area analita (BF}_3 \text{ o BO}_2\text{H}_2), t_n}{\text{Area BF}_3(t_0) + \text{Area BO}_2\text{H}_2(t_0)} \times 100$$

Dove:

- il numeratore corrisponde alla risposta strumentale dell'analita o dei prodotti di degradazione al tempo t_n in considerazione (t_0 o t_1);
- il denominatore è la sommatoria delle risposte strumentali di analita ed eventuali prodotti di degradazione al t_0 , impostato formalmente come 100%.

L'RSD (Relative Standard Deviation) è stata calcolata dalla risposta strumentale (area) corrispondente al segnale delle sonde boronate e dei corrispettivi prodotti di degradazione.

3.5 Stabilità plasmatica

Le prove di stabilità in plasma di topo sono state eseguite ottenendo delle soluzioni a titolo noto in plasma murino. In particolare, le soluzioni madre (SS) da 5 mg/mL sono state diluite come segue:

- 20 μL di SS + 80 μL di plasma murino per verificare tale condizione di stabilità.

Le soluzioni risultanti (WS) da 1 mg/mL sono state rapidamente agitate e incubate per 60 minuti a 37 °C sotto agitazione.

Dopo il periodo di incubazione, i campioni sono stati trattati come segue:

- Campioni plasma: WS + 80.0 μL di fase mobile B freddo da freezer (precipitazione delle proteine)

Al fine di indurre la precipitazione proteica e ottenere dei campioni LC-MS compatibili, i controlli positivi (CTRL +) sono stati ottenuti nello stesso modo, ad

eccezione dell'assenza del periodo di incubazione che fungeva da t0: WS + 80.0 μ L di fase mobile B. I campioni bianchi di ciascuna condizione del test sono stati ottenuti in modo analogo senza includere gli analiti di interesse.

3.6 Analisi dei derivati boronici mediante LC-MS e spettroscopia NMR in D₂O

La soluzione madre di BNCT154 2 mg/mL in tampone fosfato deuterato 0.1 M pH =7.4 è stata sottoposta ad incubazione sotto agitazione a 37°C per 72 h ed è stata analizzata tramite ¹H NMR e LC-MS in infusione. Successivamente il campione è stato diluito 1:100 in H₂O LC-MS e rianalizzato tramite LC-MS sia in infusione diretta sia via LC-MS con colonna Kinetex C18.

I campioni bianchi e il t0 sono stati ottenuti in modo analogo tramite la stessa procedura di diluizione.

3.7 Studio di metabolismo

Lo studio di stabilità metabolica è stato strutturato in modo tale da simulare il metabolismo di fase I, includendo microsomi di topo (MLM) e i cofattori necessari per attivare gli enzimi ossidativi (es. NADPH). Lo schema seguito per l'allestimento dei campioni è riportato nella Tabella 3.4.

Le soluzioni madre (SS) da 20 mM in H₂O sono state diluite come segue:

- 25 μ L di SS + 475 μ L di tampone Tris-HCl 50 mM, pH 7.4.

Le soluzioni risultanti (WS) da 1 mM sono state trattate come segue per ottenere i campioni CTRL (B0, Bs e Bm), i campioni di studio (P) e il bianco (B):

- 12.5 μ L WS + 237.5 μ L di Tris-HCl (B0);
- 12.5 μ L WS + 187.5 μ L di Tris-HCl + 50.0 μ L NADPH 6.5 mM (Bs);
- 12.5 μ L WS + 225.0 di Tris-HCl, 12.5 μ L MLM (Bm);
- 12.5 μ L WS + 175.0 μ L di Tris-HCl + 50.0 μ L NADPH 6.5 mM+ 12.5 μ L MLM (P);
- 187.5 μ L di Tris-HCl + 50.0 μ L NADPH 6.5 mM + 12.5 μ L MLM (B).

I campioni (25 mM) sono stati rapidamente agitati e incubati per 60 minuti a 37 °C sotto agitazione. Dopo l'incubazione, le biotrasformazioni metaboliche sono

state arrestate aggiungendo 250 μ L di ACN freddo, a cui è seguita una rapida agitazione in vortex e centrifugazione a 13.000 giri al minuto per 5 minuti. I surnatanti sono stati trasferiti in vial e analizzati tramite LC-MS/MS.

Tabella 3.4 Scheda di lavoro per incubazione in vitro

	B0	Bs	Bm	P
Substrato (WS)	12.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L
Tris-HCl, 50 mM pH = 7,4	237.5 μ L	187.5 μ L	225.0 μ L	175.0 μ L
NADPH, 6,5 mM	-	50.0 μ L	-	50.0 μ L
Microsomi (MLM)	-	-	12.5 μ L	12.5 μ L
Volume finale (μL)	250.0 μ L	250.0 μ L	250.0 μ L	250.0 μ L
Minuti di incubazione	60 min			
Temperatura ($^{\circ}$C)	37 $^{\circ}$ C + agitazione			
Dopo il periodo di incubazione aggiungere 250.0 μ L di ACN freddo				

Sistema generante NADPH

Componenti	mg	Vol. Tot	Vol. Disponibile
Beta NADP⁺ (1.3 mM)	5.1 mg	1 mL	50 μ L
Glucosio 6 fosfato (G6P) (3.3 mM)	4.7 mg		
MgCl₂ (3.3 mM)	1.6 mg		
Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH) (0.4 U/mL)	0.82 μ L		

Sistema biologico

Microsomi (MLM)	mg/mL	20
	volume	12.5

3.7.1 Studio di stabilità metabolica: analisi LC-MS/MS

I campioni della stabilità metabolica sono stati analizzati tramite l'impostazione Full-MS Top 5 in entrambe le polarità (ESI +/-) nell'intervallo [100.00-750.00 m/z]. I dati grezzi risultanti, contenenti gli spettri Full-MS e MS², sono stati elaborati manualmente, al fine di identificare possibili prodotti di degradazione.

3.8 Saggio MTT

Il saggio MTT per la valutazione della citotossicità è stato eseguito sul composto AMF28, utilizzando due linee cellulari, A375 (cellule di melanoma) e U87 (cellule di glioblastoma). I terreni di crescita utilizzati, rispettivamente, per A375 e U87 sono stati i terreni DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ed EMEM (*Eagles's Minimum Essential Medium*), precedentemente trattati con:

- 10% di siero bovino fetale (FBS);
- 100 U/mL e 100 µg/mL (% Penicillina/Streptomicina);
- 2 mM di glutammina.

3.8.1 Preparazione delle cellule per il saggio MTT

Per determinare l'effetto citotossico del composto AMF28 è stato seguito il seguente protocollo:

- Le colture cellulari sono state lavate con PBS e staccate mediante l'aggiunta di 1 mL di tripsina a 37°C. L'attività della tripsina viene bloccata mediante l'aggiunta di terreno di coltura completo e le cellule vengono raccolte in una falcon e centrifugate per 5 minuti a 1000 RCF.
- Eliminato il surnatante, si risospendono le cellule in 1 mL di terreno.
- Si prelevano 10 µL di cellule risospese, si aggiungono 90 µL di colorante trypan blue di questi 10 µL vengono aggiunti alla camera di Burker utilizzata per contare le cellule. Per ricavare il numero di cellule si esegue la seguente proporzione:

Numero di cellule contate: $3 \times (10 \times 10.000 \times 1) =$ numero di cellule

- Una volta che si ricava il numero di cellule si esegue tale proporzione:

Numero di cellule \div 1000 μ L = 25 (numero di pozzetti) \times 6.000 (numero di cellule per ogni pozzetto) \div X

X = μ L di terreno in cui ho le cellule da piastrare

- Per ricavare gli mL di terreno necessari si esegue tale operazione:
200 μ L (volume di terreno per ogni pozzetto) \times 25 – X μ L = μ L di terreno da aggiungere
- Si prelevano 200 μ L e si riempiono i 25 pozzetti Multiwell a fondo piatto ottenendo piastre con 6.000, 8.000, 10.000 cellule di entrambe le linee cellulari, lasciate aderire per 24 h a 37°C e 5% di CO₂, prima di eseguire il saggio di citotossicità
- Dopo le 24h le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti (0.1-300 μ M) del composto AMF 28 ed incubate per 24, 48 o 72h.

3.8.2 Procedura saggio MTT

- La vitalità cellulare è stata misurata mediante il test del 3-(bromuro di 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).
- Si prepara una soluzione 5 mg/mL di MTT in PBS che viene aggiunta al 10% del volume del pozzetto (20 μ L in 200 μ L).
- Le cellule vengono incubate per 30 minuti a 37°C al 5% di CO₂ in modo tale che MTT entri nei mitocondri delle cellule. Si elimina il surnatante, si risospende in 100 μ L di DMSO, che viene utilizzato anche per la preparazione dei controlli per la valutazione della tossicità dovuta al solo DMSO.
- Terminato il periodo di incubazione si controlla che la solubilizzazione dei cristalli viola di MTT nei mitocondri sia completa e viene misurata l'assorbanza dei campioni (assorbanza a 570 nm a cui viene sottratta quella a 630 nm) con uno spettrofotometro per piastre multi-pozzetto.

CAPITOLO 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

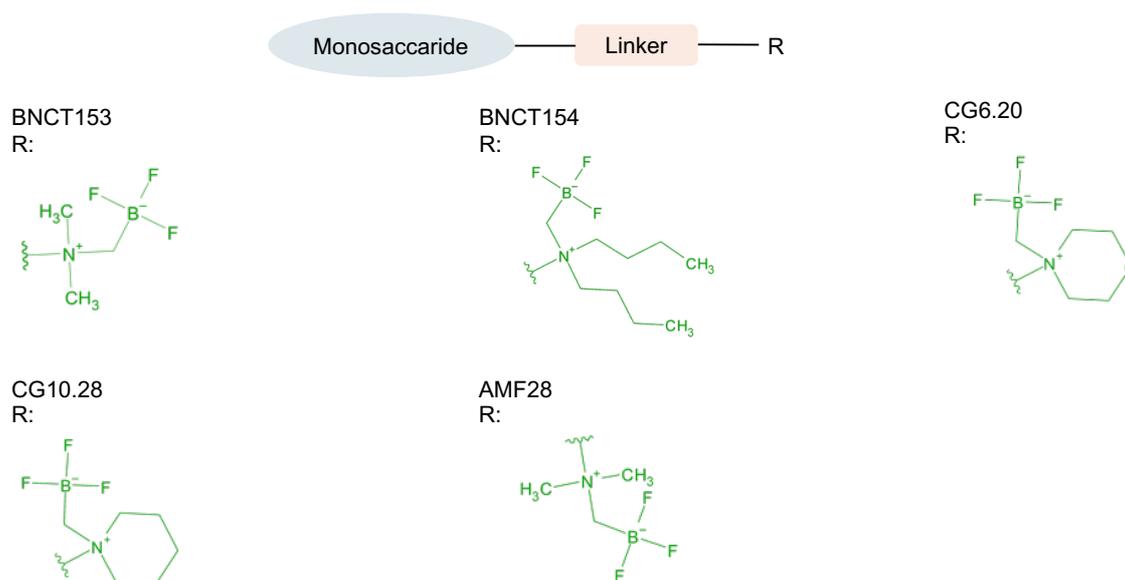
Dalla letteratura scientifica si evince che, durante il processo di sviluppo di potenziali agenti BNCT, è fondamentale, per il successo della terapia, che questi rispondano a determinate caratteristiche. I requisiti da rispettare sono relativi alla struttura, alla concentrazione nel tessuto tumorale, nel plasma e alla verifica della farmacocinetica per evitare l'insorgenza di citotossicità sistemica. Nello specifico, a livello strutturale, per poter garantire una concentrazione adeguata nel tessuto tumorale, attraverso l'interazione con i target d'interesse, e per poter garantire che il veicolo di rilascio del boro non sia tossico, si sono adottate delle strategie sintetiche "ad hoc". Una metodologia messa in atto per aumentare la concentrazione dei potenziali agenti BNCT all'interno del tessuto tumorale è stata quella di inserire all'interno della struttura zuccheri semplici quali glucosio, galattosio, mannosio, che sono in grado di direzionare il boro verso le cellule maligne, sfruttando per questo il loro metabolismo alterato. I monosaccaridi non essendo in alcun modo tossici per l'organismo rappresentano inoltre un veicolo di elezione da inserire all'interno della struttura di potenziali agenti per la BNCT. Per aumentare ancora di più l'interazione tra i trasportatori target espressi dalle cellule tumorali, sfavorire l'assorbimento aspecifico e migliorare la solubilità in un mezzo acquoso e l'estensione del tempo di circolazione degli agenti boronati, una possibile modalità è quella di inserire all'interno della struttura il glicole trietilenico (PEG).

Un approccio promettente per veicolare il quantitativo di boro richiesto per la terapia basata sulla cattura neutronica del boro è quello di avere all'interno della struttura dell'agente BNCT il gruppo funzionale trifluoroborato, che presenta un'elevata stabilità, idrofilicità e resistenza all'idrolisi, sebbene nel tempo tenda, comunque, a idrolizzare a favore della formazione dell'acido boronico corrispondente. Inoltre, il gruppo BF_3^- consentendo la radiomarcatura con il ^{18}F , permette, grazie alla scansione PET, di monitorare nel tempo la concentrazione di boro all'interno del tessuto tumorale, fornendo quindi la possibilità di effettuare uno screening iniziale per verificare il potenziale farmacologico e farmaceutico di nuovi candidati. La presenza del gruppo trifluoroborato insieme ad una porzione

ammoniacale permettono inoltre di ottenere una struttura zwitterionica che aumenta notevolmente la stabilità delle strutture che la contengono.

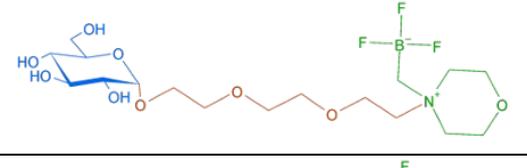
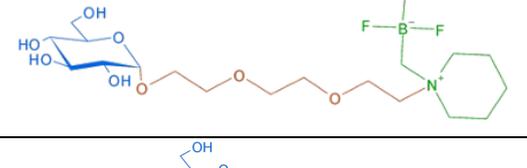
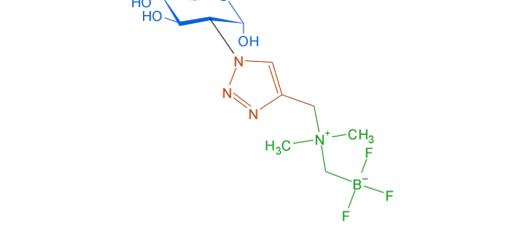
Considerando le caratteristiche che un promettente agente BNCT dovrebbe presentare, in questo lavoro di tesi sono state prese in considerazione cinque sonde boronate, aventi la seguente struttura generica: monosaccaride-linker-gruppo trifluoroborato di ammonio (Figura 4.1).

Figura 4.1 Struttura generica sonde boronate



Grazie alla struttura che conferisce loro “sulla carta” proprietà ottimali, questa famiglia di composti rappresenta un importante oggetto di studio (Tabella 4.1) le cui caratteristiche, in parte già descritte in letteratura, devono ancora essere approfondite.

Tabella 4.1 Strutture delle sonde boroniche analizzate.

Nome comune	Struttura	Formula molecolare	Peso molecolare [g/mol]
BNCT153		$C_{18}H_{34}BF_3N_4O_8$	502.2907696
BNCT154		$C_{21}H_{43}BF_3NO_8$	505.3742296
CG6.20		$C_{17}H_{33}BF_3NO_9$	463.2514296
CG10.28		$C_{18}H_{35}BF_3NO_8$	461.2786096
AMF28		$C_{12}H_{22}BF_3N_4O_5$	370.1330896

4.1 Sviluppo metodo LC-MS

Nella prima parte dello studio si è reso necessario lo sviluppo di un metodo cromatografico LC-MS utile sia per la determinazione delle cinque sonde boronate (per valutare ad esempio la purezza o per l'analisi quantitativa o semiquantitativa) sia per l'identificazione e la caratterizzazione degli eventuali prodotti di degradazione chimica, plasmatica e metabolica.

La struttura delle sonde boronate descritte in questo lavoro risulta polare. Tale caratteristica è dovuta sia alla presenza del glucosio sia alla porzione zwitterionica. Per questa ragione risultano particolarmente sensibili alle variazioni di pH con un riflesso inevitabile anche sulla separazione cromatografica. Sulla base di queste considerazioni si è optato in prima battuta per l'utilizzo della

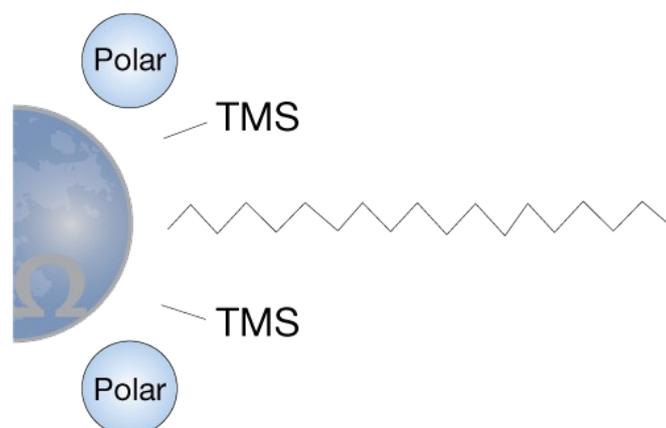
colonna Luna Omega Polar C18, che presenta una fase stazionaria, costituita da catene idrofobe legate ad una superficie di silice, in grado di trattenere composti polari (Figura 4.2).

Nelle prime fasi di lavoro sono state condotte delle prove preliminari di sviluppo metodo, al fine di ottenere un metodo in grado di trattenere e analizzare le specie in esame tramite LC-MS (Tabella 4.2).

Tabella 4.2 Metodo cromatografico LC-MS utilizzato nelle prove preliminari.

Metodo cromatografico LC-MS – prove preliminari	
Colonna	Luna Omega Polar ® C18 5 µm 100 Å, 150 x 2.1 mm
Eluente A	H ₂ O 0.1% Acido formico (v/v)
Eluente B	MeOH 0.1% Acido formico (v/v)
Flusso	300 µL/min
Volume di iniezione [µL]	5 µL
Tempo analisi [min]	25 minuti
Rivelatore	ESI-Orbitrap-MS
Gradiente	5-35 %B (0-11,5 min), 35-80 %B (11,5-16,0 min), 80 %B (16,0-19,0 min), 80 %B (19-19,2 min), 5 %B (19,2-25 min)

Figura 4.2 Rappresentazione funzionalizzazione fase stazionaria colonna Luna Omega Polar C18. <https://www.phenomenex.com/products/luna-omega-hplc-column/luna-omega-polar-c18>

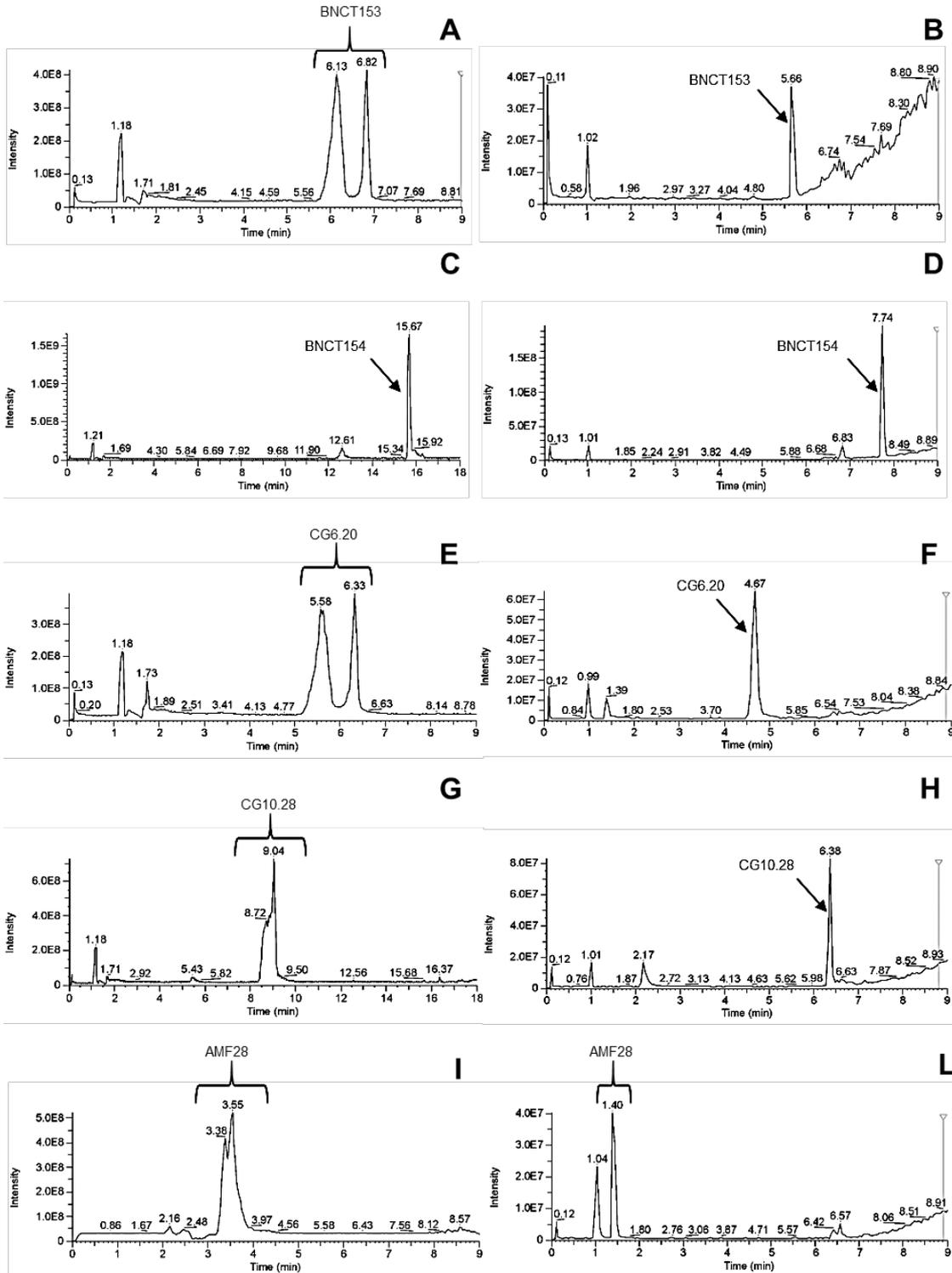


La maggiore problematica riscontrata a seguito dell'utilizzo della colonna Luna Omega Polar C18 è stata la scarsa ritenzione degli analiti in questione. Infatti, alcune delle sonde boronate analizzate non essendo tratteneute dalla colonna cromatografica, presentavano un tempo di ritenzione corrispondente al tempo morto della colonna (fattore di capacità, $k < 1$) e in tutti i casi, eccezion fatta per la sonda BNCT154, si è evidenziato uno sdoppiamento del picco cromatografico probabilmente dettato da interazioni secondarie analita-fase stazionaria (Figura 4.3).

I dati ottenuti hanno portato a prendere la decisione di cambiare la colonna cromatografica per ottimizzare la separazione cromatografica e migliorare la forma del picco.

La scelta è ricaduta sulla colonna Kinetex C18, in quanto, nonostante le sonde boronate in studio siano idrofile, presentano all'interno della loro struttura catene PEG e al netto della presenza dello zwitterione sono molecole neutre. Inoltre, l'assenza di gruppi polari sulla fase stazionaria della colonna Kinetex C18, limita le interazioni secondarie e per tale ragione si assiste ad un miglioramento della separazione cromatografica delle sonde boronate con eliminazione dello sdoppiamento caratteristico della colonna Omega. I risultati ottenuti con le due colonne sono riportati nella Figura 4.3.

Figura 4.3 A, C, E, G, I: sonda boronate colonna Luna omega C18; B, D, F, H, L: sonda boronate colonna Kinetex C18



Sebbene anche in seguito al cambiamento della colonna cromatografica il composto AMF28 non sia sufficientemente trattenuto presentando un RT poco superiore al tempo morto della colonna, con $k < 1$, la scelta finale è stata quella di

considerare il metodo Kinetex a gradiente per poter avere le informazioni su tutti i composti con analisi rapide e robuste.

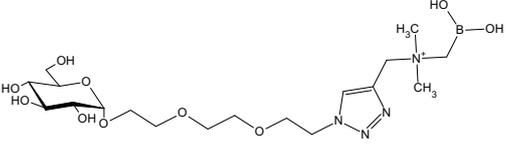
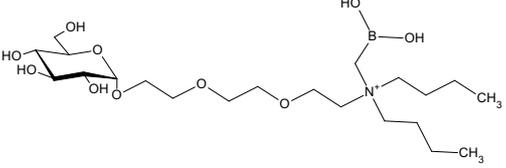
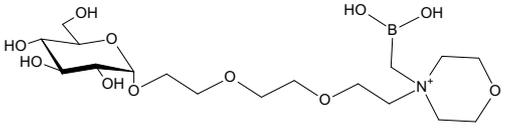
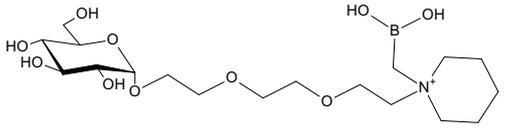
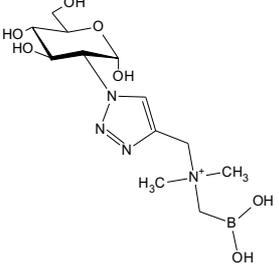
4.2 Studio di stabilità chimica

Lo studio di stabilità chimica oggetto della presente tesi è stato strutturato partendo dai dati descritti in letteratura, in cui vengono riportati i valori di emivita di BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e in cui si evidenzia la formazione del derivato boronico di BNCT154 in ambiente acido (pH 0.5 a 85 °C), tramite TLC e infusioni dirette LC-MS. Lo studio di stabilità chimica descritto in questa tesi è più articolato valutando la stabilità in diverse condizioni, come descritto nel paragrafo 3.5.1 del capitolo Materiali e metodi:

- HCl 0.05 M
- NaOH 0.5 M
- Tampone Tris-HCl 50 mM pH = 7.4 + KCl 150 mM
- Soluzione fisiologica 0.9 % *p/v*

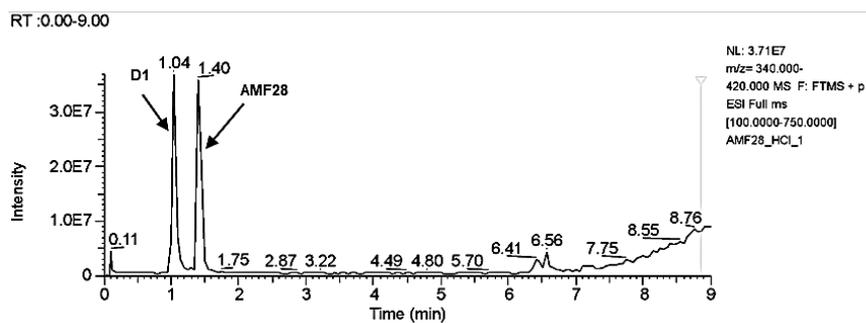
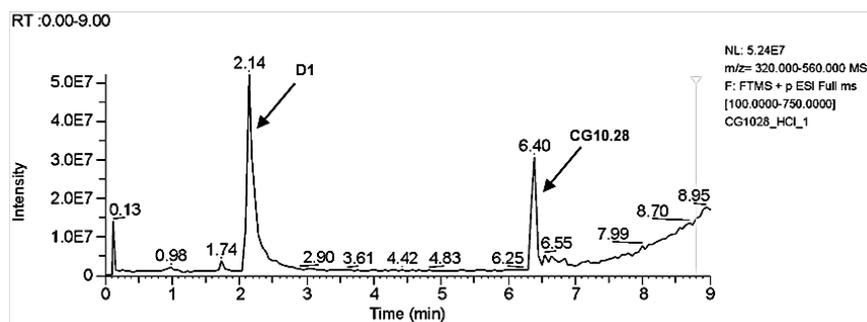
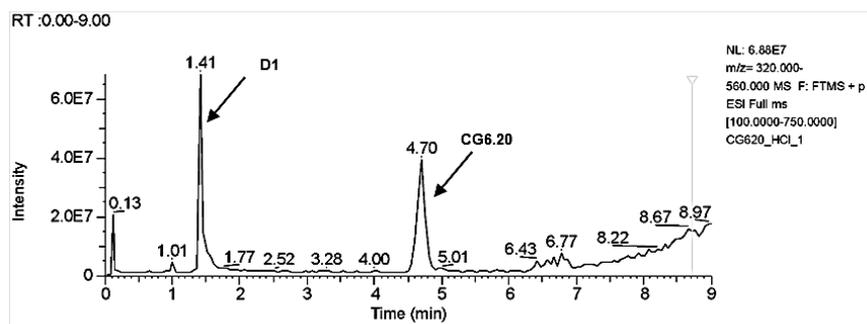
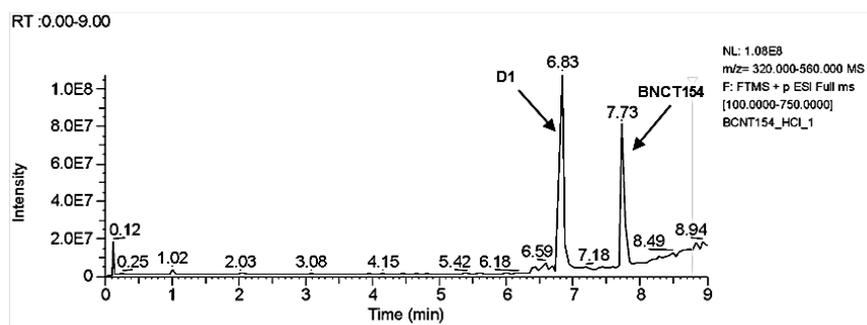
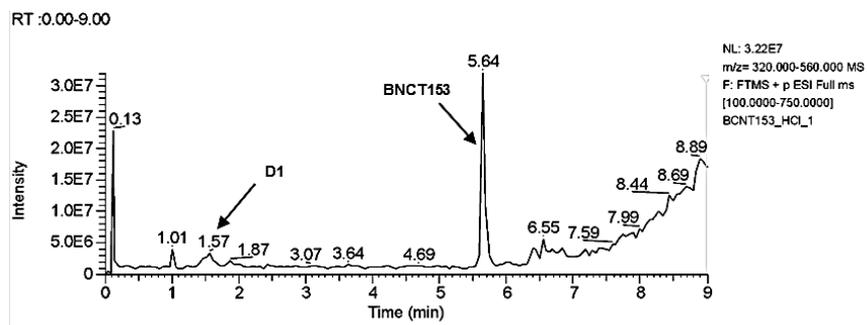
Dai dati di stabilità descritti dalla letteratura sopra citata e da quelli ottenuti dallo studio di stabilità chimica condotto si può affermare che la degradazione acida è la condizione maggiormente indicativa per evidenziare la formazione del principale prodotto di degradazione, ovvero il derivato boronico D1 (-BO₂H₂), per tutti i composti analizzati (Tabella 4.3).

Tabella 4.3 Ipotesi strutturale dei prodotti di degradazione (D1) delle sonde boronate

Nome comune	Struttura	Formula molecolare	Peso molecolare [g/mol]
BNCT153 - D1		$C_{18}H_{36}BN_4O_{10}^+$	479.3096914
BNCT154 - D1		$C_{21}H_{45}BNO_{10}^+$	482.3931514
CG6.20 - D1		$C_{17}H_{35}BNO_{11}^+$	440.2703514
CG10.28 - D1		$C_{18}H_{37}BNO_{10}^+$	438.2975314
AMF28 - D1		$C_{12}H_{24}BN_4O_7^+$	347.1520114

I cromatogrammi riportati nella Figura 4.4 dimostrano che dopo il periodo di incubazione a 37°C in condizioni acide per 60 minuti aumenta l'intensità del picco relativo al prodotto di degradazione $-BO_2H_2$ (D1), mentre quello relativo al picco della sonda boronata si abbassa per tutti i composti, eccezion fatta per il composto BNCT153, che risulta essere il più stabile tra i composti analizzati. La riduzione del picco del composto di partenza ($-BF_3^-$) con corrispondente aumento del prodotto di degradazione ($-BO_2H_2$) evidenzia la correlazione diretta tra i due, favorita dalla presenza dell'ambiente acido (Figura 4.4), confermando, così, il dato riportato nella letteratura citata.

Figura 4.4 Cromatogrammi LC-MS delle sonde boronate BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e AMF28 in HCl 0.05 M dopo 60 minuti di incubazione a 37 °C



Gli spettri +c ESI Full-MS [100.00-750.00 m/z] in HCl mostrano che le sonde boronate si presentano in modalità positiva sotto forma di addotto con il sodio $[M+Na]^+$ (Figura 4.5) mentre i derivati boronici, essendo già cationici, per la presenza dell'ammina quaternaria, sono visibili come M^+ (Figura 4.6).

Figura 4.5 Spettro MS di BNCT154 sotteso al picco con RT 7.73 min

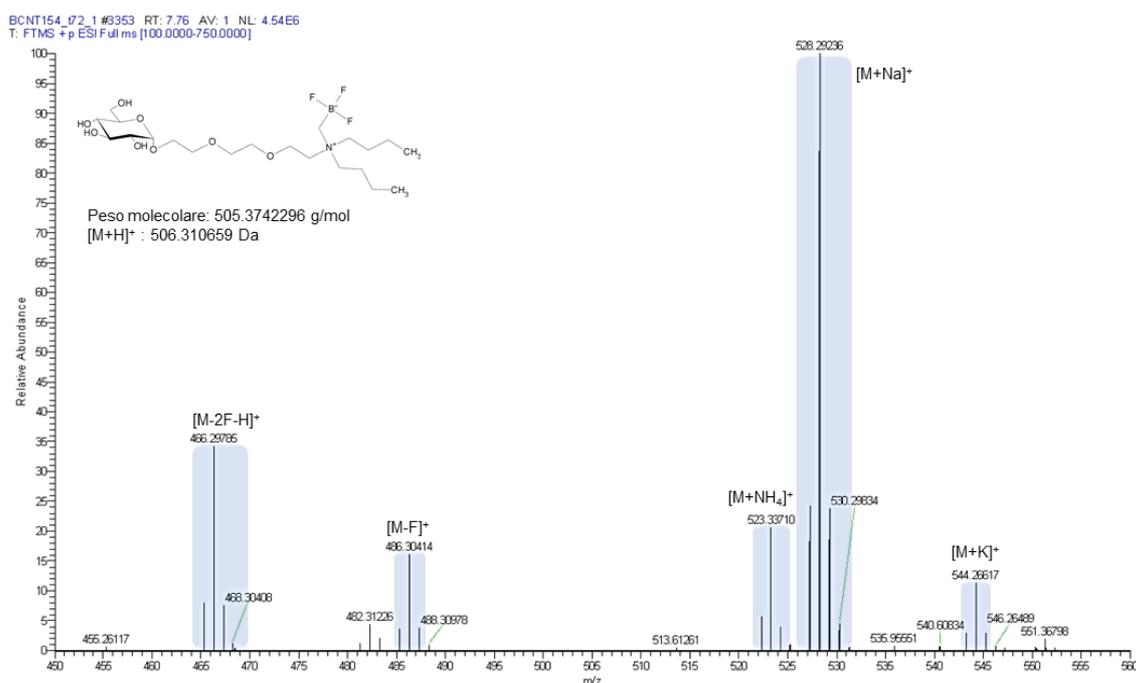
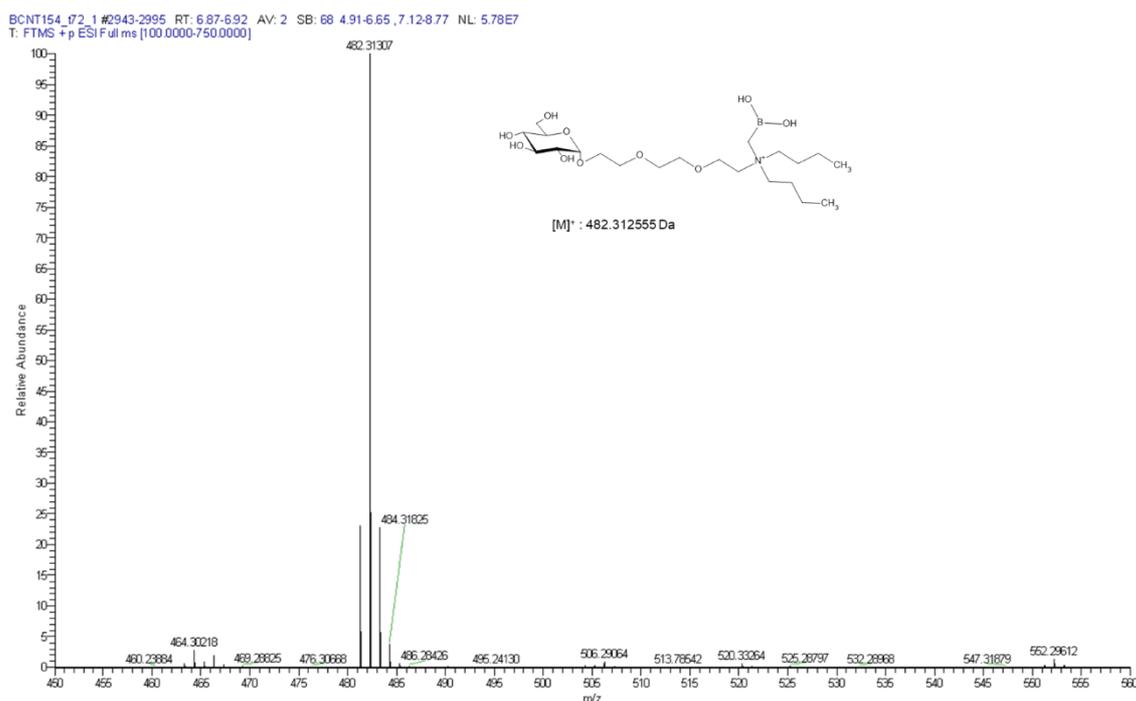


Figura 4.6 Spettro MS del prodotto di degradazione D1 sotteso al picco con RT 6.83 min



La figura 4.6 mostra lo spettro di massa relativo al prodotto di degradazione (D1) di BNCT154, sotteso al picco con RT pari a 6.83 minuti, che si presenta come M^+ : 482.31413 m/z . Lo spettro mostra, in maniera inequivocabile, il pattern isotopico del boro (evidenziati in Figura 4.5 in blu), che in MS si presenta con picchi isotopici di diversa intensità dovuti alla presenza degli isotopi stabili del boro. Nello specifico, il boro ha due isotopi naturali stabili, il boro-10 (^{10}B), presente in una percentuale naturale del 19,9% e il boro-11 (^{11}B) con una percentuale dell'80,1%. Di conseguenza il picco principale (100%) corrisponde all'isotopo più abbondante, il ^{11}B , mentre il più piccolo corrisponde (25%) al ^{10}B . Questo pattern isotopico può essere utilizzato per confermare la presenza di un atomo di boro nella molecola analizzata.

Le sonde glucotrifluoroborate presentano un comportamento in massa del tutto peculiare che ha necessitato la caratterizzazione dei diversi ioni in termini di rapporto m/z . Le informazioni raccolte sono state riassunte nella tabella 4.4, dalla quale si evince:

1. gli addotti $[M+\text{Na}]^+$ sono quelli tendenzialmente più abbondanti, eccezion fatta per i composti CG10.28 e AMF28 i quali si presentano rispettivamente come $[M-2\text{F}-\text{H}]^+$ e $[M-\text{F}]^+$;
2. I composti BNCT154, CG6.20 e CG10.28 tendono a defluorinare più facilmente in seguito alla ionizzazione ESI(+) presentandosi come $[M-2\text{F}-\text{H}]^+$, $[M-\text{F}]^+$, $[M-3\text{F}-2\text{H}]^+$, in ordine di abbondanza decrescente;
3. I composti BNCT153 e AMF28 contenenti il triazolo presente nel linker tendono a defluorinare presentandosi come $[M-\text{F}]^+$ stabilizzando la carica positiva sull'ammonio quaternario, mentre risulta essere sfavorita la di e tri- defluorinazione, ovvero $[M-2\text{F}-\text{H}]^+$ e $[M-3\text{F}-2\text{H}]^+$.

In sintesi, la presenza del triazolo all'interno del linker sembrerebbe sfavorire il progredire della defluorinazione osservata in sorgente.

Contrariamente i corrispettivi acidi boronici (D1) hanno un comportamento meno complesso presentandosi come catione $[M]^+$ (vedi tabella 4.5), dato che la carica

positiva è già costitutivamente presente sull'ammonio quaternario (NR_4^+); inoltre, si possono osservare molto poco abbondanti gli ioni $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e $[\text{M}-\text{BO}_2\text{H}_2]^+$.

Tabella 4.4. Caratterizzazione in massa delle sonde glucotrifluoroborate. M: Peso molecolare, %: abbondanza relativa.

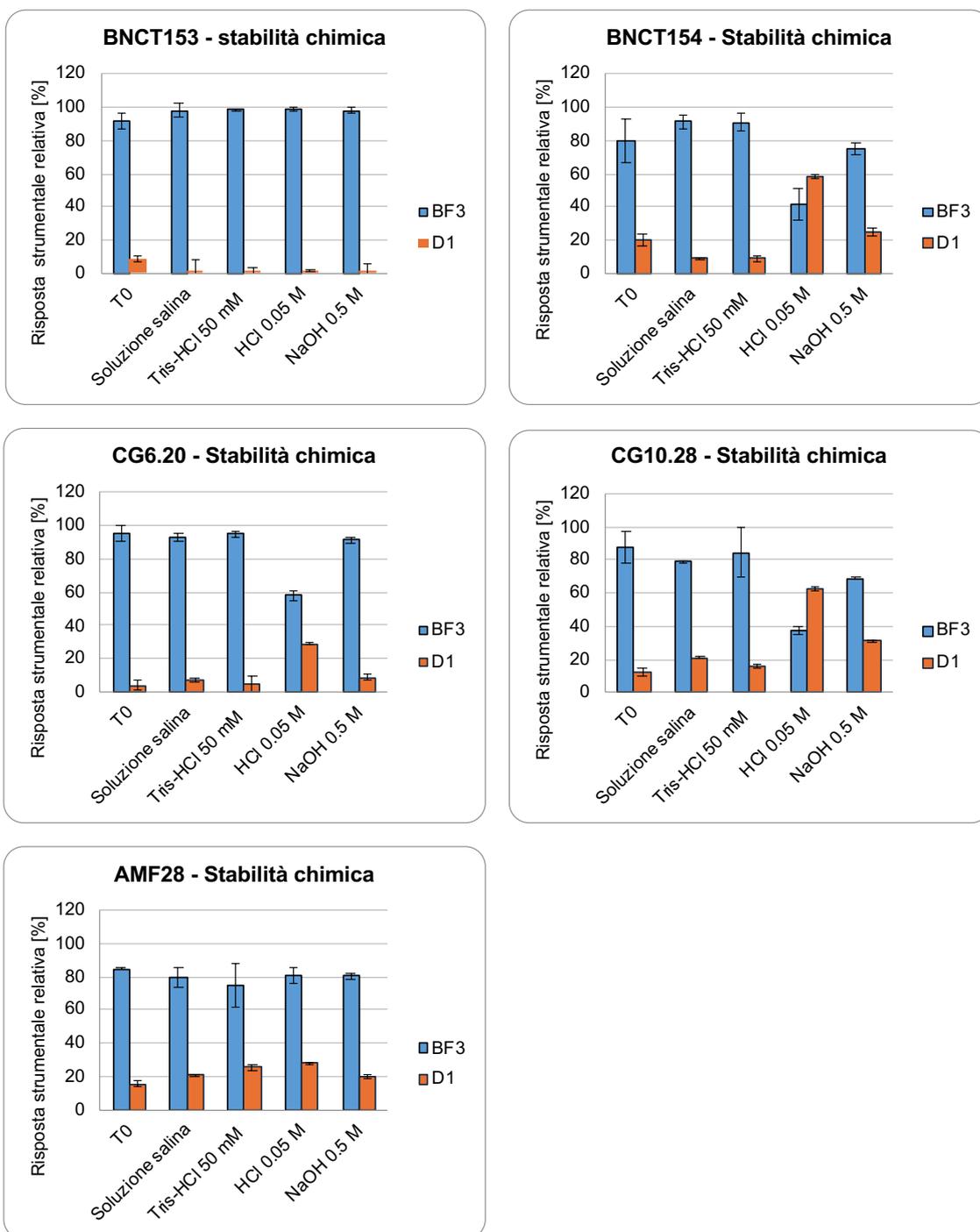
Composto	Peso Molecolare [g/mol]	$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (%)	$[\text{M}-\text{F}]^+$ (%)	$[\text{M}-2\text{F}-\text{H}]^+$ (%)	$[\text{M}+\text{K}]^+$ (%)	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (%)	$[\text{M}-3\text{F}-2\text{H}]^+$ (%)
BNCT153	502.290	525.232 (100.00%)	483.243 (73.10%)	463.237 (16.11%)	541.206 (8.54%)	520.276 (24.31%)	443.231 (>2.00%)
BNCT154	505.374	528.293 (100.00%)	486.304 (24.05%)	466.299 (75.17%)	544.267 (5.81%)	523.338 (17.03%)	446.292 (2.52%)
CG6.20	463.251	486.210 (100.00%)	444.221 (8.81%)	424.214 (67.49%)	502.184 (5.87%)	481.254 (18.86%)	404.208 (4.60%)
CG10.28	461.278	484.230 (98.19%)	442.242 (20.13%)	422.236 (100.00%)	500.204 (5.51%)	479.275 (22.36%)	402.229 (4.21%)
AMF28	370.133	393.153 (14.46%)	351.165 (100.00%)	331.158 (0.00%)	409.127 (3.21%)	388.197 (0.51%)	311.152 (0.00%)

Tabella 4.5 Caratterizzazione in massa dei prodotti di degradazione D1 ($-\text{BO}_2\text{H}_2$). M: Peso molecolare, %: abbondanza relativa.

Composto	Peso Molecolare [g/mol]	$[\text{M}]^+$ (%)	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (%)	$[\text{M}-\text{BO}_2\text{H}_2]^+$ (%)
BNCT153 – D1	479.309	479.252 (100.00%)	461.241 (3.23%)	435.245 (5.05%)
BNCT154 – D1	482.393	482.314 (100.00%)	464.303 (1.61%)	438.307 (0.38%)
CG6.20 – D1	440.270	440.230 (100.00%)	422.219 (4.10%)	396.223 (2.75%)
CG10.28 – D1	438.297	438.251 (100.00%)	420.231 (2.80%)	394.244 (1.95%)
AMF28 – D1	347.152	347.173 (100.00%)	329.162 (0.00%)	303.166 (10.17%)

Per quanto riguarda i risultati dello studio di stabilità chimica delle sonde boronate si sono messi in relazione i valori di area nelle diverse condizioni testate rispetto al t0, che rappresenta il controllo negativo all'inizio delle prove di stabilità (Figura 4.7).

Figura 4.7 Istogrammi rappresentativi dello studio di stabilità chimica delle sonde boronate. Le barre dell'errore riportate corrispondono all'RSD (Relative Standard Deviation).



Come si può evincere dagli istogrammi qui riportati, le sonde boronate BNCT153 e AMF28, sono quelle maggiormente stabili in tutte le condizioni testate dopo 60 minuti di incubazione sotto agitazione. I composti BNCT154, CG6.20, CG10.28 risultano maggiormente stabili in ambiente basico, in Tris-HCl e in soluzione

fisiologica, mentre in ambiente acido si assiste ad un considerevole abbattimento dell'area rispetto al t₀, con un aumento significativo dei prodotti di degradazione descritti. I risultati ottenuti confermano quelli riportati in letteratura. È interessante constatare che l'inserimento del triazolo nel linker tra la subunità glucidica e il gruppo ammonio trifluoroborato nei composti BNCT153 e AMF28, oltre a disincentivare l'avanzare della defluorinazione in sorgente ESI(+), determina una maggiore stabilità idrolitica in tutte le condizioni sperimentali principalmente quando non è presente nel linker anche il PEG.

4.3 Studio di stabilità plasmatica

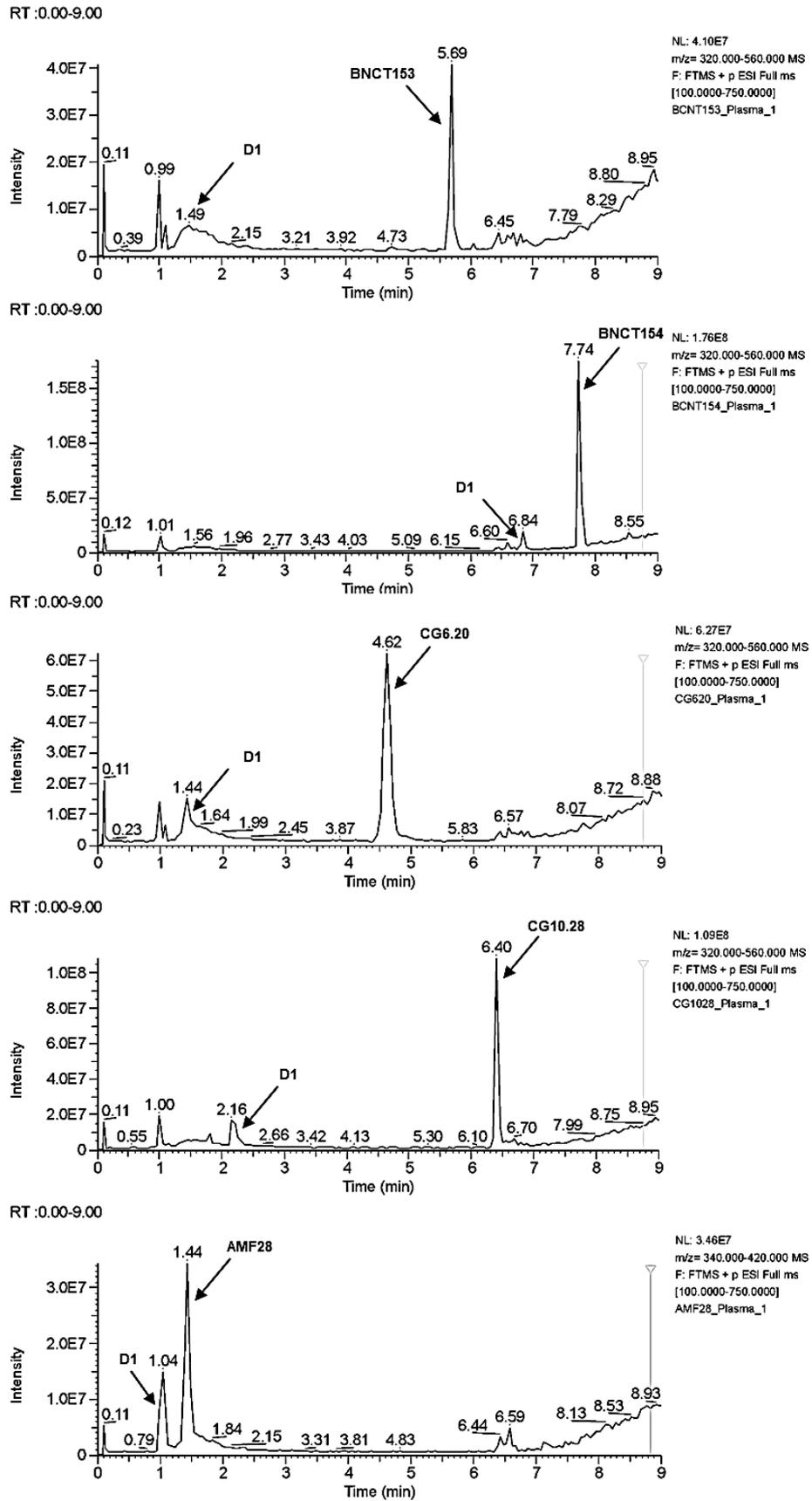
Uno degli aspetti fondamentali nella valutazione di potenziali agenti BNCT, con potenziale terapeutico, è quello di studiare la loro capacità di mantenere una determinata concentrazione nel tempo e quindi di presentare una certa stabilità a livello plasmatico. I risultati che si ottengono dagli studi di stabilità in plasma di animali da laboratorio (topi, ratti, scimmie, etc.) sono cruciali per comprendere meglio l'efficacia e la sicurezza di un potenziale agente farmacologico, così come per stabilire dosaggi ottimali e regimi di somministrazione per i test preclinici e clinici successivi.

Data l'importanza di allestire questo tipo di studi e alla luce dei dati ottenuti dallo studio di stabilità chimica completo si è voluto sottoporre le sonde boronate ad uno studio di stabilità plasmatica.

Le soluzioni risultanti dalla diluizione della soluzione madre (5 mg/mL) in 80 µL di plasma di topo sono state sottoposte ad incubazione per 60 minuti a 37°C sotto agitazione continua (sezione 3.5 capitolo Materiali e Metodi).

A scopo esplicativo, si riportano i cromatogrammi in Full-MS (+) dei campioni in studio con scan range [100.00-750.00 *m/z*] dei campioni corrispondenti alla stabilità plasmatica.

Figura 4.8 Stabilità plasmatica delle sonde boronate BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e AMF28



La Figura 4.8 mostra che, in seguito al periodo di incubazione di 60 minuti a 37°C delle sonde boronate in presenza di plasma murino, si assiste all'aumento dell'intensità relativa al picco corrispondente al prodotto di degradazione D1 (-BO₂H₂) di ciascuna sonda.

Tabella 4.6 confronto risposta strumentale delle sonde boronate in Tris-HCl, soluzione fisiologica e plasma murino. L'errore riportato corrisponde alla RSD (Relative Standard Deviation).

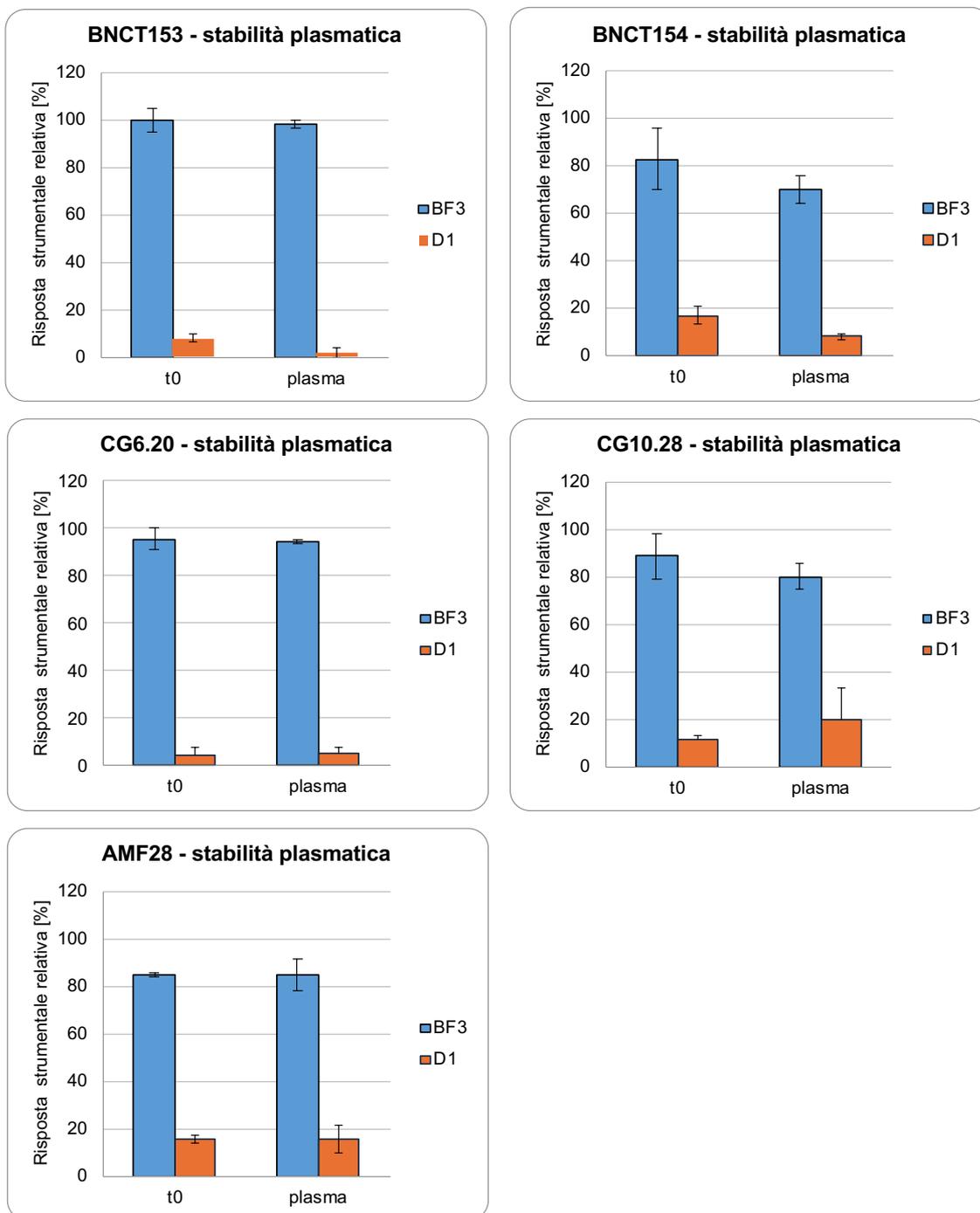
	Stabilità chimica in Tris-HCl 50 mM		Stabilità chimica in soluzione fisiologica 0.9% NaCl		Stabilità plasmatica	
	Risposta strumentale [%] -BF ₃ ⁻	Risposta strumentale [%] -BO ₂ H ₂	Risposta strumentale [%] -BF ₃ ⁻	Risposta strumentale [%] -BO ₂ H ₂	Risposta strumentale [%] -BF ₃ ⁻	Risposta strumentale [%] -BO ₂ H ₂
BNCT153	98.50±1.02	1.73±1.94	98.06±4.12	1.93±5.98	98.15±1.82	1.85±2.08
BNCT154	90.93±5.21	9.07±1.54	91.11±4.67	8.88±0.22	70.07±6.06	8.21±1.1
CG6.20	95.04±1.49	4.96±4.65	92.8±12.72	7.18±1.18	94.54±1.2	5.45±2.78
CG10.28	84.20±15.02	15.80±1.31	78.66±0.74	21.34±0.30	80.17±5.06	19.83±13.4
AMF28	74.70±13.34	25.30±1.69	79.15±6.07	20.84±0.48	84.7±16.52	15.17±5.85

Tuttavia, confrontando i risultati ottenuti dallo studio di stabilità chimica nelle condizioni pseudofisiologiche (Tris-HCl e soluzione fisiologica) con quelli relativi alla stabilità plasmatica, gli stessi risultano perfettamente paragonabili (Tabella 4.6). Di conseguenza, si può affermare che l'instabilità plasmatica osservata può essere attribuita all'ambiente acquoso e non sembrerebbe essere attribuibile alla

matrice plasmatica e/o ad altre sue componenti come è possibile evincere dalla Figura 4.9.

Infatti, dopo 60 minuti di incubazione, la risposta strumentale si riduce rispetto al t0 del 1.85% per BNCT153, del 12.7% per BNCT154, del 1.2% per CG.6.20, dell'8.40% per CG10.20 e dello 0.11% per AMF28. In conclusione, questi risultati evidenziano come le sonde boronate in studio presentino una buona stabilità plasmatica, utile a scopi terapeutici e/o diagnostici.

Figura 4.9 Istogrammi rappresentativi dello studio di stabilità in plasma di topo delle sonde boronate. Le barre dell'errore riportate corrispondono all'RSD (Relative Standard Deviation).



4.4 Esperimento ortogonale tramite LC-MS e ¹H NMR per la verifica della struttura dei derivati boronici

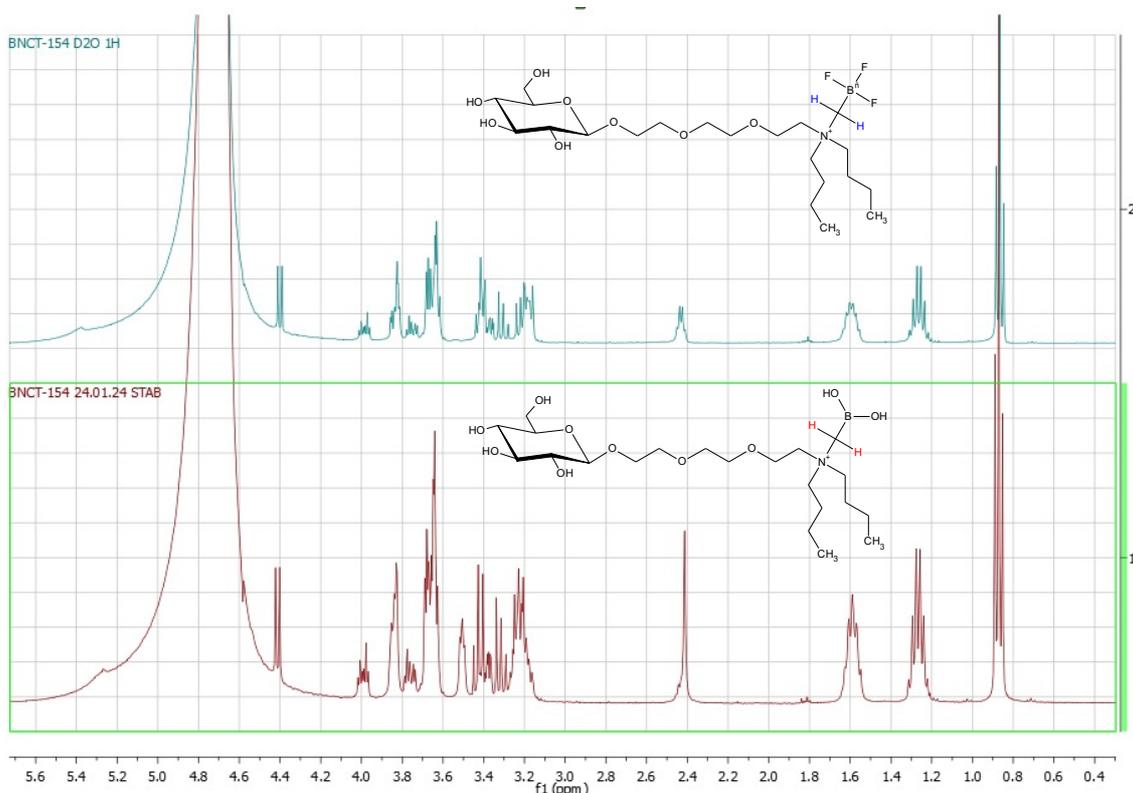
Nel presente progetto di tesi al fine di verificare la struttura dei derivati boronici formati nello studio di stabilità e analizzati mediante LC-MS, è stato strutturato

un esperimento ortogonale in ^1H NMR per confermare i dati ottenuti in LC-MS. Di conseguenza, l'esperimento è stato condotto sul composto BNCT154 in tampone fosfato pH=7.4 in D_2O ossia un solvente necessario all'analisi ^1H NMR, in modo tale da poter analizzare lo stesso campione tramite tecniche analitiche differenti.

Le condizioni di temperatura e il tempo sono stati decisi in relazione agli esperimenti di stabilità chimica svolti e ai dati riportati in letteratura, in modo da ottenere un segnale inequivocabile e correlabile alla presenza del derivato boronico (D1).

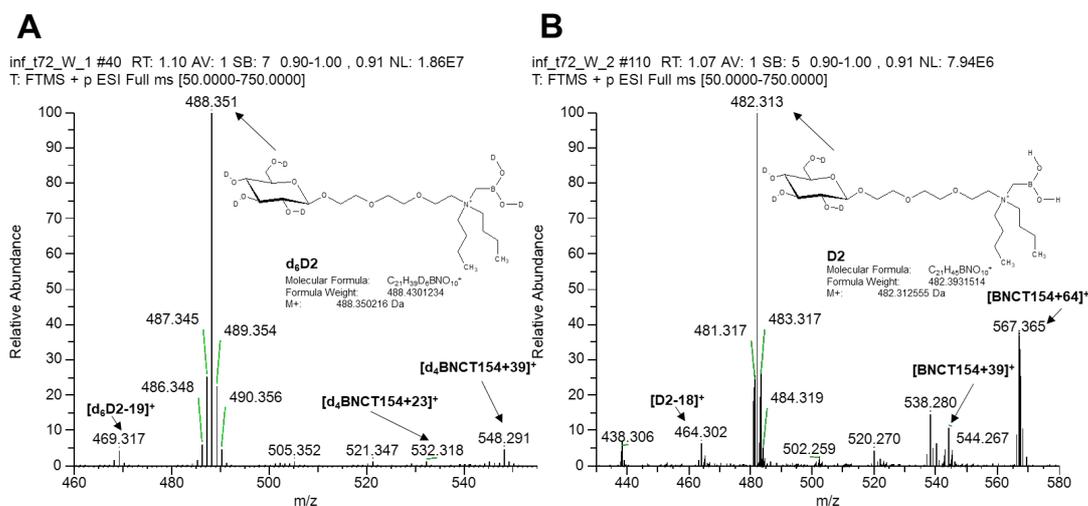
Lo spettro ^1H NMR riportato in Figura 4.10 evidenzia la presenza del composto BNCT154 ad una concentrazione di 2 mg/mL in D_2O e in condizioni tampone dopo 72 ore. L'idrolisi ad acido boronico è rilevabile dalla molteplicità del segnale CH_2 a 2.4 ppm.

Figura 4.10 ^1H NMR BNCT154 dopo 72 ore in tampone fosfato pH=7.4 in D_2O . In blu è riportato lo spettro ^1H NMR relativo a BNCT154 trifluoroborato, mentre in rosso lo spettro relativo al corrispondente acido boronico (D1).



Gli stessi campioni sono stati successivamente analizzati in LC-MS tramite infusione diretta confermando la presenza di D1 esa-deuterato (d_6D1 : 488.351 m/z) risultante dallo scambio H-D, nonché di addotti correlati a BNCT154 tetra-deuterato ($[d_4BNCT154+23]^+$, $[d_4BNCT154+39]^+$). Successivamente, il campione in D_2O è stato diluito in H_2O in modo da indurre lo scambio D-H riconfermando i rapporti m/z identificati durante l'analisi LC-MS dello studio di stabilità, ovvero del derivato boronico (D1, $[M^+ : 482.393 m/z]$) e della sonda BNCT154 sottoforma di addotti sodio, potassio. Gli spettri di massa in questione sono riportati nella Figura 4.11. Di conseguenza, la struttura dei derivati boronici si può ipotizzare con un ottimo livello di confidenza, ovvero il secondo livello secondo la classificazione della *American Chemical Society* (ACS), in quanto i dati sperimentali LC-MS e 1H NMR forniscono delle evidenze strutturali concordi.

Figura 4.11 Spettri Full-MS (+) in infusione diretta di BNCT154 dopo 72 ore di incubazione in tampone fosfato pH=7.4 in D_2O . A indica lo spettro relativo al campione in D_2O , mentre B è lo stesso campione ma diluito in H_2O .



Inoltre, i campioni diluiti in H₂O sono stati successivamente analizzati anche tramite il metodo LC-MS oggetto di discussione. Confrontando i cromatogrammi in Full-Mass (+) con scan range [100.00-750.00 *m/z*] al tempo t₀ e al tempo 72 ore si identifica nuovamente il prodotto di degradazione D1 (M⁺: 482.31413 *m/z*). Inoltre, viene identificato un ulteriore prodotto di degradazione, corrispondente allo ione M⁺: 438.30559 *m/z* e compatibile con la deboronazione della molecola (Figure 4.12-4.13). Tale ipotesi sembrerebbe essere confermata anche dall'assenza del pattern isotopico del boro nello spettro di massa, come viene evidenziato nella Figura 4.14.

L'istogramma riportato in Figura 4.15 mette in evidenza che dopo 72 ore di incubazione nelle condizioni testate, si assiste ad un abbattimento sostanziale dell'intensità relativa all'area della sonda BNCT154 da 85.9% a 4.1% a favore dell'incremento dell'area relativa al prodotto di degradazione principale (D2) 14.1% a 94.4% e del secondo prodotto di degradazione, il corrispondente deboronato (D2) da 0.0% a 1.5%.

Dalle analisi ¹H NMR il prodotto di degradazione D2 non viene identificato, probabilmente perché la sua concentrazione è inferiore al 5%, motivo per il quale l'analisi NMR non riesce a rilevarlo.

In conclusione, dai dati ottenuti si può affermare che l'idrolisi in tampone fosfato porta alla formazione di due prodotti di degradazione, l'acido boronico (D1) e in tracce il corrispondente deboronato (D2).

Figura 4.12 Cromatogrammi LC-MS di BNCT154 in tampone fosfato pH = 7.4 e acqua deuterata al tempo t0

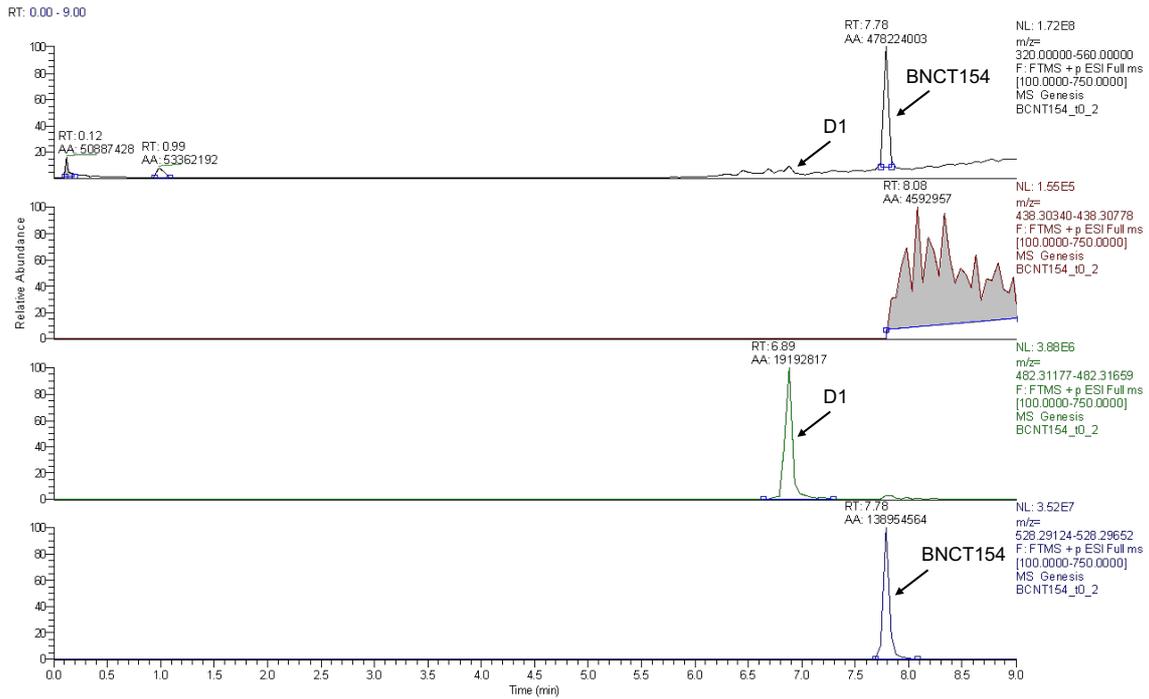


Figura 4.13 Cromatogrammi LC-MS di BNCT154 in tampone fosfato pH = 7.4 e acqua deuterata al tempo t72h

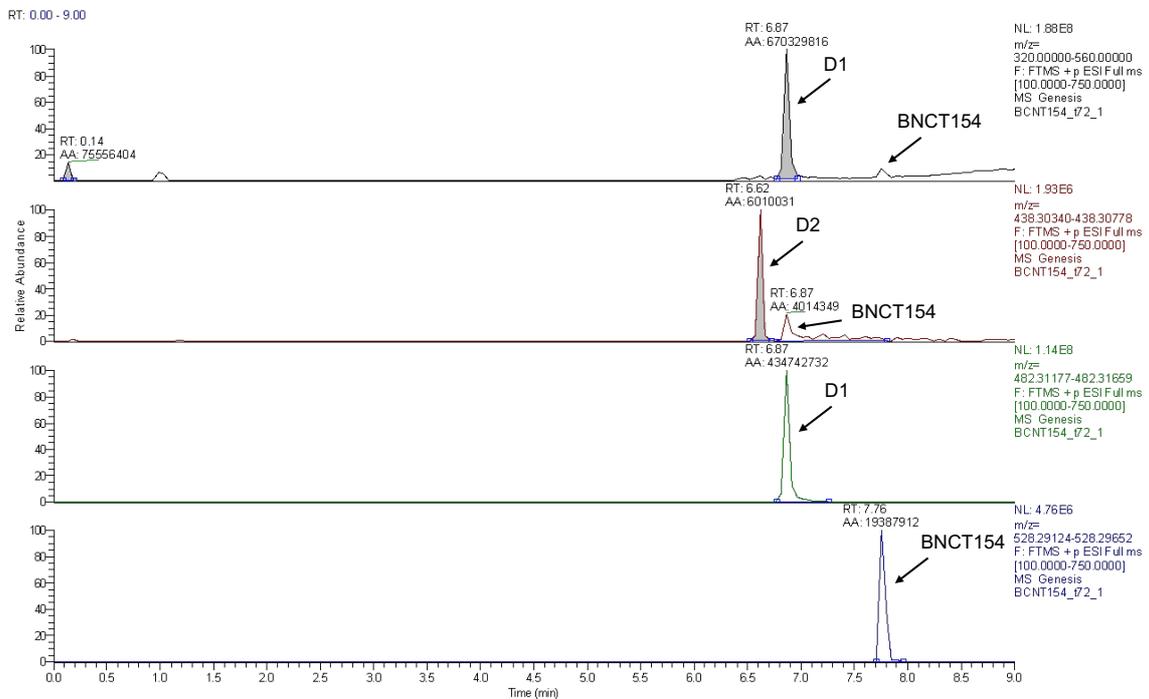


Figura 4.14 Spettro di massa del prodotto di degradazione D2

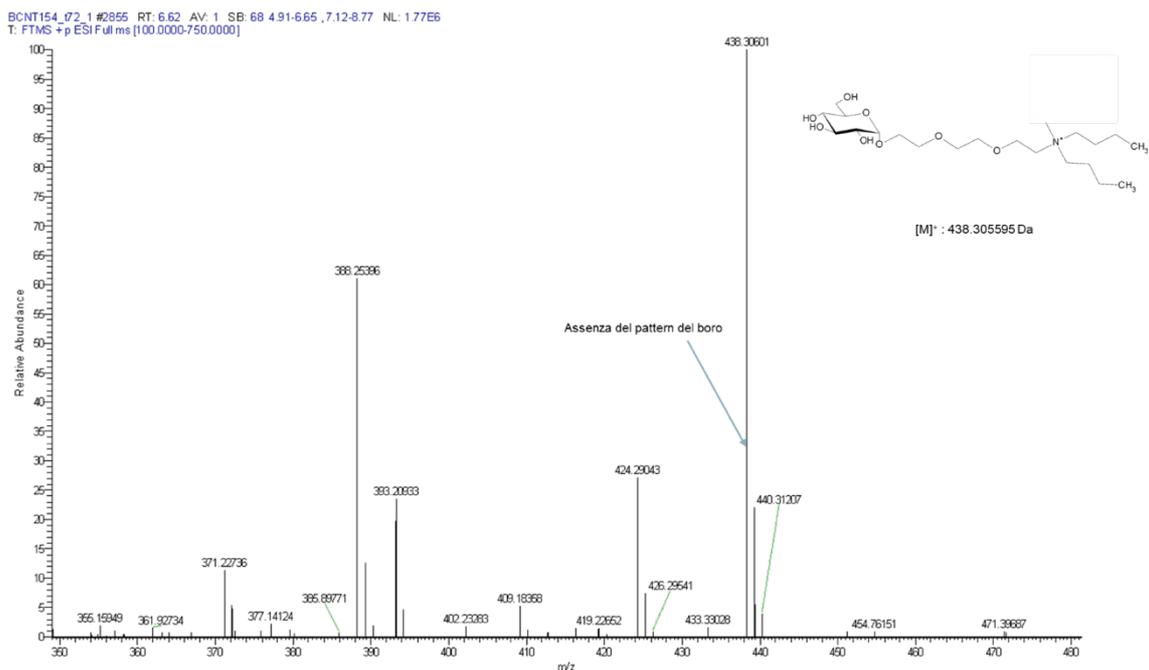
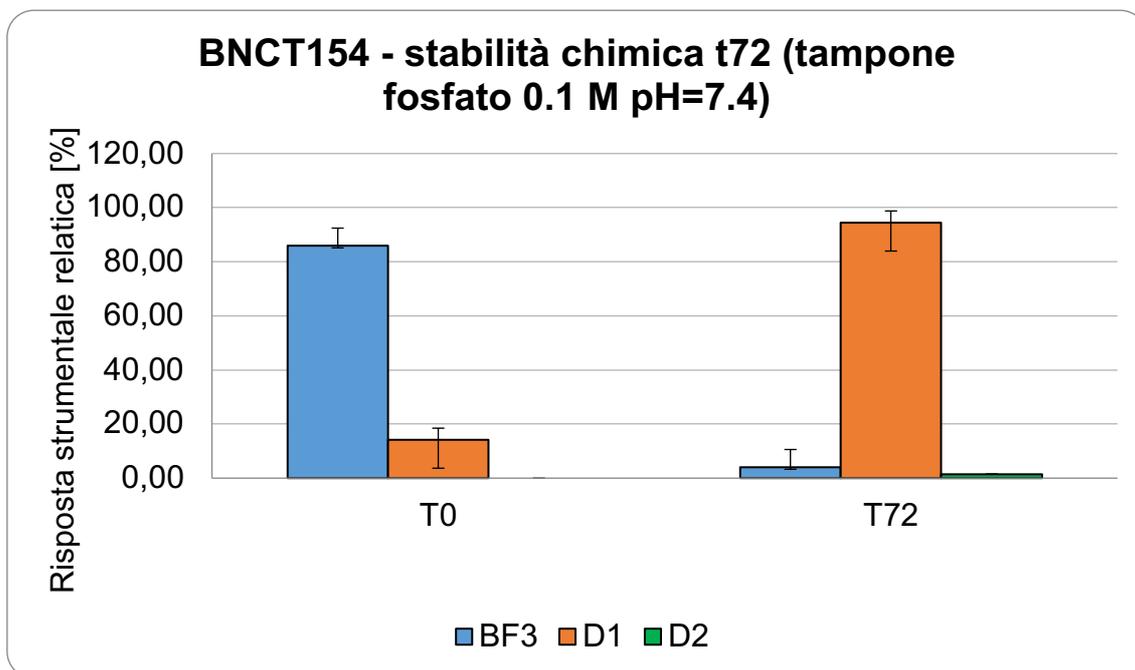


Figura 4.15 Istogramma stabilità chimica 72 h di BNCT154 in tampone fosfato pH = 7.4 in acqua deuterata



4.5 Studio di metabolismo

In letteratura non sono riportati dati di metabolismo relativi a strutture contenenti il gruppo $-BF_3^-$. Pertanto, si è condotto uno studio di metabolismo utilizzando microsomi di topo (MLM), in modo tale da simularne la fase I. Lo studio

metabolico ha preso in considerazione le sonde boronate BNCT153, BNCT154, CG6.20, CG10.28 e AMF28.

Il boro fa parte del terzo gruppo degli elementi della tavola periodica per cui presenta tre elettroni di valenza e di conseguenza può formare solo tre legami, non raggiungendo l'ottetto completo, ma riuscendo comunque a formare strutture stabili. All'interno della struttura delle sonde boronate in studio, però, il boro essendo carico negativamente acquisisce un elettrone diventando un anione con quattro elettroni di valenza, che può utilizzare per legarsi con altri atomi (sp^3).

I cromatogrammi in Full-MS (+) con scan range [100.00-750.00 m/z] dei controlli B0 e dei campioni P sono stati confrontati per valutare la formazione di eventuali metaboliti. Tale confronto è stato fatto perché nei campioni P, a differenza dei B0 che contengono le sonde boronate tal quali, sono presenti sia MLM sia il sistema rigenerante il NADPH simulanti il metabolismo di fase I.

Figura 4.16 Confronto cromatogrammi relativi allo studio di metabolismo di BNCT153

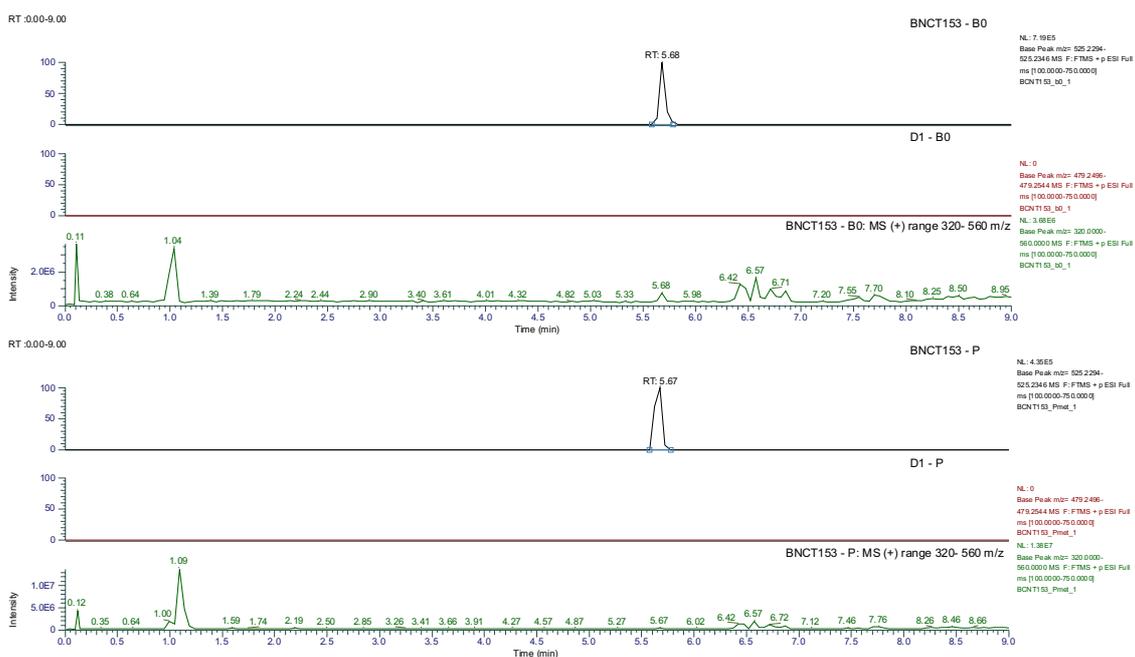


Figura 4.17 Confronto cromatogrammi relativi allo studio di metabolismo di BNCT154

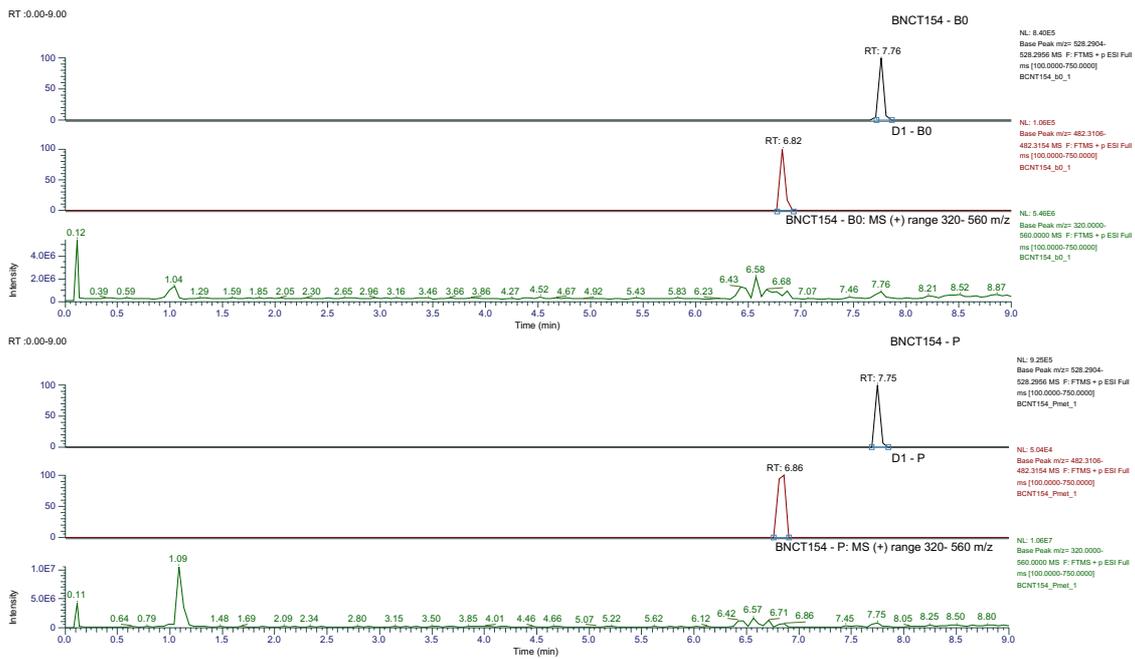


Figura 4.18 Confronto cromatogrammi relativi allo studio di metabolismo di CG6.20

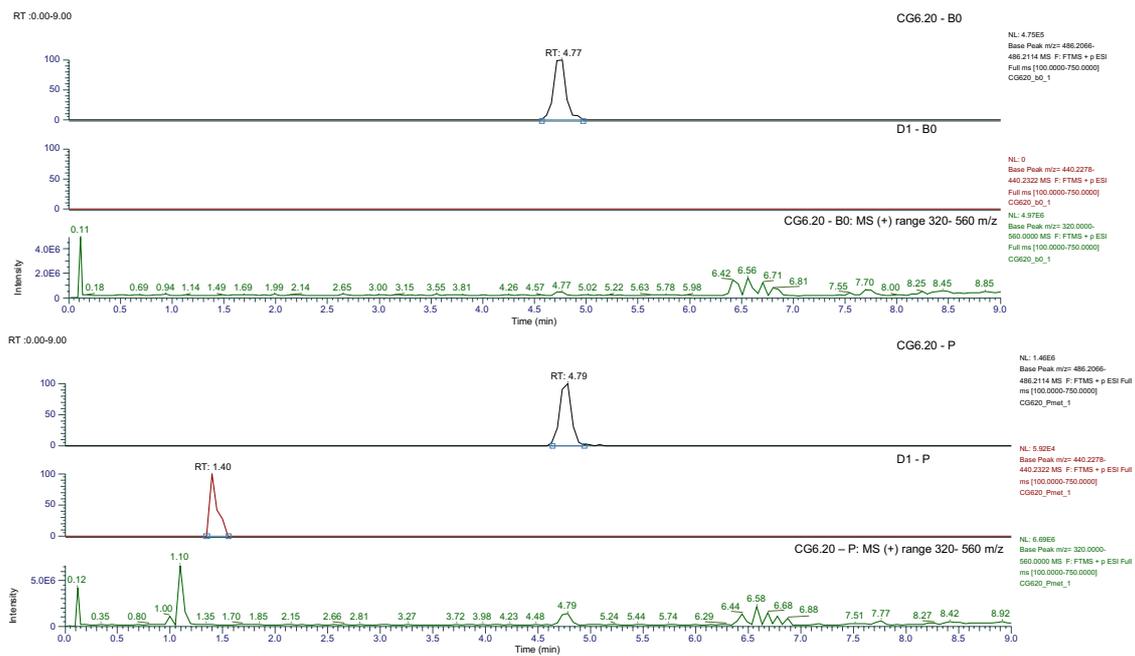


Figura 4.19 Confronto cromatogrammi relativi allo studio di metabolismo di CG10.28

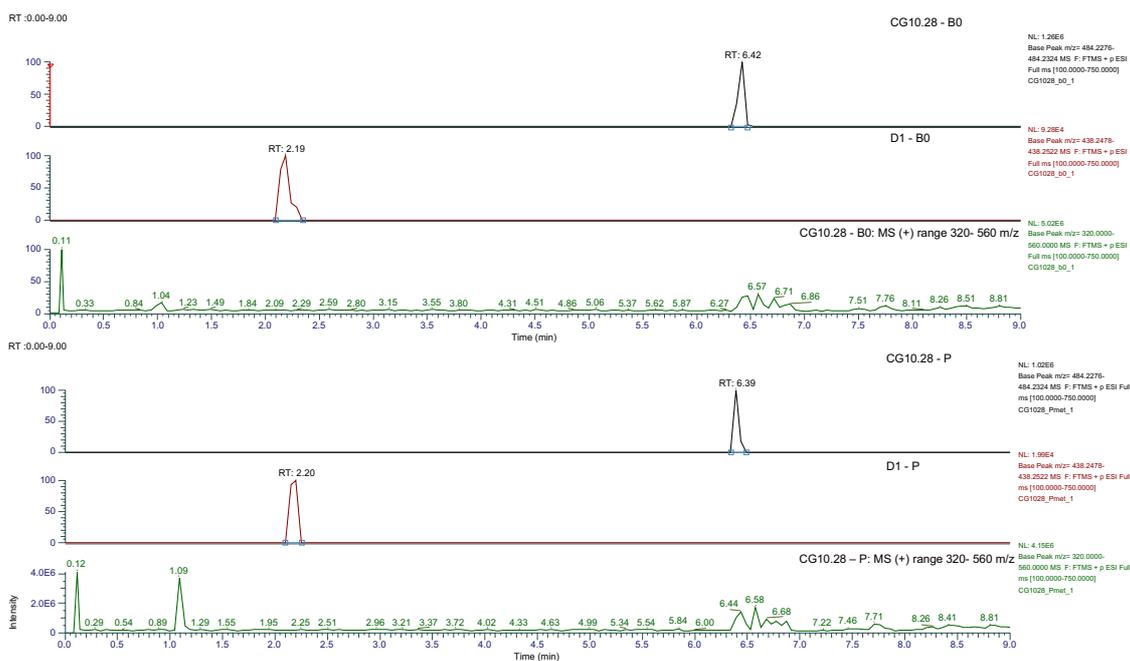
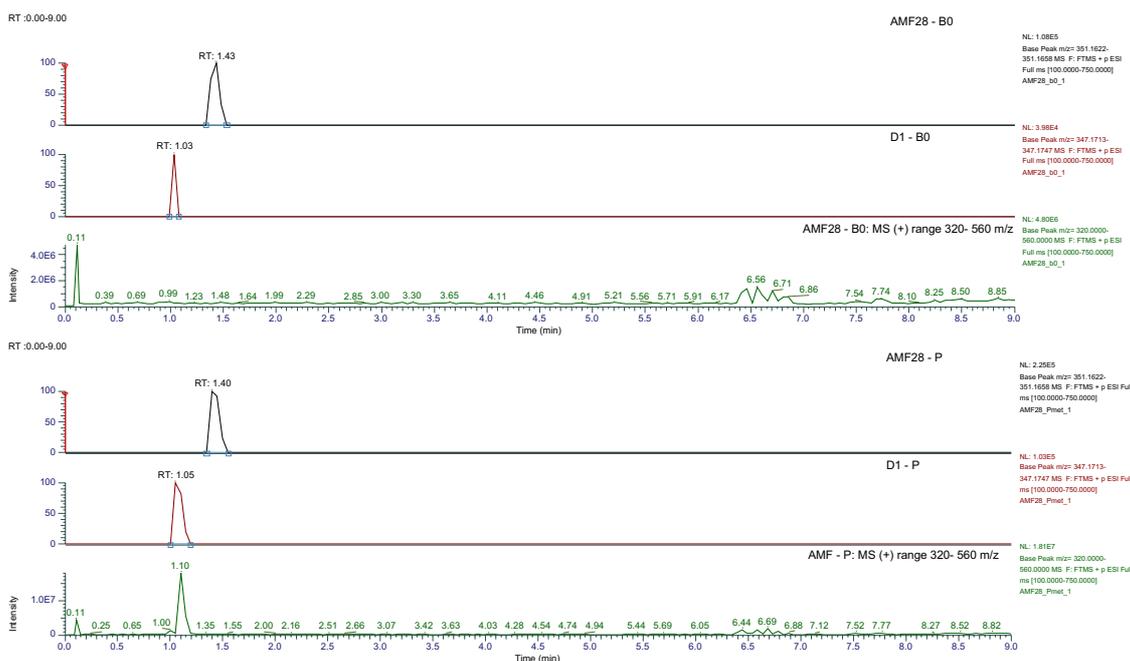


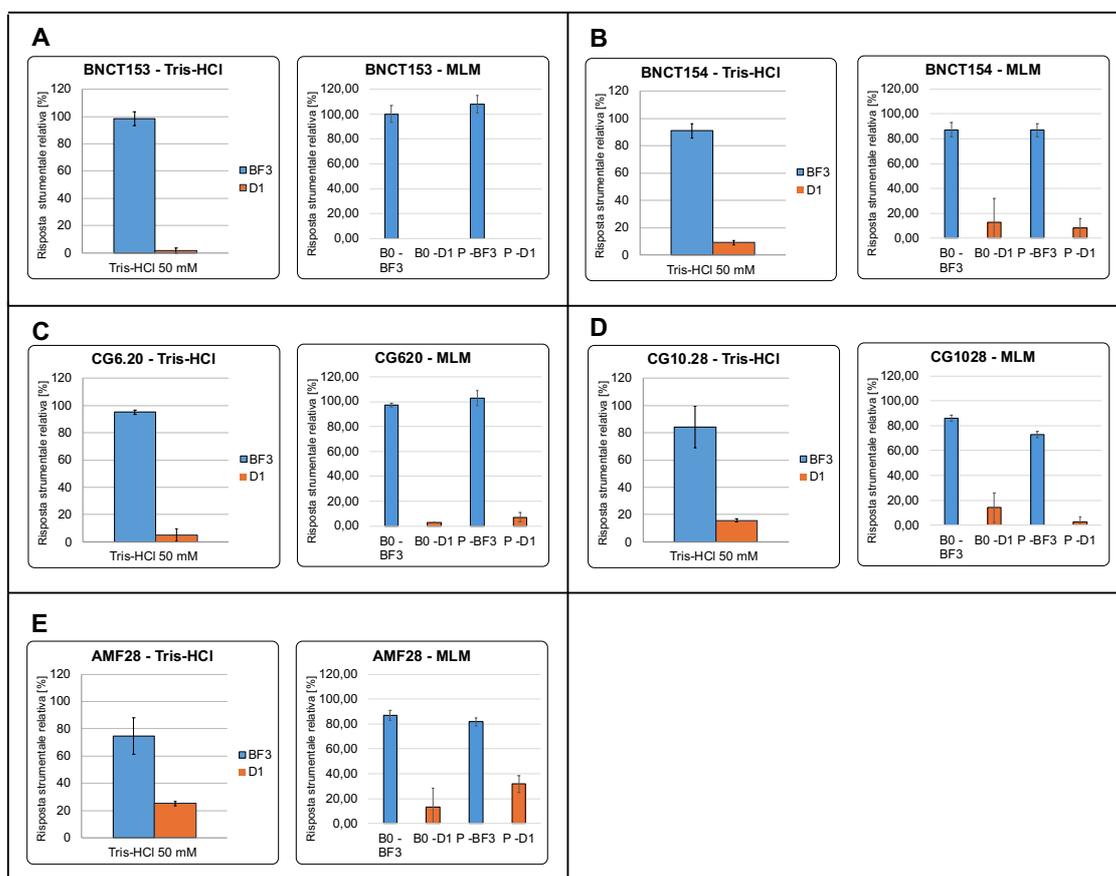
Figura 4.20 Confronto cromatogrammi relativi allo studio di metabolismo di AMF28



Come si evince dai cromatogrammi riportati (Figure 4.16-4.20) il confronto tra i controlli B0 e i campioni P non ha evidenziato alcuno ione, e quindi picco cromatografico, riconducibile a possibili metaboliti, ma solamente la formazione del prodotto di degradazione principale caratteristico di ciascuna sonda boronata, descritto nello studio di stabilità chimica.

Durante la fase di valutazione dei dati ottenuti dallo studio di metabolismo, si è cercato di sfruttare il software *Compound Discoverer v.3.3.0.550*, come ausilio nella ricerca di possibili metaboliti. Tuttavia, durante la procedura di inserimento, nella sezione dedicata del software, delle strutture delle sonde boronate in studio si è riscontrata una problematica, in quanto il software non permette l'inserimento dell'atomo di boro carico negativamente. Per tale ragione, non è stato possibile usufruire di *Compound Discoverer* per l'identificazione di possibili metaboliti, ma si è svolta una valutazione manuale dei dati di massa.

Figura 4.21 Istogrammi rappresentativi della stabilità in Tris-HCl vs stabilità metabolica delle sonde boronate. A: BNCT153, B: BNCT154, C: CG6.20, D: CG10.28, E: AMF28. Le barre dell'errore riportate corrispondono all'RSD (Relative Standard Deviation).



Come ulteriore valutazione della stabilità metabolica delle sonde boronate si sono confrontati gli istogrammi ottenuti dallo studio di stabilità chimica in buffer Tris-HCl 50 mM pH = 7.4 con gli istogrammi rappresentativi dello studio di stabilità metabolica (Figura 4.21). Dal confronto si può affermare che l'aumento

dell'intensità relativa all'area dei possibili metaboliti (identificati degli istogrammi relativi allo studio di metabolismo dalla sigla P-D1) in realtà è confrontabile con l'intensità dell'area relativa ai prodotti di degradazione formati in seguito ad un'ora di incubazione in buffer Tris-HCl 50 mM pH = 7.4. Di conseguenza, si può affermare anche in questo caso che i prodotti che vengono rilevati, in realtà, sono il risultato della reazione di idrolisi che avviene spontaneamente nel tempo, come già precedentemente discusso.

In conclusione, si può affermare che tutte le sonde boronate analizzate presentano un'elevata stabilità metabolica. Questa evidenza può essere spiegata dal fatto che la macro-famiglia del CYP450 ha un'azione ad ampio spettro e aspecifica, volta ad aumentare l'idrofilia per favorire l'eliminazione di xenobiotici o altri prodotti endogeni tossici e lipofili. Tuttavia, le sonde boronate, contenendo degli zuccheri nella loro struttura sono altamente idrofile e pertanto, non risultano quindi essere dei buoni substrati per il CYP450. Al contrario, si comportano praticamente come metaboliti di fase II già coniugati, risultando così più inclini all'eliminazione renale, come dimostrato dalla letteratura.⁴

4.6 Saggio MTT della sonda boronata AMF28 sulle linee cellulari A375 e U87

Il saggio del 3-(bromuro di 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) è stato eseguito sul composto AMF28 al fine di valutarne la citotossicità cellulare su due linee cellulare differenti, le U87 (cellule di glioblastoma) e le A375 (cellule di melanoma) e utilizzando i terreni EMEM e DMEM, rispettivamente secondo quanto riportato nella sezione 3.9 di Materiali e metodi.

Alle diverse tempistiche, si è valutata la vitalità cellulare a diverse concentrazioni (0,1-300 μ M) mediante il saggio MTT.

Figura 4.22 Vitalità cellulare A375

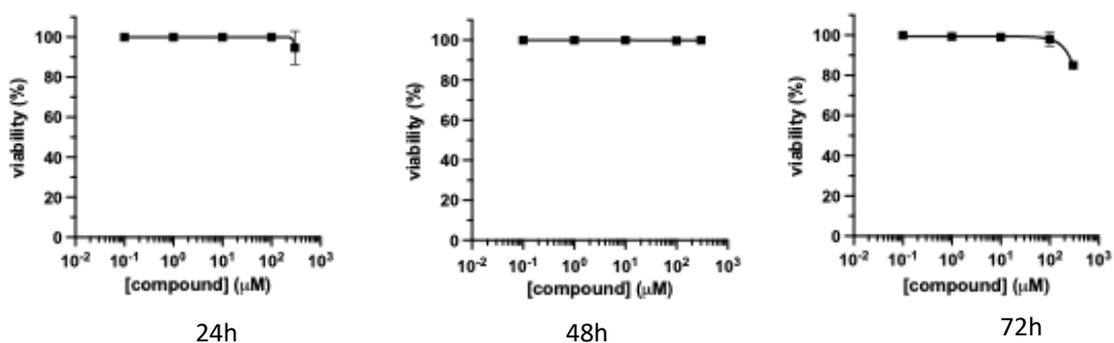
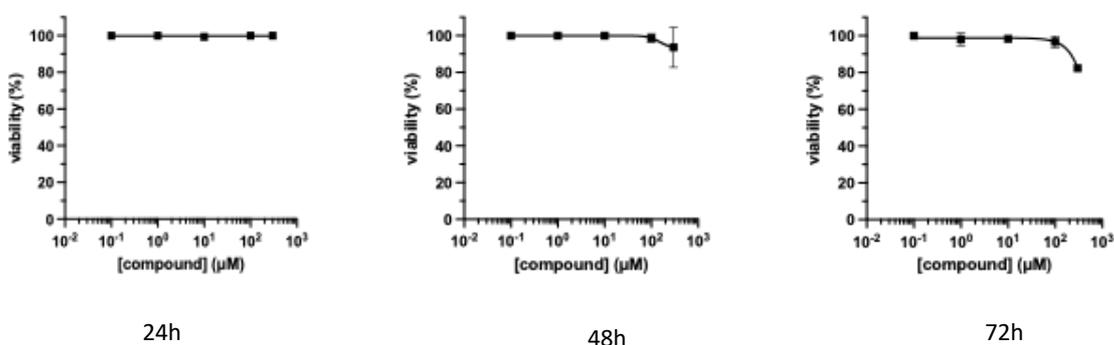


Figura 4.23 Vitalità cellulare U87



Dai risultati ottenuti dal saggio MTT, evidenziati nelle Figure 4.22 e 4.23 e grazie ai controlli negativi per la valutazione della tossicità cellulare del DMSO, si può affermare che la sonda boronata AMF28 non è tossica per le linee cellulari A375 e U87 fino alla concentrazione di 300 μM.

CAPITOLO 5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro di tesi valuta la stabilità chimica, plasmatica e metabolica che insieme ai dati di citotossicità rappresentano degli aspetti fondamentali per lo sviluppo e ottimizzazione di potenziali agenti per la BNCT.

Gli studi di stabilità condotti forniscono maggiori informazioni rispetto a quanto riportato in letteratura sulle sonde BNCT153, BNCT154, CG6.20 e CG10.28, nonché dati inediti per il composto AMF28, non ancora pubblicato.

Gli studi di stabilità chimica hanno dimostrato che la cinetica di degradazione è influenzata dal pH; infatti, la condizione acida risulta promuovere più velocemente l'idrolisi del gruppo trifluoroborato a derivato boronico. È interessante notare che le sonde BNCT153 e AMF28 contenenti il triazolo nel linker sono quelle maggiormente stabili in tutte le condizioni testate. Inoltre, la presenza del triazolo influenza anche il comportamento in massa, prevenendo la defluorinazione che si osserva durante l'analisi in ESI(+). D'altra parte, i composti BNCT154, CG6.20, CG10.28 sono meno stabili soprattutto in ambiente acido dove si riscontra la maggior formazione dell'acido boronico. In sintesi, i risultati ottenuti confermano l'elevata stabilità chimica di BNCT153 rispetto alle altre sonde boronate, confermando quanto riportato in letteratura. Inoltre, si conferma anche la minore stabilità del composto CG10.28 e che la sonda CG6.20 è più stabile del composto BNCT154 in condizioni acide.

Lo studio di stabilità plasmatica ha messo in evidenza che l'idrolisi delle sonde boronate riscontrata in questo ambiente è comparabile a quella che si riscontra nelle condizioni pseudofisiologiche della stabilità chimica (buffer Tris-HCl pH 7.4 e soluzione fisiologica). Pertanto, possiamo concludere che l'idrolisi, che porta alla formazione del corrispondente acido boronico, non è significativamente influenzata dalla composizione del plasma, ma principalmente dall'ambiente acquoso, evidenziando la stabilità delle sonde boronate nel plasma murino.

Inoltre, l'esperimento ortogonale tramite ^1H NMR e LC-MS conferma la struttura dei derivati boronici, supportato da evidenze di idrolisi e scambio isotopico H-D. L'analisi LC-MS rivela la presenza di derivati boronici deuterati, mentre l'analisi ^1H NMR conferma la presenza del composto BNCT154 e del derivato boronico (D1). Tuttavia, le analisi LC-MS hanno evidenziato che dopo 72 ore in condizioni

pseudofisiologiche si forma anche un altro prodotto di degradazione, ovvero il corrispettivo composto deboronato (D2), il quale essendo presente sotto la soglia del 5% non è rilevabile tramite NMR. Questo dimostra quanto sia utile ai fini della ricerca farmaceutica l'adozione di tecniche analitiche ortogonali.

Lo studio *in vitro* di metabolismo di fase I eseguito utilizzando microsomi di topo (MLM), ha dimostrato la notevole stabilità metabolica delle sonde boronate in analisi; infatti, non sono stati identificati possibili metaboliti eccezion fatta per i corrispettivi acidi boronici. Tuttavia, la loro formazione è paragonabile con i dati osservati durante lo studio di stabilità chimica in Tris-HCl, quindi si possono attribuire all'idrolisi spontanea che avviene nel tempo. L'elevata stabilità metabolica può essere spiegata considerando che le sonde boronate gluco-derivate essendo altamente idrofile, non sono substrati ideali per il CYP450; infatti, agiscono più come metaboliti di fase II già coniugati, risultando quindi maggiormente inclini all'eliminazione renale.

Infine, il saggio MTT condotto sul composto AMF28, è in linea ai dati di citotossicità riportati in letteratura per le altre sonde boronate. Il saggio MTT svolto sul composto AMF28 ha dimostrato che fino alla concentrazione di 300 μM , la sonda non è citotossica per le cellule appartenenti a due linee cellulari A375 (cellule di melanoma) e U87 (cellule di glioblastoma).

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha dimostrato quanto sia importante valutare la stabilità chimica, metabolica e plasmatica di potenziali agenti per la BNCT fornendo informazioni utili sul loro comportamento in ambiente acquoso, essendo la loro idrolisi pH-dipendente. I dati di stabilità e citotossicità avranno un riscontro utile nelle successive fasi del *drug discovery* e test *in vivo*. In questo modo sarà possibile continuare la linea di ricerca al fine di ottimizzare lo sviluppo di candidati promettenti per la BNCT.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Imperio, D.; Muz, B.; Azab, A. K.; Fallarini, S.; Lombardi, G.; Panza, L. A Short and Convenient Synthesis of *Closo*-Dodecaborate Sugar Conjugates. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 2019 (43), 7228–7232. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901412>.
- (2) Mushtaq, S.; Ae, P. J.; Kim, J. Y.; Lee, K. C.; Kim, K. I. The Role of Radiolabeling in BNCT Tracers for Enhanced Dosimetry and Treatment Planning. *Theranostics* **2023**, 13 (15), 5247–5265. <https://doi.org/10.7150/thno.88998>.
- (3) Valliant, J. F.; Guenther, K. J.; King, A. S.; Morel, P.; Schaffer, P.; Sogbein, O. O.; Stephenson, K. A. The Medicinal Chemistry of Carboranes. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232 (1–2), 173–230. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00087-5).
- (4) Confalonieri, L.; Imperio, D.; Erhard, A.; Fallarini, S.; Compostella, F.; Del Grosso, E.; Balcerzyk, M.; Panza, L. Organotrifluoroborate Sugar Conjugates for a Guided Boron Neutron Capture Therapy: From Synthesis to Positron Emission Tomography. *ACS Omega* **2022**, 7 (51), 48340–48348. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06551>.
- (5) Luderer, M. J.; De La Puente, P.; Azab, A. K. Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm. Res.* **2015**, 32 (9), 2824–2836. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1718-y>.
- (6) Jin, W. H.; Seldon, C.; Butkus, M.; Sauerwein, W.; Giap, H. B. A Review of Boron Neutron Capture Therapy: Its History and Current Challenges. *Int. J. Part. Ther.* **2022**, 9 (1), 71–82. <https://doi.org/10.14338/IJPT-22-00002.1>.
- (7) Moss, R. L. Critical Review, with an Optimistic Outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl. Radiat. Isot.* **2014**, 88, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2013.11.109>.
- (8) EORTC BNCT Study Group; Sauerwein, W.; Moss, R.; Rassow, J.; Stecher-Rasmussen, F.; Hideghéty, K.; Wolbers, J. G.; Sack, H. Organisation and Management of the First Clinical Trial of BNCT in Europe (EORTC Protocol 11961). *Strahlenther. Onkol.* **1999**, 175 (S2), 108–111. <https://doi.org/10.1007/BF03038906>.
- (9) Issa, F.; Ioppolo, J. A.; Rendina, L. M. Boron and Gadolinium Neutron

Capture Therapy. In *Comprehensive Inorganic Chemistry II*; Elsevier, 2013; pp 877–900. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097774-4.00335-1>.

(10) Barth, R. F.; H Vicente, Mg.; Harling, O. K.; Kiger, W.; Riley, K. J.; Binns, P. J.; Wagner, F. M.; Suzuki, M.; Aihara, T.; Kato, I.; Kawabata, S. Current Status of Boron Neutron Capture Therapy of High Grade Gliomas and Recurrent Head and Neck Cancer. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7* (1), 146. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-146>.

(11) Planas, J.; Teixidor, F.; Viñas, C. N,O-Type Carborane-Based Materials. *Crystals* **2016**, *6* (5), 50. <https://doi.org/10.3390/cryst6050050>.

(12) Issa, F.; Kassiou, M.; Rendina, L. M. Boron in Drug Discovery: Carboranes as Unique Pharmacophores in Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5701–5722. <https://doi.org/10.1021/cr2000866>.

(13) Orlova, A. V.; Kononov, L. O.; Kimel, B. G.; Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. Conjugates of Polyhedral Boron Compounds with Carbohydrates. 4. Hydrolytic Stability of Carborane–Lactose Conjugates Depends on the Structure of a Spacer between the Carborane Cage and Sugar Moiety. *Appl. Organomet. Chem.* **2006**, *20* (6), 416–420. <https://doi.org/10.1002/aoc.1082>.

(14) Giovenzana, G. B.; Lay, L.; Monti, D.; Palmisano, G.; Panza, L. Synthesis of Carboranyl Derivatives of Alkynyl Glycosides as Potential BNCT Agents. *Tetrahedron* **1999**, *55* (49), 14123–14136. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00878-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00878-9).

(15) Molander, G. A.; Ellis, N. Organotrifluoroborates: Protected Boronic Acids That Expand the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (4), 275–286. <https://doi.org/10.1021/ar050199q>.

(16) Vedejs, E.; Chapman, R. W.; Fields, S. C.; Lin, S.; Schrimpf, M. R. Conversion of Arylboronic Acids into Potassium Aryltrifluoroborates: Convenient Precursors of Arylboron Difluoride Lewis Acids. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (10), 3020–3027. <https://doi.org/10.1021/jo00115a016>.

(17) Liu, Z.; Chao, D.; Li, Y.; Ting, R.; Oh, J.; Perrin, D. M. From Minutes to Years: Predicting Organotrifluoroborate Solvolysis Rates. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (10), 3924–3928. <https://doi.org/10.1002/chem.201405829>.

(18) Mi, P.; Yanagie, H.; Dewi, N.; Yen, H.-C.; Liu, X.; Suzuki, M.; Sakurai, Y.; Ono, K.; Takahashi, H.; Cabral, H.; Kataoka, K.; Nishiyama, N. Block Copolymer-

Boron Cluster Conjugate for Effective Boron Neutron Capture Therapy of Solid Tumors. *J. Controlled Release* **2017**, *254*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.036>.

(19) Li, Z.; Chen, J.; Kong, Z.; Shi, Y.; Xu, M.; Mu, B.-S.; Li, N.; Ma, W.; Yang, Z.; Wang, Y.; Liu, Z. A Bis-Boron Boramino Acid PET Tracer for Brain Tumor Diagnosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2024**. <https://doi.org/10.1007/s00259-024-06600-5>.

(20) Zhou, L.; Long, R.; Hu, M.; Liu, N.; Feng, Y.; Qiu, L.; Li, Z.; Chen, Y.; Wang, L. Synthesis and Evaluation of ¹⁸F-Labeled Boramino Acids as Potential New Positron Emission Tomography Agents for Cancer Management. *Mol. Pharm.* **2022**, *19* (7), 2191–2202. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00036>.

(21) Valko, K.; Reynolds, D. P. High-Throughput Physicochemical and In Vitro ADMET Screening: A Role in Pharmaceutical Profiling. *Am. J. Drug Deliv.* **2005**, *3* (2), 83–100. <https://doi.org/10.2165/00137696-200503020-00002>.

(22) Baranczewski, P.; Stańczak, A.; Sundberg, K.; Svensson, R.; Wallin, A.; Jansson, J.; Garberg, P.; Postlind, H. Introduction to in Vitro Estimation of Metabolic Stability and Drug Interactions of New Chemical Entities in Drug Discovery and Development. *Pharmacol. Rep. PR* **2006**, *58* (4), 453–472.

(23) Jocelyn Paré, J. R.; Yaylayan, V. Chapter 7 Mass Spectrometry: Principles and Applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier, 1997; Vol. 18, pp 239–266. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80016-9).

(24) Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Kuuranne, T.; Auriola, S. Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization–Mass Spectrometry in Drug Metabolism Studies. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38* (4), 357–372. <https://doi.org/10.1002/jms.481>.

(25) Locatelli, M.; Governatori, L.; Carlucci, G.; Genovese, S.; Mollica, A.; Epifano, F. Recent Application of Analytical Methods to Phase I and Phase II Drugs Development: A Review. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26* (3), 283–300. <https://doi.org/10.1002/bmc.1674>.

(26) He, F.; Zeng, F.; Situ, X.; He, R.; Zheng, W.; Chen, Y.; Ou, D.; Chen, Y. Detection and Identification of Imperatorin Metabolites in Rat, Dog, Monkey, and Human Liver Microsomes by Ultra-high-performance Liquid Chromatography

Combined with High-resolution Mass Spectrometry and Compound Discoverer Software. *Biomed. Chromatogr.* **2023**, *37* (10), e5702. <https://doi.org/10.1002/bmc.5702>.

(27) Svantesson, E.; Capala, J.; Markides, K. E.; Pettersson, J. Determination of Boron-Containing Compounds in Urine and Blood Plasma from Boron Neutron Capture Therapy Patients. The Importance of Using Coupled Techniques. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (20), 5358–5363. <https://doi.org/10.1021/ac025798e>.

(28) Ma, S.; Zhu, M. Recent Advances in Applications of Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of Reactive Drug Metabolites. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179* (1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.014>.

(29) Sandra, P., Vanhoenacker, G., Lynen, F., Li, L., & Schelfaut, M. (2001). Considerations on Column Selection and Operating Conditions for LC–MS. LC–GC Europe: Guide to LC-MS. 2001, pp 8–21.

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine del mio percorso di studi vorrei ringraziare le persone che mi hanno sostenuta e accompagnata durante il mio percorso universitario.

Vorrei, innanzitutto, ringraziare la professoressa Erika Del Grosso, mia relatrice, per la grande disponibilità e il supporto datomi nella realizzazione di questo progetto di tesi.

Ringrazio il mio correlatore, Dott. Salvatore Villani, che dal primo giorno di ingresso in tesi mi ha guidato e insegnato tantissimo attraverso il suo esempio di dedizione e amore per la Ricerca.

Vorrei ringraziare i miei genitori e i miei fratelli, Rachele e Giacomo. Mi avete accompagnata in questo percorso stando sempre un passo indietro di me, per gioire ad ogni mio traguardo raggiunto, dandomi la forza di rialzarmi quando un esame non andava bene e mi avete aiutato a capire come le sconfitte potevano essere un insegnamento, un punto di forza per migliorarmi. Grazie per avermi reso la persona che sono, vi amo.

Un grazie speciale va a quella persona che dal primissimo giorno di questo percorso è stata al mio fianco, Sofia. Porterò sempre nel cuore le intere giornate passate insieme a studiare; io, la tua allodola, che arrivava da te alle 8 del mattino con una brioche per farti pesare meno il suono del campanello; tu, ragazza gufo, pronta a darmi la carica durante i pomeriggi di studio. Ci siamo scoperte complementari, abbiamo gioito, pianto, affrontato insieme le preoccupazioni per esami che sembravano più grandi di noi, ma insieme siamo arrivate al traguardo. Grazie per avermi sempre sostenuta nei miei momenti di difficoltà e grazie perché senza di te questo percorso non sarebbe stato lo stesso. Ti voglio un mondo di bene.

Vorrei ringraziare, una persona speciale, Marianna. Sei entrata nella mia vita da poco più di due anni, ma in te ho trovato una vera amica, una di quelle che sembra di conoscere da una vita. Sei sempre stata pronta a dirmi un consiglio, ad ascoltare i miei audio infiniti in cui ti raccontavo dei progressi durante mie giornate passate in laboratorio, del non sentirmi a volte all'altezza, ma tu hai sempre creduto in me, certa che avrei portato a termine con successo i miei obiettivi. Grazie di cuore.

Un grazie di cuore alla mia cara amica Cecilia. Grazie per esserci sempre stata, per avermi ascoltata, consigliata e so che in ogni momento potrò sempre contare su di te. Vorrei ringraziare i miei amici Giulia, Matteo e Riccardo. Grazie per i vostri incoraggiamenti, la vostra presenza e il vostro supporto costante.

Grazie al mio fidanzato, Filippo. Grazie per ascoltami sempre, per la tua pazienza nel sopportare la mia testa dura e farmi vedere sempre il lato positivo nelle difficoltà. Grazie perché ogni volta che attraversavo momenti difficili nella preparazione degli esami o durante la stesura della tesi, tu sei sempre stato pronto ad accogliermi in un tuo abbraccio per tranquillizzarmi e dirmi che eri fiero di me e che sarei riuscita a superare ogni ostacolo.

Infine, l'ultimo pensiero vorrei dedicarlo a me stessa e alla mia crescita, come studentessa e come persona durante questi anni di formazione. Questo percorso mi ha insegnato a non arrendermi al primo ostacolo e che con tenacia e dedizione si può arrivare dove si vuole. Questo è un punto di arrivo e di partenza per gli obiettivi futuri che la vita mi riserverà. Sì, ce l'hai davvero fatta, sono fiera di te!