



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Università degli studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica
Laurea Magistrale in Scienze Chimiche
Anno Accademico 2025/2026

**Sintesi di chelanti a base di Cyclam
contenenti gruppi donatori tiolici e
tiofenolici per cationi soft**

Relatore:

Prof. Lorenzo Tei

Correlatore:

Dott. Pietro Piacenza

Candidato:

Giorgia Dalmaso

20043907

Indice

Capitolo 1-Introduzione	6
1.1 Medicina nucleare	6
1.2 Imaging.....	7
1.3 Decadimento radioattivo	9
1.3.1 Cinetica del decadimento radioattivo	12
Capitolo 2-Tecniche di Imaging.....	14
2.1 CT	14
2.2 PET	15
2.3 SPECT	16
2.4 Gamma Camera.....	17
Capitolo 3-Sonda molecolare	19
Capitolo 4- Stabilità termodinamica e inerzia cinetica	21
Capitolo 5-Terapia.....	24
Capitolo 6-Teranostica	25
6.1.1 Argento 103/111.....	25
6.1.2 Complessazione Argento 103/111	26
6.2.1 Mercurio $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$	29
6.2.2 Complessazione Mercurio 197m/g	29
Capitolo 7- Chelator Design.....	33
Capitolo 8-Obiettivo Tesi	39
Capitolo 9- Materiali e Metodi.....	41
Capitolo 10- Parte sperimentale	42
10.1 Sintesi leganti TEm ₂ SP e CB-TE ₂ SP	42
10.1.1 Sintesi 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide	42

10.1.2 Sintesi di TEme ₂ SP protetto	43
10.1.3 Deprotezione	45
10.2.1 Sintesi di CB-TE ₂ SP protetto	46
9.2.2 Deprotezione	47
10.3 Sintesi leganti TEme ₂ S e CB-TE ₂ S.....	49
10.3.1 Sintesi del Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro)	49
10.3.2 Sintesi di TEme ₂ S protetto	50
10.3.3 Sintesi del 2-{[(4-metossifenil)(difenil)metil]sulfanil}etanolo	51
10.3.4 Sintesi del legante CB-TE ₂ S protetto	53
10.3.5 Deprotezione	54
10.3.6 Sintesi del legante TEme ₂ S protetto	55
Capitolo 11-Complessazione	57
11.1- Complessazione leganti TEme ₂ SP e CB-TE ₂ SP	57
11.1.1 Complessazione legante TEme ₂ SP con Mercurio (II).....	57
11.1.2 Complessazione legante CB-TE ₂ SP con Mercurio (II).....	59
Capitolo 12-Risultati e discussione	62
12.1 Sintesi leganti TEme ₂ SP e CB-TE ₂ SP	62
12.1.1 Sintesi 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide	62
12.1.2 Sintesi TEme ₂ SP protetto	63
12.1.3 Deprotezione del TEme ₂ SP	64
12.1 Sintesi legante CB-TE ₂ S.....	65
12.2.1 Sintesi del 2-{[(4-metossifenil)(difenil)metil]sulfanil}etanolo	65
12.2.2 Sintesi del metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio) etile...	65
12.2.3 Sintesi del legante CB-TE ₂ S-protetto.....	66
12.2.4 Deprotezione del CB-TE ₂ S	66
Capitolo 13-Metodi HPLC-MS	68
13.1.1 Metodo TEme ₂ SP protetto	68
13.1.2 Metodo TEme ₂ SP deprotezione	68

13.2.1 Metodo CB-TE2SP protetto	69
13.4.2 Metodo Complessazione CB-TE2SP con Mercurio (II).....	73
Capitolo 14–Conclusioni.....	74
Capitolo 15-Bibliografia	75

Capitolo 1-Introduzione

1.1 Medicina nucleare

La **medicina nucleare** è il settore della medicina utilizzato per la diagnosi e la terapia di malattie tramite l'uso di radionuclidi incorporati in molecole organiche. Il legame può essere di coordinazione (radiocomplessi) o tramite legame diretto Carbonio – radionuclide, come nel caso di agenti diagnostici a base di ^{18}F . In entrambi i casi l'isotopo radioattivo deve essere incorporato in una molecola progettata appositamente per il riconoscimento di marker tumorali over-espressi nelle cellule tumorali scelte come bersaglio. Di conseguenza, grazie alla localizzazione selettiva nelle zone interessate dalla patologia, è possibile colpire e trattare selettivamente il tumore, andando a ridurre eventuali danni off-target aspecifici.¹ Queste molecole sono chiamate radiofarmaci o “sonde” e consentono di analizzare, tramite decadimento radioattivo, sia la struttura che la funzionalità di organi o tessuti riuscendo anche a risalire alla causa della patologia in modo non invasivo. Le anomalie che vengono riscontrate, sono date da una variazione della quantità locale del radiofarmaco, che può essere superiore o inferiore rispetto a quella rilevata nei tessuti o organi sani. A scopo terapeutico possono essere sfruttate varie particelle che mostrano un'importante attività citotossica.^{2,3}

- le particelle α caratterizzate da un'elevata energia (3-7 MeV) ed una ridotta capacità penetrativa (40-100 μm);
- le particelle β^- a minor energia (500-2300 keV) e a penetrazione superiore (1-12 mm);⁴
- elettroni Auger sono caratterizzate da un'energia estremamente bassa (< 1 keV) e possono penetrare nei tessuti biologici per meno di 30 μm , con un LET di circa 1–23 keV/ μm ;⁵

Invece, per l'imaging diagnostico si possono sfruttare emissioni dovute a diversi tipi di decadimento:

- positroni (particelle β^+) che sono le antiparticelle degli elettroni che, a seguito di annichilazione, producono due raggi γ con energia di 511 keV che vengono emessi a 180° e sono sfruttabili in tecniche come la tomografia ad emissione di positroni (PET);
- Raggi γ che sono radiazioni elettromagnetiche con energia compresa tra 10 keV e 40 keV, con elevata capacità penetrativa e sono sfruttati nella Tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT).

1.2 Imaging

Le tecniche diagnostiche di imaging permettono di osservare i tessuti interni e fornire informazioni morfologiche e/o funzionali in tempo reale, per l'individuazione precoce ed il monitoraggio di patologie.^{6,7} Consentono quindi l'individuazione di processi biologici attraverso l'utilizzo di radiofarmaci o sonde, che si concentreranno nell'organo di interesse o si comporteranno come tracciante di una funzione biologica. La distribuzione nell'organismo del radiofarmaco dipende dalla costituzione chimico-fisica dello stesso, dalla via di somministrazione, dalla capacità di attraversare barriere biologiche e di essere trasportato dai carrier e dalle condizioni metaboliche del paziente. Esempi di tecniche di medicina nucleare di nostro interesse più comuni sono la PET e la SPECT. Per queste, l'utilizzo di radiofarmaci è indispensabile per l'applicazione della tecnica stessa e la generazione delle immagini, in quanto non sarebbero applicabili senza la fonte radioattiva.

Sono presenti altre tecniche di imaging non appartenenti alla medicina nucleare come la CT e Risonanza Magnetica Nucleare. Nello specifico la CT sfrutta i raggi X per generare immagini di tessuti interni di un organismo; mentre l'MRI sfrutta l'analisi NMR dei protoni (^1H) dell'acqua contenuta nei tessuti per la produzione di immagini tridimensionali. Due parametri importanti che devono essere considerati per confrontare le varie tecniche di imaging sono: la sensibilità e la risoluzione spaziale. La sensibilità si riferisce alla quantità di radiofarmaco da utilizzare per permettere la

visualizzazione, mentre la risoluzione spaziale alla qualità delle immagini ottenute. In Fig. 1 vengono confrontati questi parametri per le varie tecniche e si può notare che le tecniche PET e SPECT possiedono un'elevata sensibilità per il radiofarmaco impiegato, cosa che permette di ridurre la dose somministrata. Inverso però è l'andamento della risoluzione spaziale di queste tecniche, in quanto PET e SPECT possiedono una risoluzione spaziale sensibilmente inferiore rispetto ad altre tecniche.^{8,9} Perciò le tecniche di medicina nucleare vengono sempre accoppiate con una tecnica ad alta risoluzione spaziale per poter individuare efficacemente la zona del corpo dove si accumula il radiofarmaco. Per esempio si usa accoppiare la CT o l'MRI con la PET così che mentre la PET fornisce informazioni funzionali o di targeting, CT o MRI forniscono la localizzazione del sito in esame.

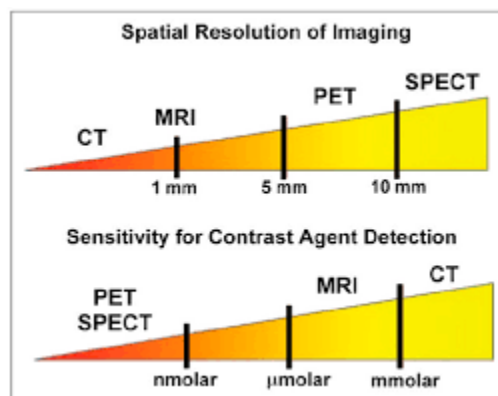


Figura 1 Andamento di risoluzione e sensibilità nelle tecniche di imaging

Nella PET e SPECT sono usati dei radiofarmaci costituiti da un isotopo radioattivo il cui decadimento è monitorabile dall'esterno del paziente tramite la rilevazione dei raggi gamma emessi direttamente o mediati da annichilazione di positroni. Mediante una reazione di bioconiugazione con vettori biologici quali peptidi o proteine si ottiene una elevata specificità del radiofarmaco verso il sito di interesse. Infatti, la coniugazione tra il radiofarmaco e la biomolecola utilizzata come vettore molecolare affine per un determinato marker patologico, ne modifica l'affinità e di conseguenza la selettività verso determinati tessuti.

Lo sviluppo di nuovi traccianti e l'individuazione di nuovi marker tumorali ha consentito un notevole sviluppo di queste tecniche e lo sviluppo di terapie mirate.

1.3 Decadimento radioattivo

Il decadimento radioattivo è un processo spontaneo che permette a nuclidi instabili di raggiungere la condizione di stabilità tramite l'emissione di radiazioni e la conseguente trasformazione del nuclide in un altro.

I diversi tipi di radiazioni sono stati individuati tramite l'esperimento di Rutherford che mostra il loro comportamento in presenza di un campo magnetico esterno:

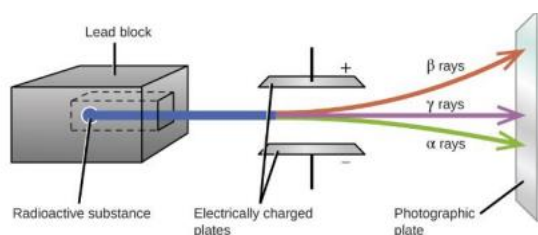


Figura 2 : Esperimento di Rutherford "LibreText Chemistry"

- **Decadimento α :** con emissione di un nucleo di ${}^4_2\text{He}$ carico positivamente (due protoni e due neutroni) dotato di alta energia e basso potere penetrante. Questo è un tipo di decadimento tipico di ioni instabili pesanti ($Z > 83$) e le particelle α generate, essendo cariche positivamente, in presenza di un campo magnetico esterno tenderanno a deviare verso il polo negativo;

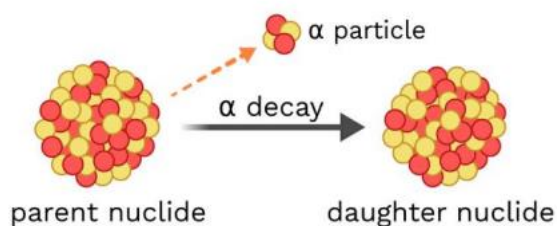


Figura 3 Decadimento Alfa "Labster Theory"

- **Decadimento β :** comprende tre differenti vie di decadimento che un nucleo può attuare per raggiungere la condizione di stabilità:
 - emissione di un antineutrino ed un elettrone ad alta energia (β^-) (che in presenza di un campo magnetico esterno tenderà a migrare in modo marcato verso il polo positivo) con conversione di un neutrone a protone.

- emissione di un positrone (β^+)(antiparticella dell'elettrone) con conversione di un protone a neutrone accompagnata dall'emissione di un neutrino;
- la cattura elettronica di un elettrone interno da parte del nucleo, con conversione di un protone a neutrone ed un conseguente cascata elettronica a riempimento della lacuna formatasi con emissione di fotoni ad alta energia.

Una volta emessi, i positroni vanno incontro ad un processo di “annichilazione” a causa dell'interazione con la sua antiparticella, l'elettrone.

Questo processo porta all'emissione di due raggi γ da 511 keV in direzioni opposte detti “back to back”.

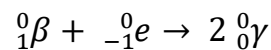
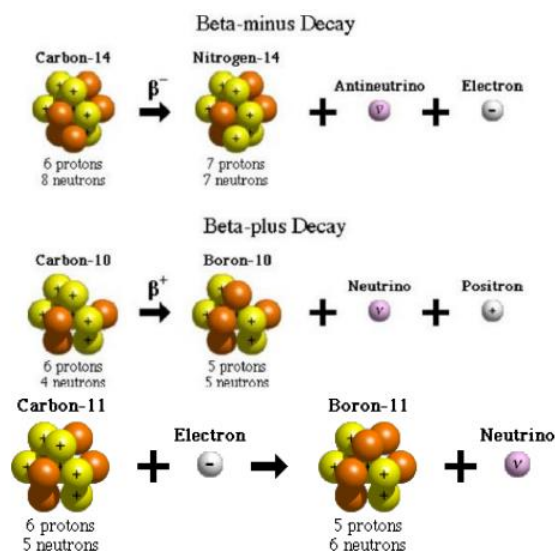


Figura 4 Decadimento Beta “JLab Science education”

- **Decadimento γ :** con emissione di fotoni ad alta energia a seguito del ritorno allo stato fondamentale di isotopi eccitati prodotti da altri tipi di decadimento. I raggi gamma, non essendo dotati di carica, non sono influenzati e deviati dalla presenza del campo magnetico esterno.

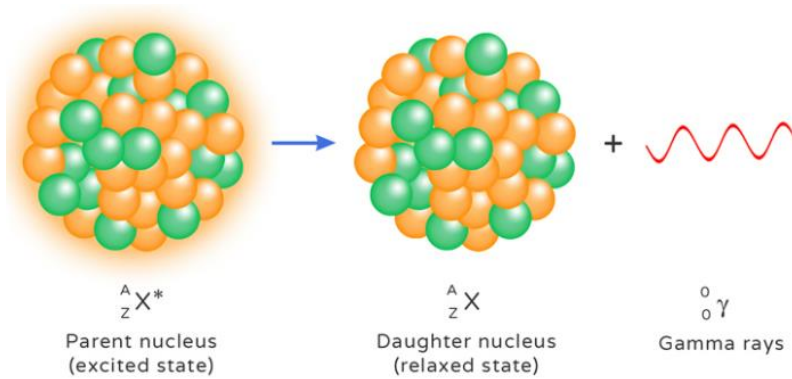


Figura 5 Decadimento Gamma

La via di decadimento usata dal nuclide per raggiungere la stabilità, è determinata da due fattori chiave:

- Il numero di neutroni (N), il numero di protoni (Z), il loro rapporto (N/Z);
- La massa totale del nuclide

Infatti per nuclidi leggeri si ha la condizione di stabilità quando $N/Z = 1$, rapporto che aumenta gradualmente all'aumentare del numero di protoni, fino al raggiungimento di $Z = 83$ (corrispondente al Bismuto) che corrisponde al nuclide stabile più pesante.

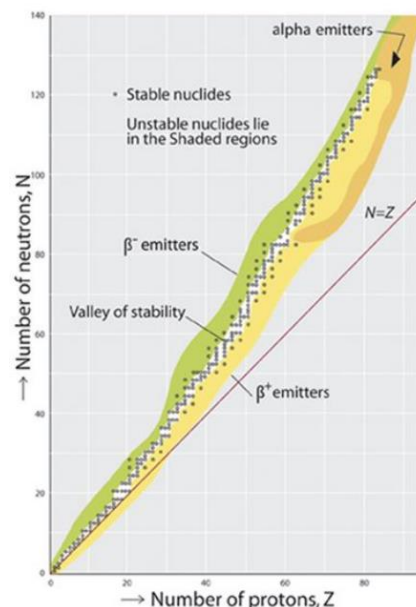


Figura 6 Tipo Decadimento in funzione del N/Z

Osservando il grafico in Fig. 6 possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- Nuclidi ricchi di protoni con un basso N/Z (sono al di sotto della fascia di

stabilità) tenderanno a seguire un decadimento β^+ con emissione di positroni o cattura elettronica (all'aumentare di Z) e conversione di un protone in neutrone per andare ad aumentare il rapporto N/Z ;

- Nuclidi ricchi di neutroni (al di sopra della fascia di stabilità) subiranno un decadimento β^- con emissione di elettroni e conversione di un neutrone a protone, in modo da abbassare il rapporto N/Z ;
- I nuclidi pesanti con $Z > 83$ sono instabili di conseguenza tenderanno a decadere tramite emissione di particelle α con conseguente diminuzione di N e di Z di due unità per emissione.

1.3.1 Cinetica del decadimento radioattivo

Ogni nucleo radioattivo decade con una velocità caratteristica indipendente dalla natura del campione in cui si trova. La velocità di decadimento o attività (A) indica la velocità con cui esso si trasforma emettendo la sua specifica radiazione.

La velocità del decadimento radioattivo (A) è proporzionale al numero di nuclei presenti:

$$A = kN$$

dove k è la costante di decadimento tipica di ogni nuclide.

Di norma le velocità di queste reazioni seguono una cinetica del primo ordine, cioè la velocità di decadimento (v) del nucleo è direttamente proporzionale alla sua concentrazione:

$$v = k[N]$$

$$v = -d[N]/dt$$

Dall'elaborazione matematica delle due formule e ponendo $[N]_t = \frac{1}{2} [N]_0$ si ottiene il tempo di dimezzamento o semivita tipico di ogni nuclide:

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

Questo valore indica il tempo necessario affinché la metà dei nuclei di un campione

radioattivo vada incontro ad un processo di decadimento con produzione dei nuclidi figli. Inoltre, il tempo di dimezzamento è un valore indipendente dal numero di nuclei ed è inversamente proporzionale alla costante di decadimento.

L'unità di misura della radioattività è il Becquerel (Bq) e corrisponde al numero di disintegrazioni nucleari per secondo, mentre il Curie (Ci) si riferisce al numero di disintegrazioni al secondo di un campione di 1 g di ^{226}Ra .

$$1\text{Ci} = 3.7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$$

Capitolo 2-Tecniche di Imaging

2.1 CT

La CT è una tecnica diagnostica non invasiva che permette di generare immagini dei tessuti interni di un organismo a scopo diagnostico. Le immagini sono ottenute tramite la rielaborazione di dati registrati durante scansioni a raggi X sull'area di interesse, in modo da ricostruire un'immagine tridimensionale. Nello specifico la tecnica sfrutta una sorgente e un rivelatore di raggi x che ruotano intorno al paziente. In questo modo il macchinario esegue una scansione a “fette” (da qui il nome Tomografia) in modo da ottenere immagini bidimensionali delle varie sezioni, analizzabili individualmente o unire le singole ottenendo un'immagine unica e tridimensionale.¹⁰

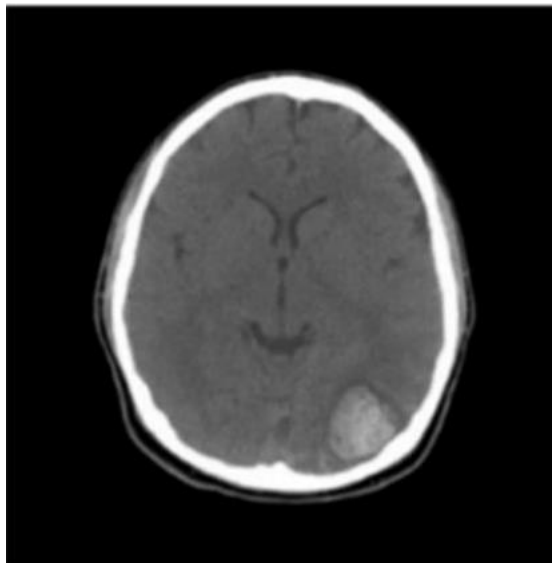


Figura 7 una recente scansione TC del cervello

La CT rappresenta un modo veloce per poter descrivere con precisione le condizioni del paziente. Tuttavia questa tecnica presenta due punti critici:

- il paziente per tutta la durata del test deve rimanere immobile, di conseguenza tutti i movimenti involontari potrebbero causare immagini sfocate;
- l'esposizione alle radiazioni ionizzanti rappresenta il principale problema di questa tecnica.

2.2 PET

La Tomografia a Emissione di Positroni o meglio conosciuta come PET è una tecnica diagnostica non invasiva usata a scopo diagnostico, che sfrutta traccianti radioattivi che emettono positroni.

Quello più usato è il ^{18}F -FDG (fluorodesossiglucosio), che si andrà ad accumulare nel tessuto di interesse tramite i canali del glucosio. Infatti, dato che questa molecola è in grado di entrare nelle cellule mediante le stesse vie utilizzate dal glucosio, si andrà ad accumulare in quei tessuti ad alto consumo energetico, come il tessuto cardiaco, quello cerebrale e i tumori.¹¹ La diagnosi è ottenuta sfruttando il decadimento “beta positivo” di un radioisotopo, (i più comuni sono ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F) con conseguente emissione di un positrone. Il positrone avendo una carica positiva, percorre qualche millimetro attraverso il tessuto fino alla sua annichilazione con un elettrone di cui è l’antiparticella, rilasciando ogni volta una coppia raggi gamma diretti a 180° uno dall’altro; che verranno poi, rilevati dallo scanner.

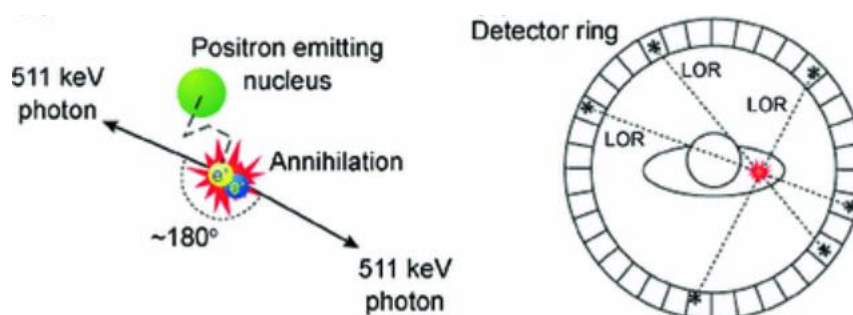


Figura 8 Annichilazione positrone

In questo modo da ogni singola annichilazione si ottiene un segmento all’interno del quale l’annichilazione, e di conseguenza l’emissione può essere avvenuta. Andando a sovrapporre i segnali ottenuti da innumerevoli decadimenti ed annichilazioni si può ricostruire un’immagine rappresentante la zona corporea nella quale si è accumulato il radiofarmaco. La bassa risoluzione di questa tecnica è dovuta proprio alla penetrazione dei tessuti dei positroni. Più questi sono energetici, più sono in grado di penetrare prima di subire l’annichilazione, più si allontaneranno dalla zona di emissione e di conseguenza si avrà un intrinseco abbassamento della risoluzione spaziale.¹²

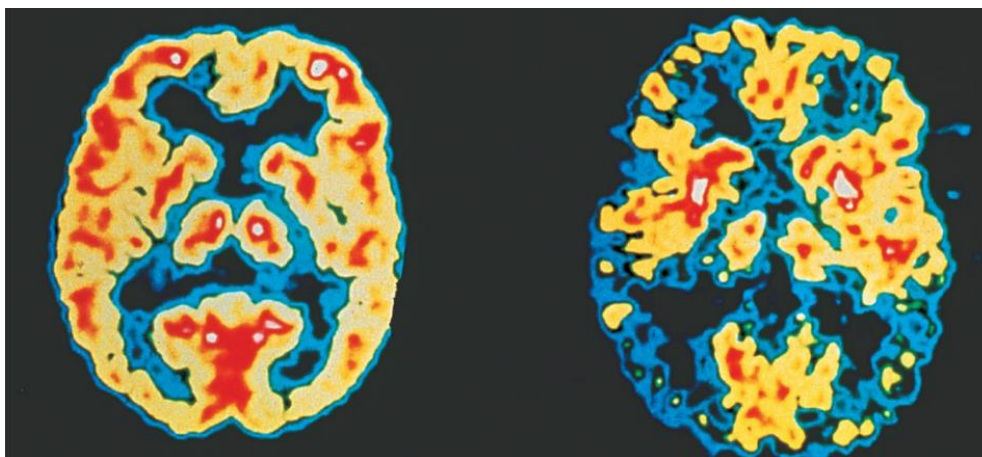


Figura 9 esempio scansione PET cervello umano

In Fig. 9 viene mostrata l'attività del cervello in una persona sana (sinistra) e in un paziente affetto dal morbo di Alzheimer (destra), tramite PET, dopo somministrazione del ^{18}F -FDG. Le colorazioni gialle e rosse indicano le zone di attività elevata in una data regione del cervello.

2.3 SPECT

La Tomografia Computerizzata a Emissione di Fotone Singolo è una tecnica diagnostica di medicina nucleare molto simile alla PET, infatti richiede anch'essa l'impiego di radiofarmaci per ottenere informazioni sui tessuti di interesse e si ha sempre la rilevazione dei raggi gamma provenienti dal decadimento radioattivo.

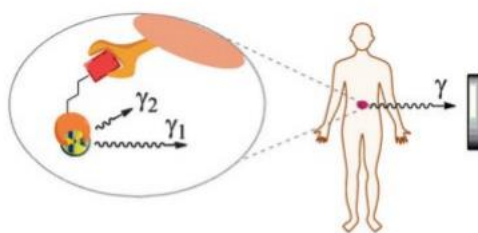


Figura 10 tecnica SPECT, figura tratta da Caterina F. Romogida 2013

La differenza della SPECT dalla PET è nel radioisotopo usato; in quanto, in questo caso, i raggi γ sono prodotti dal decadimento radioattivo. Questi, non essendo dovuti all'annichilazione dei positroni, non sono più a coppie, ma sono singoli e sono rilevati direttamente dal rilevatore esterno.¹²

I principali settori di applicazione di questa tecnica per immagini sono la cardiologia, la neurologia e l'oncologia. Ad esempio, la tomoscintigrafia del cuore permette di studiarne il flusso sanguigno e la capacità vitale.

L'esame, in genere, viene eseguito sia a riposo, sia sotto sforzo. Confrontando le due diverse immagini ottenute, il medico potrà distinguere, ad esempio, una zona di ischemia da una di infarto. La SPECT permette anche di studiare malattie cerebrali e, in particolare, malattie cerebrovascolari, epilessie, malattie neurodegenerative e tumori cerebrali. Il radiofarmaco, in questo caso, si distribuisce nel sistema nervoso centrale in modo proporzionale al flusso sanguigno dell'area interessata e le immagini tomografiche rappresentano la circolazione regionale.

2.4 Gamma Camera

Le radiazioni γ emesse dall'annichilazione del positrone in PET o dal decadimento del radioisotopo in SPECT sono rilevate da rilevatori costituiti principalmente da:

- un collimatore;
- un cristallo scintillatore, che converte la radiazione γ ricevuta in luce visibile;
- una serie di tubi fotomoltiplicatori, all'interno dei quali avviene la conversione luce visibile-segnale elettrico;
- l'apparecchiatura elettronica di elaborazione e visualizzazione.

Il rivelatore PET è posto tutto intorno al paziente in modo da avere la rivelazione simultanea dei raggi γ emessi a 180° l'uno dall'altro, mentre in SPECT il rivelatore deve ruotare attorno al paziente in quanto si registrano solo i raggi γ che giungono perpendicolarmente al detector.

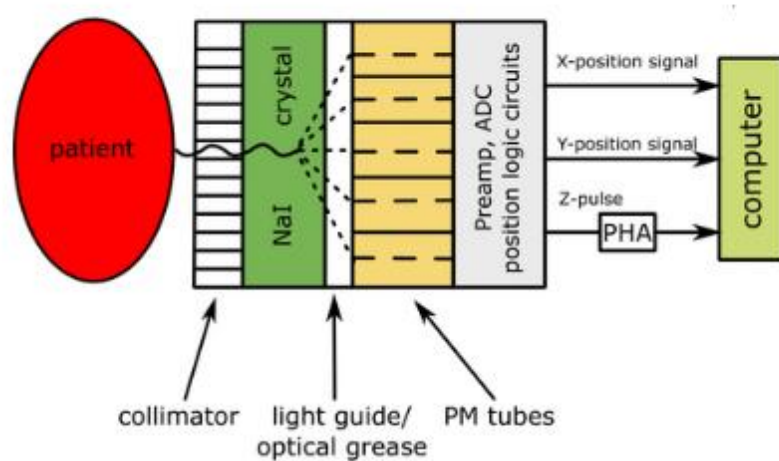


Figura 11 schema di come funziona la gamma camera

Capitolo 3-Sonda molecolare

In generale una sonda di imaging molecolare ci permette di visualizzare, caratterizzare e quantificare processi biologici nei sistemi viventi. Essa è generalmente costituita da tre elementi chimicamente legati tra loro: un imaging reporter (o signalling agent), un vettore (targeting moiety) e un linker che collega l'imaging reporter e il vettore (Figura 12). L'imaging reporter produce il segnale che poi dovrà rispondere alla tecnica di imaging utilizzata. L'applicabilità della sonda alla specifica modalità di imaging dipende strettamente dalle proprietà chimico-fisiche dell'imaging reporter. L'imaging reporter potrà essere un radionuclide (PET e SPECT), una molecola fluorescente (imaging ottico) o un elemento para- o ferro-magnetico (MRI). Nei radiofarmaci terapeutici le radiazioni emesse dal radionuclide vengono sfruttate per produrre un effetto citotossico sulle cellule bersaglio.

I principali radionuclidi usati nell'imaging e nella terapia sono elencati in Tabella 1.

Radionuclide	Tempo di decadimento	Decadimento	Energia della particella (MeV)
^{99m} Tc	6 ore	Raggi γ	-6057
¹³¹ I	8 giorni	β^- , γ	$\beta^- \sim 0.192$, $\gamma \sim 0.364$
¹⁸ F	110 minuti	β^+	~ 0.63
⁶⁸ Ga	68 minuti	β^+	~ 1.9
¹⁷⁷ Lu	6.6 giorni	β^- , γ	$\beta^- \sim 0.5$, $\gamma \sim 0.113$
⁶⁴ Cu	12.7 ore	β^- , β^+	$\beta^+ \sim 0.58$, $\beta^- \sim 0.19$
¹¹¹ In	4 ore	EC, Raggi γ	0.171, 0.245
⁹⁰ Y	64 ore	β^-	~ 2.3
¹¹ C	20 minuti	β^+	~ 0.96

Tabella 1 Radionuclidi più usati in medicina nucleare

Nel caso di un radionuclide metallico, esso deve essere complessato da un chelante con l'obiettivo di formare complessi stabili. È necessario che i chelanti abbiano elevata stabilità termodinamica e inerzia cinetica nei confronti del radionuclide per evitare reazioni di dissociazione o di competizione con molecole o ioni endogeni (per esempio la transmetallazione).

Tutti i complessi progettati devono tener sempre conto di vari fattori: la stabilità, le interazioni non specifiche che portano alla localizzazione fuori bersaglio e la sua versatilità, poiché il sistema è progettato per un certo tipo di radionuclide e potrebbe non essere adatto per altri.

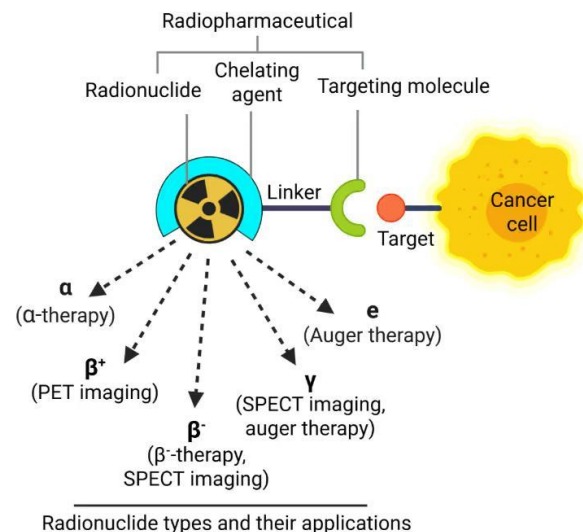


Figura 12 rappresentazione schematica di un radiofarmaco

Il vettore, che rappresenta la componente della sonda responsabile del riconoscimento del bersaglio biologico, è un'altra componente importante del radiofarmaco. Esso interagisce con uno specifico target o biomarcatore associato a determinati processi biologici. In funzione della natura del bersaglio e dell'applicazione, il vettore può essere costituito da una piccola molecola, un peptide, una proteina o un anticorpo.

Il linker è invece la componente deputata a stabilire il collegamento chimico tra il vettore e l'imaging reporter, contribuendo al contempo a limitarne le interazioni reciproche. La sua presenza può influenzare in maniera significativa le proprietà farmacocinetiche e la biodistribuzione della sonda di imaging. La scelta del linker costituisce pertanto un elemento rilevante nella progettazione della sonda, poiché le sue caratteristiche chimico-fisiche possono essere opportunamente modulate al fine di ottenere un profilo farmacocinetico adeguato alla specifica applicazione. In particolare, parametri quali lunghezza, flessibilità, idrofilità e carica devono essere attentamente considerati nella selezione del linker più appropriato.¹⁹

Capitolo 4- Stabilità termodinamica e inerzia cinetica

Nella medicina nucleare i radiofarmaci sono indispensabili all'applicazione della tecnica stessa. Essi possono essere costituiti da complessi tra un particolare radioisotopo metallico ed un legante selezionato per ottenere un'elevata stabilità termodinamica ed inerzia cinetica, in modo da non avere il rilascio della componente radioattiva all'interno dell'organismo dove da una parte darebbe false informazioni diagnostiche, dall'altra svolgerebbe un'attività citotossica indifferenziata anche sui tessuti sani.

La stabilità termodinamica misura la forza dell'interazione tra il legante e il catione che possono essere definiti acido di Lewis, per il catione metallico, e base di Lewis, per il legante. Secondo la teoria HSAB si hanno interazioni più forti tra acidi Hard (poco polarizzabili e con alta densità di carica (alta carica e piccole dimensioni)) e basi Hard, oppure tra acidi Soft (molto polarizzabili e con bassa densità di carica) e basi Soft.^{[13][17]}

HARD SOFT ACID BASE LIST																		
H																		
Li	Be																	
Na	Mg																	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As				
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb				
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi				

Hard Acid	Intermediate Acid	Soft Acid	

Hard Base	Intermediate Base	Soft Base	

C	N	O	F
P	S	Cl	
As	Se	Br	
Sb	Te	I	

Figura 13 Acidi e basi hard, soft e borderline

Un altro fattore che influenza la stabilità del complesso è la dimensione dello ione metallico in rapporto alla struttura del legante: cationi metallici di piccole dimensioni prediligono anelli chelati a sei termini; mentre cationi di dimensioni maggiori risultano più stabili se complessati con anelli chelati a cinque termini (Figura 14).

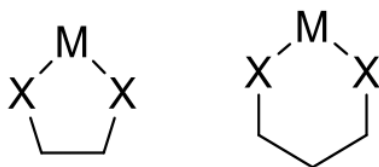


Figura 14 Anelli chelati a 5 o 6 termini

Durante la formazione di un complesso metallico ci sono due effetti che influenzano la loro stabilità:

- effetto chelato: l'uso di chelanti polidentati comporta un aumento del numero di molecole libere in soluzione durante la complessazione e quindi un valore entropico più positivo che rende più favorita la reazione e quindi più alta la costante di stabilità del complesso;
- effetto macrociclico: l'uso di chelanti macrociclici con atomi donatori con un arrangiamento ciclico danno maggiore stabilità dovuto alla combinazione dell'effetto entropico descritto dall'effetto chelato e da un contributo aggiuntivo dovuto alla preorganizzazione del legante (effetto entalpico).

L'inerzia cinetica di un complesso descrive la velocità con cui esso può andare incontro a processi di dissociazione o di scambio dei ligandi in un determinato intervallo di tempo. Un complesso può essere definito cineticamente inerte quando presenta una bassa velocità di scambio dei ligandi e tende a conservare la propria struttura anche in presenza di altre specie in grado di interagire con il metallo. È importante distinguere l'inerzia cinetica dalla stabilità termodinamica: quest'ultima descrive quanto un complesso sia favorito dal punto di vista energetico rispetto alle specie da cui può dissociarsi, mentre l'inerzia cinetica riguarda la velocità con cui tale processo avviene. Nel caso dei radiofarmaci, l'inerzia cinetica riveste un ruolo molto importante, poiché il complesso deve essere in grado di mantenere la propria integrità nelle condizioni fisiologiche per tutto il tempo necessario alla sua permanenza nell'organismo. Una scarsa inerzia cinetica può infatti favorire il rilascio del radionuclide, che potrebbe successivamente interagire con altre biomolecole e distribuirsi in tessuti non bersaglio. È inoltre importante sottolineare

che l'inerzia cinetica non coincide necessariamente con la stabilità termodinamica: un complesso può infatti risultare termodinamicamente favorito e, allo stesso tempo, andare incontro a processi di dissociazione relativamente rapidi, oppure presentare una dissociazione termodinamicamente possibile ma cineticamente molto lenta. La valutazione dell'inerzia cinetica costituisce un parametro essenziale nella progettazione e nella selezione di sistemi chelanti destinati allo sviluppo di nuovi radiofarmaci.

Capitolo 5-Terapia

I radioisotopi possono essere utilizzati per applicazioni terapeutiche di medicina nucleare, come la terapia radionuclidica. Gli isotopi necessari a questo scopo devono decadere emettendo particelle β^- o α in modo da poterne sfruttare l'attività citotossica dovuta all'alta energia trasportata.

Un esempio di impiego di questi ultimi lo si trova nella Target Radionuclide Therapy o TRT che nel tempo si è rivelata molto efficace per il trattamento di tumori grazie alla sua elevata specificità e alla bassa invasività rispetto alla chemioterapia. Questa strategia si basa sull'utilizzare un emettitore β^- , α , o elettroni Auger, legato ad una molecola targeting biologicamente attiva che in maniera selettiva andrà ad accumularsi nel tessuto bersaglio. Un punto critico di questa tecnica è il garantire la stabilità e la sicurezza biologica dei radiofarmaci, contenenti questi nuclidi. A questo proposito vengono sfruttati molecole chiamate “leganti o chelanti” in grado di complessare il nuclide con l'obiettivo di formare complessi stabili. È necessario quindi che i chelanti abbiano elevata stabilità e inerzia cinetica nei confronti del radionuclide per evitare reazioni di dissociazione o di competizione (esempio la transmetallazione). Successivamente al complesso viene aggiunta una porzione di targeting necessaria per veicolare il radiofarmaco nel tessuto bersaglio. Tutti i complessi progettati devono tener sempre conto di vari fattori: la stabilità, le interazioni non specifiche che portano alla localizzazione fuori bersaglio e la sua versatilità, poiché il sistema è progettato per un certo tipo di radionuclide e potrebbe non essere adatto per altri ^[5].

La TRT viene usata per diversi tumori come quelli alla tiroide metastatici, i linfomi o metastasi ossee.^[5] Nella TRT il radionuclide più usato è il ^{177}Lu , possiede un'emivita di 6.65 giorni e decade, tramite emissione di particelle β^- , trasformandosi nel nuclide stabile ^{177}Hf nel 76% degli eventi ($E_{\beta, \text{max}} = 0.497 \text{ MeV}$). Di recente sono stati introdotti nuovi radionuclidi come ad esempio il ^{64}Cu .

Capitolo 6-Teranostica

La Teranostica consiste nella combinazione tra diagnostica e terapia, che sfrutta l'azione di un radiofarmaco. La particolarità di questi radiofarmaci consiste nel poter essere utilizzati sia nella diagnostica, se il radiofarmaco è provvisto di un radionuclide emettitore di positroni o di raggi γ , sia nella terapia se il radionuclide contenuto del radiofarmaco emette particelle beta, alfa o elettroni Auger. Questi diversi tipi di decadimento possono essere propri di un unico radioisotopo, o di radioisotopi differenti che però condividono le medesime proprietà chimico-fisiche e di complessazione.

Una delle problematiche della teranostica è la sintesi di chelanti in grado di legare ioni differenti, così da ottenere complessi con le stesse proprietà di localizzazione permettendo un'analogia funzione.^{20,21}

Inoltre, la diagnostica permette di ottenere informazioni utili per l'applicazione di una terapia corretta e più efficace.²² Un punto chiave della teranostica è la scelta del radionuclide. Oggigiorno la ricerca ha iniziato a prendere in considerazione l'impiego di metalli definiti "soft" anche se al momento c'è carenza di chelanti selettivi per tali radioisotopi. Alcuni esempi di coppie teranostiche usate sono: argento-103/111 e mercurio-197m/g (^{197m/g}Hg).

6.1.1 Argento 103/111

L'argento rappresenta un buon candidato, poiché è possibile sfruttare le sue emissioni, a scopo diagnostico e terapeutico, in base all'isotopo scelto. Ad esempio, l'argento-111 (¹¹¹Ag, $t_{1/2}$ = 7,47 d) possiede emissioni β^- a media energia ($E_{\beta-,max}$ = 1,04 MeV) e γ a bassa energia (E_γ = 245,4 keV, I_γ = 1,24%; E_γ = 342,1 keV, I_γ = 6,7%) che potrebbero essere sfruttate per trattamenti terapeutici e di imaging non invasivo associato tramite SPECT. Invece, l'argento-103 (¹⁰³Ag, $t_{1/2}$ = 65,7min, I_{β^+} = 27%) emette positroni che possono essere sfruttati per la PET.²³ La difficoltà maggiore è lo sviluppo di chelanti in grado di coordinare saldamente lo ione Ag^+ , in grado anche di formare legami covalenti con la molecola vettore, capace



Figura 15 isotopi argento

di localizzarsi selettivamente a livello delle cellule tumorali. Una delle problematiche che potrebbero verificarsi, se il complesso metallo-chelante risulta non essere stabile, è il rilascio del radionuclide nel flusso sanguigno con conseguente assorbimento da organi e tessuti sani. Di conseguenza è importante sviluppare chelanti che diano complessi Ag^+ termodinamicamente stabili e cineticamente inerti in vivo.

6.1.2 Complessazione Argento 103/111

L'argento (Ag) è un metallo di transizione che forma diversi composti di coordinazione, nei quali lo ione Ag^+ presenta generalmente numeri di coordinazione 2, 3 o 4, con geometrie che possono essere rispettivamente lineare, trigonale o tetraedrica, a seconda della natura del legante e della sua struttura. In generale i leganti possono essere lineari o macrociclici ed in base alla loro topologia, la geometria di coordinazione del complesso può variare. Un esempio è il complesso $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, nel quale lo ione Ag^+ è coordinato a due molecole di ammoniaca e presenta una geometria lineare. Al contrario, in presenza di chelanti polidentati in cui il numero di atomi donatori è maggiore di 6 come quelli rappresentati in Figura 16, la geometria di coordinazione può variare da quadrata planare a piramidale quadrata o anche pseudo-ottaedrica.

Alcuni esempi di leganti usati recentemente per complessare l'argento sono elencati di seguito:

- prima generazione: chelanti contenenti una struttura macrociclica avente come backbone un ciclo a 12 termini con 4 atomi donatori amminici che a loro volta legano 4 braccia uguali o differenti l'una dall'altra

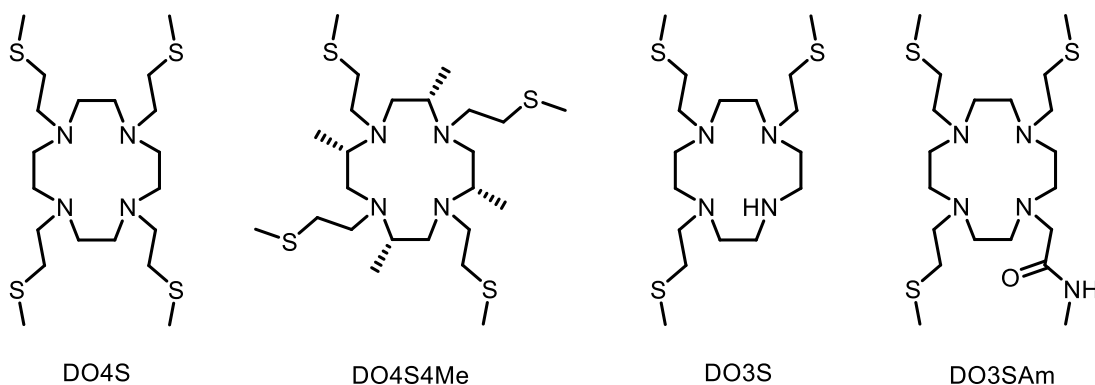


Figura 16 chelanti di prima generazione

- seconda generazione: chelanti contenuti una struttura macrociclica avente dimensioni variabili (9, 12, 13, 14) con 3 o 4 atomi di azoto che legano braccia uguali o differenti l'uno dall'altro (Figura 17).

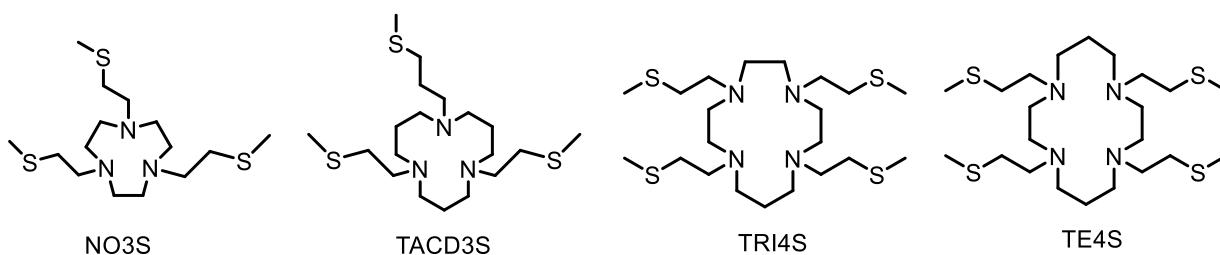


Figura 17 chelanti di seconda generazione

Nel caso di complessi macrociclici le proprietà e la stabilità termodinamica, possono essere influenzate da vari fattori:

- dimensione dell'anello;
- tipo di "braccia" legato all'atomo donatore;
- numero di atomi donatori.

La formazione e la stabilità dipendono anche dalle condizioni della soluzione, tra cui il pH. È necessario scegliere il pH più indicato per evitare di andare in contro a equilibri competitivi di protonazione o deprotonazione, che potrebbero influire sulla formazione e stabilità del complesso. Ad un pH alcalino, ad esempio, la sfera di coordinazione di Ag^+ potrebbe non essere satura e potrebbe essere consentita la coordinazione di un anione idrossido, dando così $[\text{AgL}(\text{OH})]$ (L= legante) che andrebbe in competizione

con l'equilibrio di formazione del complesso.²³

Di seguito sono stati messi a confronto due chelanti usati per la complessazione dell'argento. Il DO4S di prima generazione e il TE4S di seconda generazione.

DO4S

Il chelante 1,4,7,10-tetrazaciclododecano a cui sono aggiunte quattro braccia metiltioetiliche specificamente adattate all' Ag^+ prende il nome di DO4S (Figura 16). Si è notato che la stabilità del complesso aumenta con il numero di catene contenenti il gruppo metilsulfanile (metiltioetere), infatti il DO4S ha una stabilità termodinamica maggiore rispetto al DO3S. In conclusione il DO4S rappresenta l'esempio di chelante più stabile fra quelli mostrati in figura 16 per la complessazione dell'argento.²³ In particolare, nel complesso $[\text{Ag}(\text{DO4S})]^+$ l'argento viene complessato in una geometria planare quadrata distorta in cui il metallo si trova leggermente dislocato fuori dal piano dei quattro azoti (N_4 , Figura 18).^[23]

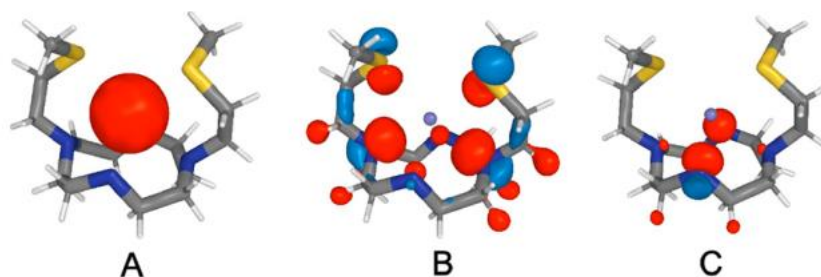


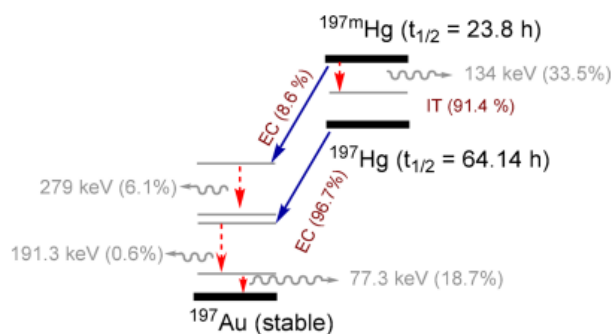
Figura 16 (A) SFO che rappresenta l'orbitale 5s situato sul centro Ag^+ . (B) SFO del ligando coinvolto nell'orbitale di legame principale. (C) SFO del ligando coinvolto nell'interazione di legame più debole.

TE4S

Il 1,4,8,11-tetrakis[2-(metilsolfanil)etil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (TE4S), è un tipo di ligando definito di “seconda generazione”, ovvero chelanti sui quali è stata esaminata la chimica di coordinazione modificando la dimensione dell'anello e la geometria. Si è notato come questi due parametri influenzano la stabilità termodinamica. Infatti è stata riscontrata una riduzione di stabilità rispetto al DO4S sia con l'aumento (TE4S) che con la riduzione (NO3S) della dimensione dell'anello.

6.2.1 Mercurio $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$

La scelta dei radioisotopi del mercurio, $^{197\text{m}}\text{Hg}$ ($t_{1/2} = 23,8$ h) e $^{197\text{g}}\text{Hg}$ ($t_{1/2} = 64,14$ h) è data dalla duplice natura diagnostica e terapeutica.



Le lettere “m e g” poste davanti al simbolo del mercurio indicano due tipi diversi di decadimento, in quanto il $^{197\text{m}}\text{Hg}$ emette sia raggi γ , che elettroni Auger; mentre il $^{197\text{g}}\text{Hg}$ emette prevalentemente elettroni Auger.²⁰ È possibile produrre $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$ ad alta attività specifica in un ciclotrone medico irradiando oro-197 monoisotopico, che genera entrambi gli isomeri in quantità analoghe al termine del bombardamento.²⁴ Poiché l'oro è naturalmente monoisotopico, l'arricchimento isotopico del materiale bersaglio non è necessario, riducendo significativamente i costi di produzione. La produzione di entrambi gli isomeri può essere ottenuta irradiando bersagli di oro con energie dei protoni comuni negli ospedali di medicina nucleare (<15 MeV), aumentando il potenziale per una disponibilità diffusa di $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$.²⁰ $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$ sono sfruttabili per l'imaging come ad esempio la SPECT, e per la terapia di piccoli tumori grazie agli elettroni Auger che trasferiscono elevata energia in piccoli volumi e sono efficaci nell'indurre danni nella zona di interesse. L'uso di elettroni Auger conferisce alta precisione alla terapia e abbassa la possibilità di colpire i tessuti sani.

La scelta del $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$ come radionuclide è purtroppo ancora ostacolata dalla mancanza di chelanti che siano in grado di legarsi in maniera stabile al vettore.²⁵

6.2.2 Complessazione Mercurio $^{197\text{m/g}}$

Il mercurio (Hg) è un metallo di transizione che può formare diversi complessi di coordinazione, nei quali lo ione Hg^{2+} può presentare diversi numeri di coordinazione, principalmente 2, 3 e 4, con geometrie rispettivamente lineare, trigonale e tetraedrica, anche se possono essere presenti strutture con numeri di coordinazione superiori. La geometria e il numero di coordinazione dipendono principalmente dalla natura e dalla

struttura del legante. Nel caso di leganti monodentati, Hg^{2+} può presentare un numero di coordinazione pari a 2, dando origine a complessi con geometria lineare. Esempi sono $[\text{Hg}(\text{CN})_2]$, in cui il mercurio è coordinato a due ioni cianuro, e $[\text{Hg}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, nel quale è coordinato a due molecole di ammoniaca. Un comportamento differente si osserva nel caso dei leganti macrociclici, caratterizzati da una struttura ad anello che contiene più atomi donatori. Ad esempio, un legante macrociclo come il cyclam contenente quattro atomi di azoto può coordinare Hg^{2+} attraverso tutti e quattro i siti donatori, dando luogo a un complesso con numero di coordinazione 4.

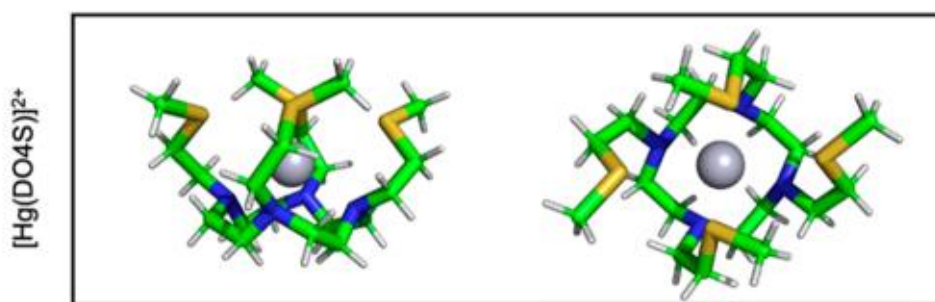


Figura 17 Struttura DFT complesso $[\text{Hg}(\text{DO4S})]^{2+}$

In Figura 19 è rappresentato un ulteriore esempio che mostra come la struttura di un legante macrociclico possa influenzare la geometria di coordinazione del metallo. In questo caso, il mercurio (II), complessato dal legante macrociclico DO4S, presenta un ambiente di coordinazione caratterizzato da un elevato numero di atomi donatori e forma un complesso con una geometria che può essere descritta come prismatica trigonale distorta o antiprismatica quadrata distorta. A causa delle grandi dimensioni dello ione Hg^{2+} e della flessibilità strutturale delle braccia pendenti del legante, il numero di coordinazione può variare tra 6 e 8, in funzione del grado di coinvolgimento dei diversi atomi donatori nell'interazione con il centro metallico. In particolare, la presenza di numerosi atomi di zolfo nel legante assume un ruolo fondamentale, poiché Hg^{2+} presenta una forte affinità per gli atomi di zolfo, favorendo la formazione di interazioni Hg-S . Questo esempio evidenzia quindi come la struttura e la flessibilità del legante macrociclico possano determinare non solo la stabilità del complesso, ma anche la geometria e il numero di coordinazione del mercurio. La capacità dei leganti macrociclici di adattarsi alle caratteristiche dello ione Hg^{2+} risulta particolarmente

rilevante anche nello sviluppo di sistemi chelanti destinati ai suoi radioisotopi.^{[24][25]}

Per i radioisotopi $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$ sono stati infatti studiati pochi gruppi di chelanti. Un esempio è rappresentato da un chelante basato sul macrociclo 1,4,7-tritriaciclonoanano ($[\text{9}]\text{S}_3$) in forma bifunzionale, oppure da una serie di ligandi basati sulla struttura del $[\text{15}]\text{NS}_4$ (Figura 20). Questi sistemi sfruttano la presenza di più atomi donatori, in particolare di zolfo, per favorire la coordinazione del mercurio e ottenere complessi sufficientemente stabili per l'applicazione considerata.

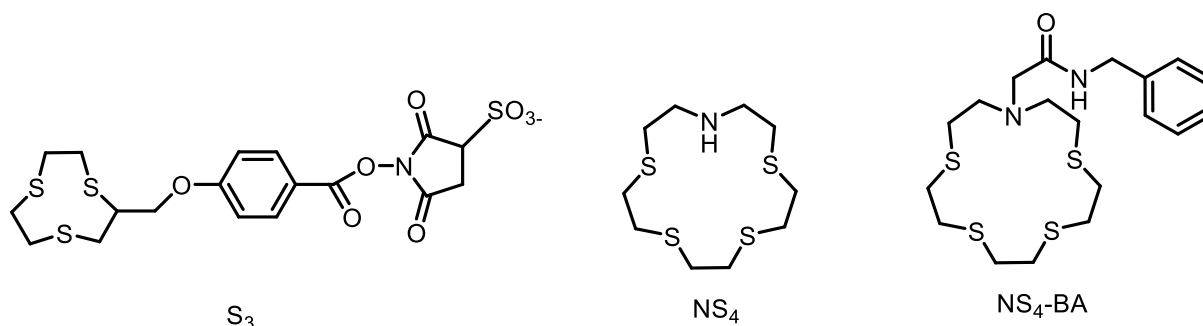


Figura 18 macrocicli S₃, NS₄ e NS₄-BA

Lo studio di questi complessi ha dato due differenti risultati: i chelanti di tipo S₃ non sono stati in grado di formare complessi stabili; mentre i chelanti NS₄ e NS₄-BA sembrano essere più promettenti nonostante la stabilità del complesso nel siero umano sia moderata.¹⁰ Nello specifico il legante NS₄-BA è stato pensato per la diagnostica, in particolare per la tecnica di imaging SPECT.²⁶

Un altro gruppo di leganti che sono stati presi in esame sono basati sul cyclen con 4 braccia come ad esempio il DOTA oppure il TCMC con 4 braccia ammidiche al posto delle braccia acetiche e i loro derivati bifunzionali p-SCN-Bn-DOTA e p-SNC-Bn-TCMC (Figure 21 e 22). Questi chelanti non sono stati in grado di legare il radionuclide eccetto il p-SCN-Bn-TCMC, solo grazie all'interazione tra il metallo e gruppo tiocianato, mantenendo però, una stabilità moderata. Pertanto rimane la necessità di studiare nuovi leganti che consentano di sfruttare le potenzialità della coppia teranostica $^{197\text{m/g}}\text{Hg}$ in maniera più completa.²⁰

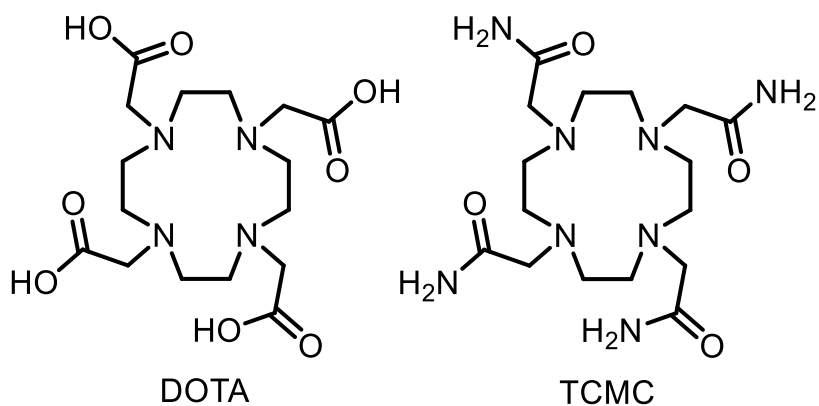


Figura 19 chelanti DOTA e TCMC

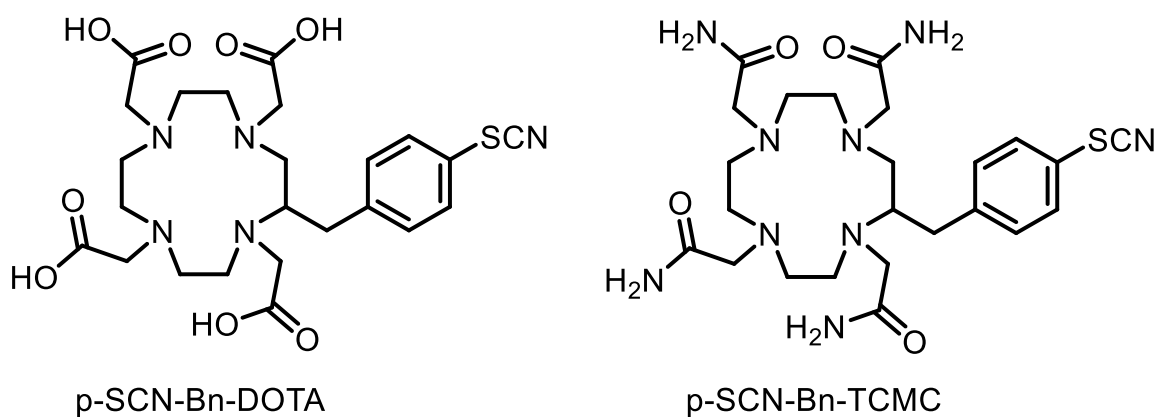


Figura 20 chelanti p-SCN-Bn-DOTA e p-SCN-Bn-TCMC

Un ulteriore esempio di chelante molto usato nella complessazione del mercurio (II) è il Cyclam (figura 23), in quanto contiene 4 atomi donatori in grado di formare un complesso abbastanza stabile con il mercurio.²⁷

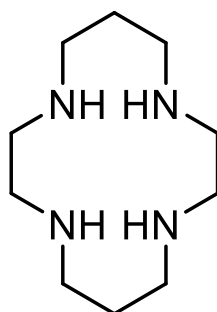


Figura 21 struttura cyclam

Capitolo 7- Chelator Design

La scelta e la progettazione dei leganti rappresentano un aspetto cruciale nell'ambito della Teranostica. Il design del legante, viene definito in funzione delle caratteristiche dello ione metallico che si desidera complessare. Di conseguenza è necessario considerare alcuni parametri chiave come: dimensione e carica del catione/anione, il suo comportamento hard/soft e geometria di complessazione. In particolare, ioni metallici a carattere soft come Argento (I) e Mercurio (II) prediligono chelanti contenenti atomi donatori soft, come ad esempio lo zolfo.

Sulla base della posizione degli atomi di zolfo all'interno della struttura, è possibile distinguere due principali categorie di leganti: nella prima, gli atomi di zolfo sono direttamente incorporati nella struttura del macrociclo; nella seconda, essi sono invece presenti nelle braccia funzionalizzate, connesse al macrociclo. Per quanto riguarda la prima categoria di chelanti, negli ultimi anni sono stati studiati differenti leganti basati sul [16]aneS₄ (1,5,9,13-tetra tiacicloesadecano). Il [16]aneS₄ appartiene a una classe più ampia dei tioeteri macrociclici, analoghi solforati degli eteri corona, che comprende macrocicli contenenti atomi donatori di ossigeno ampiamente impiegati nella chimica di coordinazione, quali il 18-corona-6.²⁴ Mentre gli eteri corona a base di ossigeno mostrano una marcata affinità per gli ioni dei metalli alcalini e alcalino-terrosi, i corrispondenti analoghi tioeteri presentano una maggiore affinità per i metalli a carattere soft, in accordo con i principi della teoria HSAB (Hard and Soft Acids and Bases).

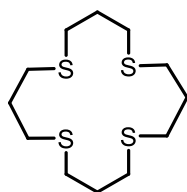


Figura 22 struttura [16]aneS₄

Il chelante [16]aneS₄ successivamente può essere funzionalizzato con diversi gruppi funzionali, ad esempio con un estere NHS, o un isotiocianato (NCS) per la coniugazione a gruppi amminici del vettore (Figura 25).

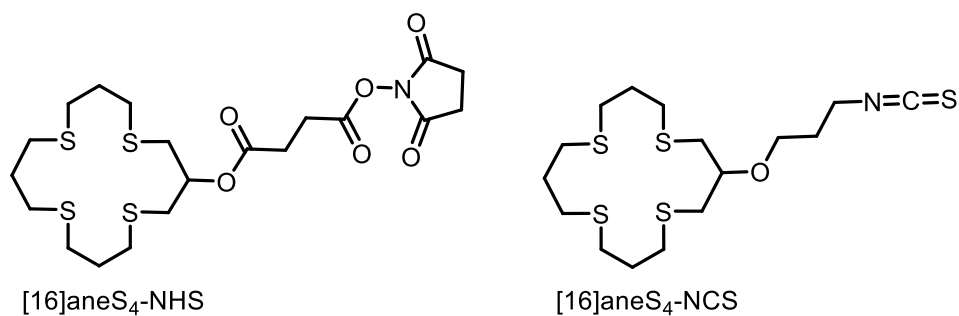


Figura 23 derivati del [16]aneS₄

In figura 26 sono riportati ulteriori esempi di leganti macrociclici contenenti atomi di zolfo nella struttura del macrociclo. Tali sistemi si differenziano sia per la dimensione del ciclo sia per il numero e la tipologia degli atomi donatori. In alcuni casi lo zolfo costituisce l'unica tipologia di atomo donatore presente nella struttura; in altri casi, si tratta di sistemi con atomi donatori misti, caratterizzati cioè dalla presenza sia di atomi di zolfo che altri quali ossigeno o azoto.²⁵

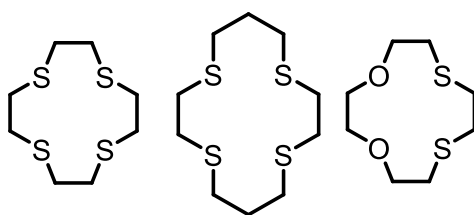


Figura 24 leganti macrociclici contenente zolfo

Il principale limite di questa categoria di leganti è rappresentato dalla difficoltà di funzionalizzazione della struttura macrociclica. Di conseguenza, nel legante progettato, eventuali braccia funzionalizzate devono essere già introdotte durante le fasi di sintesi e, in particolare, nel corso del processo di formazione del macrociclo stesso.

La seconda categoria di leganti (Figura 27) è caratterizzata dalla presenza di una struttura macrociclica costituita da un anello di dimensioni variabili, generalmente compreso tra 9 e 14 termini, contenente 3 o 4 atomi di azoto. Tra i principali macrocicli impiegati rientrano il Cyclen, il Cyclam e il TACN (1,4,7-triazaciclononano).

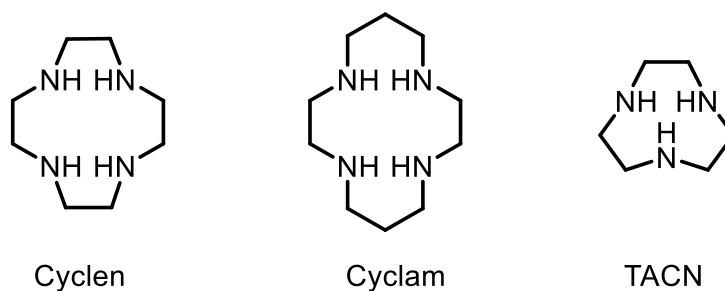


Figura 25 struttura Cyclen, Cyclam e TACN

I primi leganti funzionalizzati e quelli ancora più utilizzati sono il DOTA e il NOTA. Il DOTA è basato sul cyclen funzionalizzato con 4 braccia acetiche; mentre il NOTA è basato sul TACN funzionalizzato con 3 braccia acetiche (Figura 28).

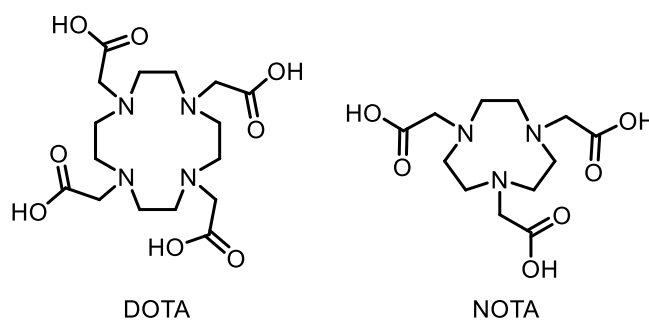


Figura 26 struttura DOTA e NOTA

Sono stati successivamente sviluppati ulteriori leganti caratterizzati dalla presenza di differenti braccia funzionalizzate, progettati in modo da aumentare l'affinità nei confronti di ioni metallici a carattere soft. In figura 29 sono riportati diversi esempi di leganti che si differenziano per il numero di braccia funzionalizzate, per numero di atomi donatori disponibili e per le dimensioni del macrociclo.²²

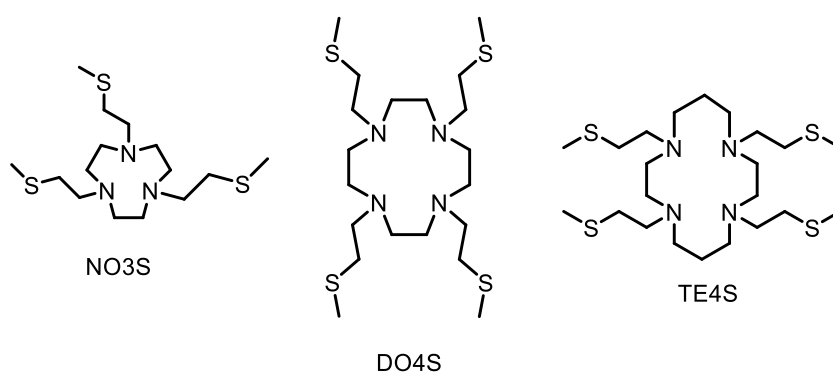


Figura 27 strutture leganti contenenti zolfo

Per quanto riguarda questa tipologia di chelanti il principale vantaggio risiede nella possibilità di funzionalizzare il macrociclo con braccia di diversa natura e in numero variabile, anche mediante modifiche successive alla sintesi del macrociclo stesso.¹⁸

Un altro esempio di leganti impiegati nella complessazione di ioni metallici a carattere soft sono chelanti basati sul Cyclam. Questo macrociclo risulta essere un buon candidato per lo studio di chelanti per il mercurio, data la sua versatilità nella funzionalizzazione delle ammine endocicliche presenti.

Inoltre, va evidenziata una strategia per incrementare l'inerzia cinetica del complesso, che consiste nel modificare il macrociclo di partenza aggiungendo elementi che apportano ad un aumento di rigidità. Nel caso specifico si può aggiungere un ponte etilenico al macrociclo stesso. L'effetto di tale modifica è stato valutato mediante studi comparativi nei quali lo ione metallico, nel caso specifico Cu (II), viene complessato da due leganti caratterizzati dallo stesso scheletro macrociclico e dalle medesime braccia funzionali, ma differenti per la presenza o l'assenza del ponte etilenico. Il confronto ha permesso di valutare l'influenza della presenza del ponte etilenico all'interno della struttura macrociclica, sulle stabilità cinetica del complesso. In Figura 30 sono riportate le strutture dei leganti impiegati nello studio.²⁸

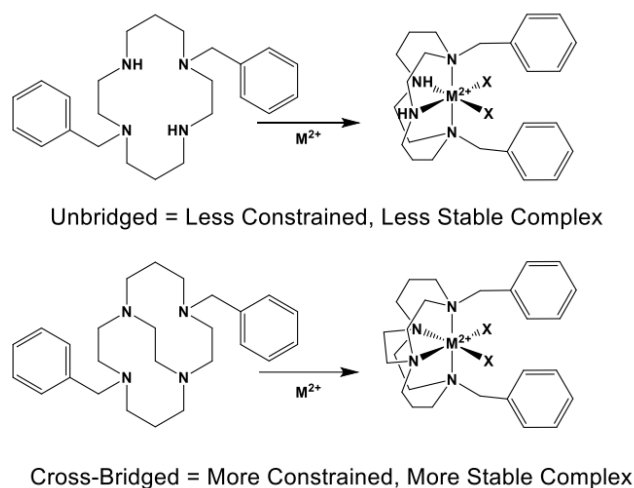


Figura 28 Leganti con e senza ponte etilenico

In Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti durante lo studio relativo all'inerzia cinetica verso la reazione di dissociazione acida di due complessi di Cu (II).

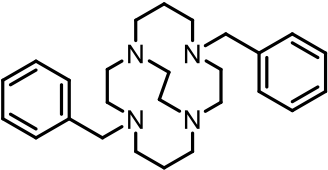
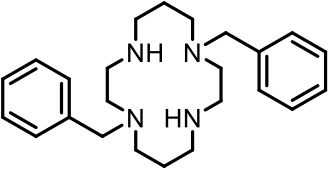
Ligand	30°C 1M HCl	50°C 5M HCl	70°C 5M HCl	90° 5M HCl
 Bn ₂ Bcyclam		2.38 h	24 min	
 Bn ₂ cyclam		33 min		

Tabella 2 Tabella stabilità complessi Cu (II) a diverse temperature

Dai valori ottenuti si osserva che nel caso dei due complessi (Cu-Bn₂Bcyclam e Cu-Bn₂cyclam) l'introduzione del ponte etilenico determina un aumento della stabilità del complesso alla dissociazione, assieme ad un incremento della relativa emivita.

Anche la natura delle braccia del legante può influenzare la stabilità del complesso. A tal proposito, mantenendo invariata la struttura del macrociclo e la presenza del ponte etilico, è stato valutato l'effetto della sostituzione dei gruppi metilici con gruppi benzilici sulla stabilità del complesso. In tabella 3 sono rappresentati i dati ottenuti.

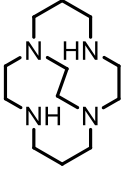
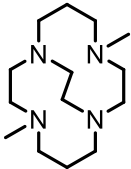
Ligand	30°C 1M HCl	50°C 5M HCl	70°C 5M HCl	90° 5M HCl
 H ₂ Bcyclam				11.8 min
 Me ₂ Bcyclam		7.3 days		79 min

Tabella 3 Tabella stabilità complessi Cu (II) a diverse temperature

Dal confronto tra Cu-Me₂Bcyclam e Cu-Bn₂Bcyclam si osserva che la sostituzione dei gruppi benzilici con gruppi metilici determina un aumento della stabilità cinetica del complesso. Nonostante la presenza dei gruppi benzilici sembri conferire un lieve aumento della stabilità, il maggiore ingombro sterico associato alle due braccia benziliche potrebbe aver favorito la decomplessazione, contribuendo ad una diminuzione sulla stabilità cinetica del complesso. Questi risultati evidenziano come la stabilità dei complessi sia determinata da molteplici fattori e non possa essere prevista considerando unicamente la natura dei sostituenti presenti sul legante.²⁸

Capitolo 8-Obiettivo Tesi

L'obiettivo della tesi è stato quello di sintetizzare e caratterizzare 4 leganti polidentati basati sulla struttura del cyclam e contenenti braccia tioliche o tiofenoliche. Inoltre, due di questi sono basati sul *trans*-dimetil-Cyclam mentre altri due sul Cyclam cross-linkato (CB-cyclam). I seguenti leganti (Figura 31) sono progettati per la complessazione di metalli soft quali argento e mercurio, in modo da poter studiarne i complessi per eventuali fini teranostici.

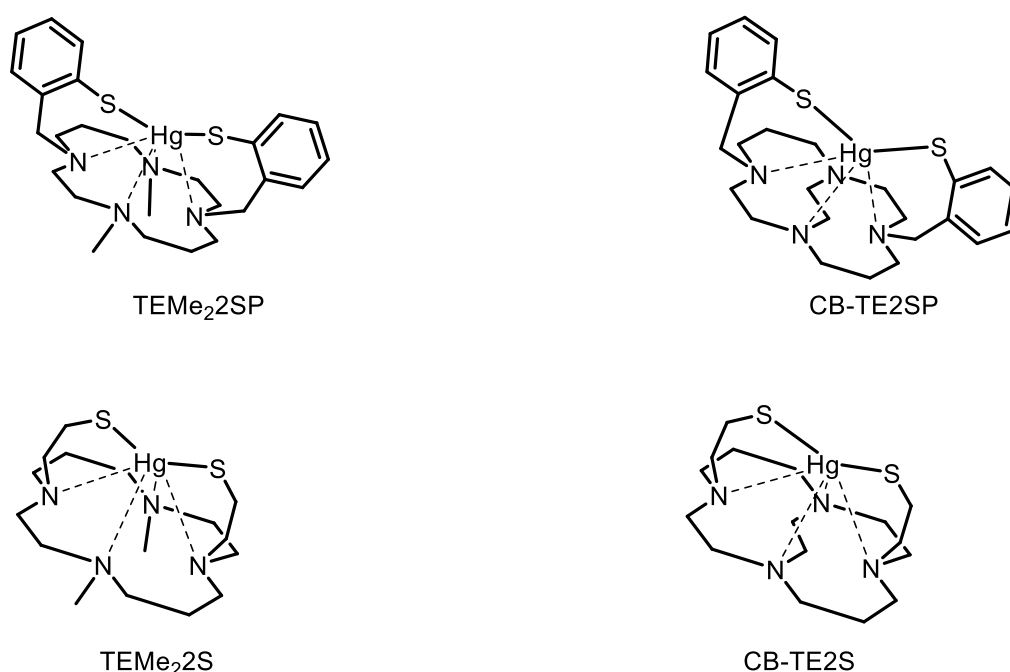


Figura 29 Struttura leganti oggetto di studio

I leganti TEme2SP e CB-TE2SP differiscono nella struttura macrociclica rispettivamente del dimetilcyclam o del CB-cyclam funzionalizzati con braccia tiofenoliche. Allo stesso modo i leganti TEme2S e CB-TE2S differiscono per l'anello macrociclico e braccia contenenti gruppi tiolici. Lo scopo di questi leganti è ottenere complessi termodinamicamente stabili con ioni metallici soft. Questo è ottenibile sfruttando la teoria HSAB, in quanto basi hard hanno una tendenza a legarsi con acidi hard, mentre le basi soft si legano preferibilmente ad acidi soft. Per tale motivo sono state scelte braccia contenente zolfo, essendo una base soft, si legherà preferibilmente ad acidi soft come argento e mercurio. In oltre la presenza di gruppi tiolici e tiofenolici, essendo più basici dei tioeteri, dovrebbero interagire più fortemente con

lo ione metallico, ottenendo maggior inerzia cinetica e stabilità del complesso.

Un altro obiettivo della tesi è di verificare come il diverso design del macrociclo e delle braccia possa influenzare la cinetica e la stabilità di complessazione. Infatti è possibile fare un doppio confronto: nel primo caso è possibile confrontare i leganti a parità di braccia e vedere come cambia l'inerzia cinetica e stabilità del complesso aumentando la rigidità del macrociclo. Allo stesso modo è possibile mettere a confronto i leganti aventi la stessa struttura macrociclica, ma differenti braccia. Anche in questo caso lo scopo è verificare se un aumento di rigidità e di ingombro sterico possa influenzare la complessazione, in quanto la presenza di anelli aromatici incrementa la rigidità, mentre le braccia alifatiche possono risultare più flessibili. In generale un aumento nella rigidità nel macrociclo o nelle braccia può portare un incremento nell'inerzia cinetica e stabilità del complesso in quanto si ha una maggior contributo da parte della pre-organizzazione, ovvero il legante spende meno energia per preorganizzarsi in modo tale da complessare lo ione metallico.

Un ulteriore dettaglio importante nel design di questi leganti da mettere in rilievo è la presenza del ponte disolfuro in tutti e quattro i leganti. Questa scelta è dettata dalla tendenza dei tioli/tiofenoli liberi ad andare incontro a spontanea ossidazione. Quindi, è stato deciso di sintetizzare direttamente i leganti con il ponte disolfuro, più stabili nel tempo, e poi ridurre il disolfuro solo prima della complessazione.

Tutti gli step hanno previsto un controllo qualitativo attraverso l'uso della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC-MS) e caratterizzati attraverso l'analisi degli spettri NMR monodimensionali (^1H , ^{13}C) e bidimensionali HSQC e COSY).

Capitolo 9- Materiali e Metodi

Reagenti e solventi sono stati acquistati da varie fonti commerciali e utilizzati senza ulteriori purificazioni. Per la cromatografia su strato sottile (TLC) è stata utilizzata silice Merck “Silica gel 60F254” (0.063-0.200mm; 70-230mesh ASTM). Per eseguire le colonne cromatografiche è stata utilizzata silice Merck “Silica gel 60F254” (0.063 - 0.200mm; 70 -230mesh ASTM). Per la visualizzazione delle macchie in TLC è stato usato permanganato di potassio alcalino. Per le purificazioni in HPLC e gli spettri di massa sono stati utilizzati sistemi accoppiati HPLC-MS dotato di un sistema di pompe Waters “1525 binary HPLC” pump e come analizzatore di massa è stato utilizzato un “Waters 3100 Mass Detector” con sorgente ESI+/ESI- e singolo quadrupolo come analizzatore di massa, su questo HPLC si è usata una colonna analitica “Waters Xterra”. Mentre il secondo sistema HPLC-UV-MS dotato di un sistema di pompe Waters “2535 Quaternary Gradient Module”, un rivelatore UV/Visibile Waters “2489 UV/Visible detector” e come analizzatore Waters “Acquity QDa”, si sono impiegate colonne analitiche “AtlantisTM T3 5 μ m C18 4 6x150mm” e “BridgeTM Phenyl 3.5 μ m 4.6x150 mm”. Le purificazioni HPLC semipreparative sono state effettuate su una colonna AtlantisTM Prep dC18 5 μ m OBDTM 19x100 mm (Waters). Gli spettri NMR ¹H, ¹³C e ¹⁸F sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker “Advance III 500 MHz” (11.4 T), equipaggiato con un probe da 5mm “PABBO” e unità di controllo della temperatura “BVT-3000”, usando TMS come riferimento per i chemical shifts δ [ppm].

(3x30 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3X30) mL con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidificazione della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta mediante cristallizzazione. Si scioglie l'estratto nel minimo volume di diclorometano (4 mL) e si aggiungono 40 mL di etere di petrolio. Si ottiene istantaneamente un precipitato arancione. Successivamente, si ripete l'operazione ma la miscela viene mantenuta in freezer per la notte in modo da poter favorire la cristallizzazione. Si ottengono dei cristalli aghiforme di color arancione.

Resa: 42%

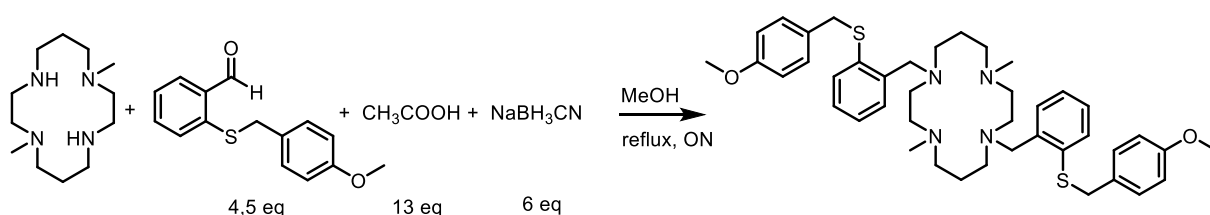
R_f = 0.92 AcOEt:EtPet 4:6

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.7 (s 3H, CH₃-S), 4.1 (s 2H, O-CH₂-C), 6.7 (d 2H, C-CH-CH), 7.2 (d CH-CH-C), 7.4 (d C-CH-CH), 7.5 (m 2H, CH-CH-CH), 7.8 (d 1H, C-CH-CH), 10.3 (s 1H, CH-C-O).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 38.73 (S-CH₂-C), 55.51 (CH₃-O), 114.30 (CH-C-O), 126.36 (CH-CH-CH), 128.28 (CH-CH-CH), 130.28 (C-CH-CH), 131.60 (C-CH₂-S), 134.15 (CH-CH-CH), 134.98 (CH-C-C), 141.44 (CH-C-S), 159.28 (C-O-CH₃), 191.7 (C-O).

10.1.2 Sintesi di TEMe₂2SP protetto

Per la sintesi del legante TEMe₂2SP si esegue un'amminazione riduttiva a partire dal Trans-dimetilCyclam, e quattro equivalenti e mezzo di braccio aromatico sintetizzato nello step precedente.



A 5 mL di metanolo si aggiunge il trans-dimetilCyclam (1 eq, 0.050 g, 2.2 mmol). Successivamente si aggiungono il sodiocianoboroidruro (4 eq, 0.055 g, 0.66 mmol) e acido acetico (10 eq, 0.125 mL, 21 mmol). Infine si aggiunge 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide in eccesso (3 eq, 0.17 g, 0,66 mmol). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione, a refluxo per 24 h. La reazione si controlla tramite TLC (Acetato di etile : Etere di petrolio 4:6). Si effettua una prima aggiunta di sodiocianoboroidruro (1.5 eq, 0.021 g, 0.33 mmol) e 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide (1.5 eq, 0.085 g, 0,33 mmol). Passate 4 ore si esegue nuovamente una TLC e corsa HPLC-MS di controllo. Si procede con una seconda aggiunta di sodiocianoboroidruro (0.5 eq, 0.006 g, 0.11 mmol), acido acetico (0.8 eq, 0,010 mL, 0.18 mmol) e 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide (0.5 eq, 0.028 g, 0,11 mmol). Si procede con l'eliminazione del solvente, si recupera il solido ottenuto con DCM (5 mL) ed il lavaggio della fase organica con bicarbonato di sodio (2x5) e acqua (2x5 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3X5) mL con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidificazione della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta tramite colonna cromatografica in silice in modo da avere la separazione dai sottoprodotti ottenuti durante la reazione. La colonna viene impaccata ed eluita con una fase mobile costituita da DCM:MeOH 99:1. Dopo aver raccolto le prime frazioni (circa 100 mL di elueato) contenenti sottoprodotti, si cambia eluente passando ad una miscela DCM:MeOH 97:3 in modo da favorire l'eluizione del prodotto. Il metodo usato per le corse HPLC-MS è riportato in tabella 6 nel capitolo 13.

Resa:17%

R_f = 0.12 (DCM:MeOH 95:5)

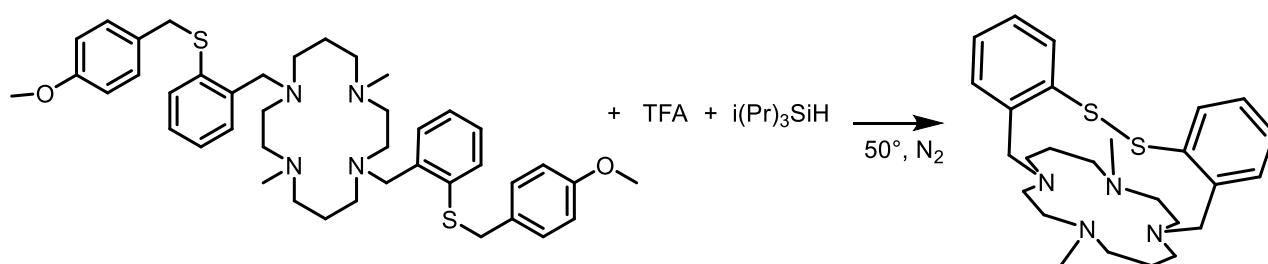
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.8 (m 4H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.3 (s 6H, CH₃-N), 2.4-2.5 (d 8H, N-CH₂), 2.7-3.1 (m 8H, CH₂-N-CH₃), 3.4-3.6 (s 4H, N-CH₂-C), 3.8 (s 3H, CH₃-O), 4.1 (s 4H, S-CH₂-C), 6.8 (d 4H, CH-C-O), 7.0-7.1 (m 4H, CH-C-CH-S), 7.1-7.2 (m 4H, CH-CH-C), 7.2-7.3 (m 2H, CH-CH-CH), 7.4 (d 2H, CH-C-S).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 29.97 (CH₂-CH₂-CH₂), 39.1 (S-CH₂-C), 41.7 (CH₃-N), 48.7 (N-CH₂-CH₂), 55.7 (CH₃-O), 56.7 (CH₂-CH₂-N), 58.03 (N-CH₂-C), 114.4 (CH-CH-

C), 126,7 (CH-CH-CH), 129.1 (N-CH₂-C), 130.3 (C-CH-CH), 131.9 (C-CH-CH), 137.2 (C-S), 159.3 (C-O-CH₃).

10.1.3 Deprotezione

Il secondo step della sintesi prevede la deprotezione delle braccia tiofenoliche, mediante l'utilizzo di TFA in presenza di alcune gocce di (iPr)₃SiH come scavenger.



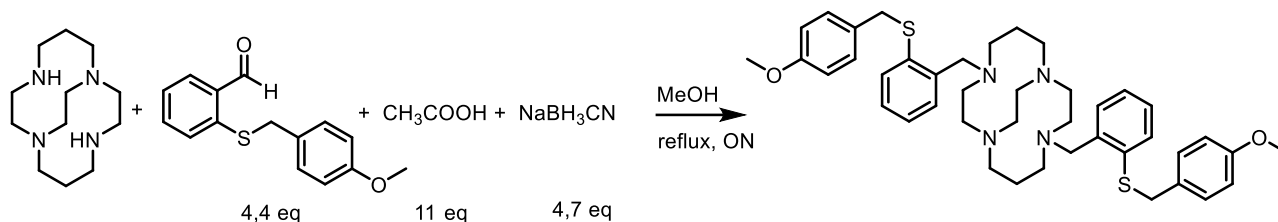
Per la deprotezione si aggiunge, alla fase organica (0.035 g, 750 mL 0.05 mmol) una miscela di Acido trifluoroacetico (TFA) e triisopropilsilano in rapporto 98:2 (1 mL). La reazione viene mantenuta sotto azoto per tre giorni a 50°. La reazione si controlla tramite HPLC-MS. Dopo il completamento della reazione, il crudo si precipita in dietiletere (40 mL). Si centrifuga a 4000 giri/min, si separa il surnatante dal precipitato. Si recupera il precipitato ottenuto in DCM (5 mL), e lo si controlla mediante HPLC-MS. La purificazione è stata fatta mediante HPLC-MS semipreparativa. I metodi usati per le corse HPLC-MS di controllo e la purificazione mediante HPLC-MS semipreparativa, sono riportati rispettivamente nella tab 9 e 9 nel capitolo 13.

Resa: 25 %

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22 (CH₂-CH₂-CH₂), 31 (CH₃-N), 52 (CH₂-CH₂-N), 55 (N-CH₂-C), 62 (CH₂-CH₂-N), 130 (CH-CH-CH), 133 (CH-CH-C), 137 (C-CH₂-N), 168 (C-S).

10.2.1 Sintesi di CB-TE2SP protetto

Per la sintesi del legante CB-TE2SP si esegue un'amminazione riduttiva a partire dal cyclam cross-linkato e 4.4 equivalenti di braccio aromatico sintetizzato nello step precedente.



A 5 mL di MeOH si aggiunge il cyclam cross-bridge (1 eq, 0.050 g, 2.2 mmol). Successivamente si aggiungono sodiocianoboroidruro (2.5 eq, 0.0347 g, 0.55 mmol) e acido acetico (4 eq, 0.051 mL, 88 mmol). Infine si aggiunge 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide (2.2 eq, 0.13 g, 0.49 mmol). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a refluxo per 4 ore. La reazione si controlla tramite una TLC (Acetato di etile:Etere di petrolio 4:6) e corsa HPLC di controllo. Si effettua una prima aggiunta di sodiocianoboroidruro (1.5 eq, 0.021 g, 0.33 mmol) e 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide (1.5 eq, 0.086 g, 0.33 mmol). Successivamente la reazione viene lasciata over night a temperatura ambiente. Passate le 24 ore si procede con una seconda aggiunta di sodiocianoboroidruro (0.7 eq, 0.01 g, 0.15 mmol), acido acetico (3 eq, 0.037 mL, 0.66 mmol) e 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldeide (0.7 eq, 0.040 g, 0.15 mmol). La reazione viene mantenuta a refluxo nuovamente per 4 ore. Si ha poi l'eliminazione del solvente, si recupera il solido ottenuto con DCM (5 mL) ed il lavaggio della fase organica con bicarbonato di sodio (2x5 mL) e acqua (1x5 mL); mentre la fase acquosa viene lavata con DCM (3x5 mL). Infine, alla fase organica, si aggiunge Na_2SO_4 per ottenere l'anidificazione della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta tramite colonna cromatografica in silice in modo da avere la separazione dai sottoprodotti ottenuti durante la reazione. La colonna viene impaccata ed eluita con una fase mobile costituita da DCM:MeOH 99:1. Dopo aver raccolto le prime frazioni (100 mL) contenenti sottoprodotti, si cambia eluente passando ad una miscela DCM:MeOH 97:3 in modo da favorire l'eluizione del prodotto. Di seguito

sono elencati la resa e Rf tramite TLC post colonna cromatografica.

Resa:61%

Rf = 0.31 (DCM:MeOH 97:3)

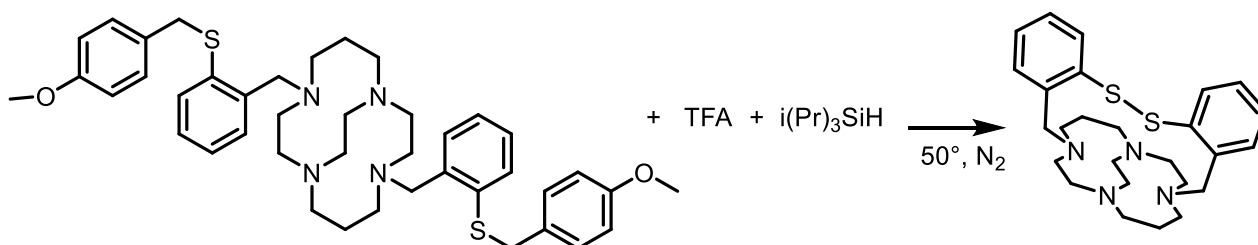
Il metodo usato per le corse cromatografiche di controllo è riportato nella tabella 13 del capitolo 13.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.5-1.7 (d 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.6-3.1 (m 16H, CH₂-CH₂-N), 3.2-3.3 (m 2H, N-CH₂-CH₂-N), 3.6 (s 2H, N-CH₂-CH₂-N), 3.7 (d 2H, N-CH₂-C), 3.8 (m 6H, CH₃-O), 4 (s 4H, C-CH₂-S), 6.8 (d 4H, CH-CH-O), 7.1 (d 4H, C-CH-CH), 7.3 (s 4H, CH-CH-C), 7.4 (m 2H, CH-CH-C), 7.5 (d 2H, CH-CH-C).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24.62 (CH₂-CH₂-CH₂), 39.52 (S-CH₂-C), 51.51 (CH₂-CH₂-N), 54.05 (N-CH₂-CH₂), 55.55 (O-CH₃), 55.87 (N-CH₂-CH₂), 57.40 (N-CH₂-C), 114.2 (CH-C-O), 126.8 (CH-CH-CH), 128.8 (CH-CH-CH), 129.2 (N-CH₂-C), 130.7 (C-CH-CH), 130.3 (S-C-CH), 131.3 (S-C-CH), 136.8 (S-C-CH), 137 (S-CH₂-C). 159.2 (CH-C-O).

9.2.2 Deprotezione

Il secondo step della sintesi prevede la deprotezione delle braccia tiofenoliche, mediante l'utilizzo di TFA in presenza di alcune gocce di un 2% di (iPr)₃SiH come scavenger.



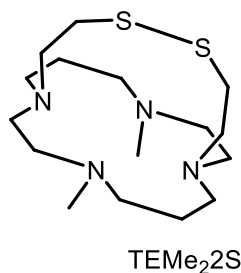
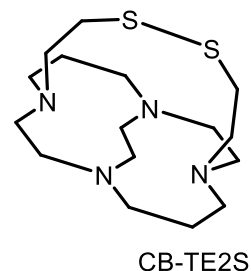
Per la deprotezione si aggiunge, alla fase organica (0.054 g, 1 mL, 0.07 mmol) estratta precedentemente una miscela di Acido trifluoroacetico (TFA) e triisopropilsilano in rapporto

98:2 (1 mL). La reazione viene mantenuta sotto azoto per tre giorni a 50°. La reazione si monitora tramite HPLC-MS. Dopo il completamento della reazione, si recupera il crudo in metanolo e lo si precipita in dietiletere (40 mL). Si centrifuga a 4000 giri/min, si separa il surnatante dal precipitato. Si recupera il precipitato in acqua (3 mL), lo si porta a pH 9 usando soda 1M e si esegue un'estrazione DCM : H₂O (3x5mL). La fase acquosa viene successivamente lavata con DCM (3x5 mL). Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazione della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta mediante HPLC-MS semipreparativa. I metodi usati per le corse HPLC-MS di controllo e la purificazione mediante HPLC_MS semipreparativa sono riportati rispettivamente nella tabella 16 e 17 nel capitolo 13.

Resa:42%

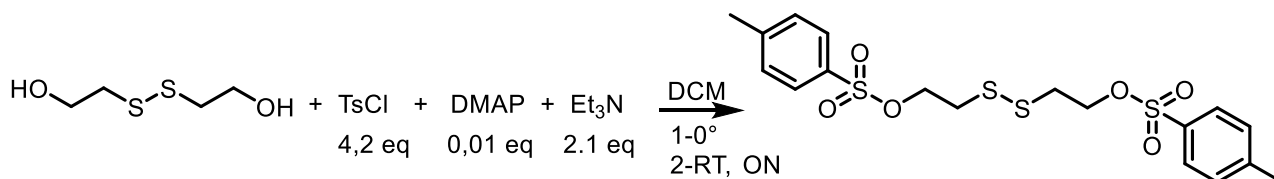
¹³C NMR (125MHz, CD₃OD) δ (ppm): 22 (CH₂-CH₂-CH₂), 45 (N-CH₂-CH₂), 60 (N-CH₂-CH₂), 64 (N-CH₂-C), 129 (CH-CH-CH), 132 (C-CH-CH), 139 (CH₂-C-CH), 166 (S-C-CH).

10.3 Sintesi leganti TEme₂S e CB-TE₂S



10.3.1 Sintesi del Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro)

Per ottenere il legante TEme₂S e CB-TE₂S si è partiti dalla sintesi del braccio Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro), ottenuto mediante la tosilazione del Bis(2-idrossietil)disolfuro.



A 6 mL di DCM (diclorometano) si aggiunge Et₃N (triethylammina) (2.1 eq, 0.49 g, 4.8 mmol) e Bis(2-idrossietil)disolfuro (1 eq, 0.350 g, 2.3 mmol). Successivamente si aggiungono lentamente tosilcloruro (TsCl) (4.2 eq, 1.82 g, 9.6 mmol) e 4-(dimetilammino)piridina (DMAP) (0.01 eq, 0.0028 g, 1 mmol) con bagno di ghiaccio e si attende per 10 minuti. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione, a temperatura ambiente per 24 ore. Si ha poi l'eliminazione del solvente, si recupera il solido con DCM (510 mL) ed il lavaggio della fase organica con acqua (3x10 mL); mentre la e la fase acquosa viene lavata (3x10mL) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazioe della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta.

La purificazione viene fatta mediante precipitazione: all'estratto si aggiungono circa 10 mL di metanolo, e si ottiene istantaneamente un precipitato bianco. Successivamente, dopo aver eliminato il solvente tramite rotavapor, si ripete l'operazione ma la miscela viene mantenuta in freezer overnight in modo da poter favorire la cristallizzazione.

Resa: 70%

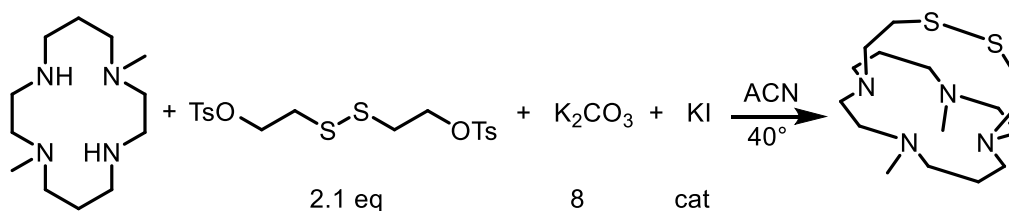
R_f = 0.5 (EtPet:AcOEt 7:3)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.5 (s 6H, CH₃-C-CH), 3.0 (t 4H, CH₂-S-S), 4.3 (t 4H, O-CH₂-CH₂), 7.4 (d 4H, CH-C-CH), 7.7 (d 4H, CH-C-S).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.87 (CH₃-C-CH), 37.25 (CH₂-S-S), 67.67 (O-CH₂-CH₂), 128.18 (CH-CH-C), 130.19(CH₃-C-CH), 133(CH-C-CH₃), 145.3 (CH-C-S).

10.3.2 Sintesi di TEMe₂S protetto

Per ottenere il TEMe₂S è necessario eseguire un'alchilazione a partire dal trans-dimetil-cyclam e il Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro) in leggero eccesso.

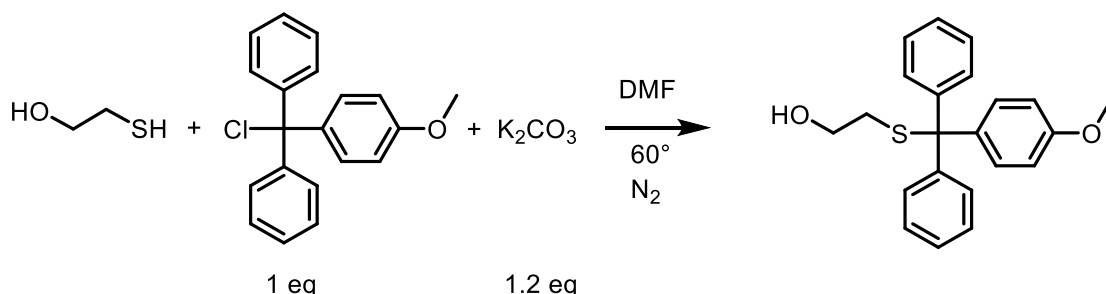


A 15 mL di acetonitrile si aggiunge il trans-dimetil-cyclam (1 eq, 0.050g, 0.22 mmol). Alla soluzione vengono aggiunti K₂CO₃ (4 eq, 0.12 g, 0.87 mmol) e KI in quantità catalitiche (0.1 eq). Infine si aggiunge il Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro) (1.1 eq, 0.111 g, 0.24 mmol). La soluzione è mantenuta in agitazione a 40°C. La reazione viene monitorata tramite HPLC-MS e TLC con miscela Etere di Petrolio : Acetato di etile 7:3. La TLC permette di verificare la presenza di braccio libero. La reazione viene lasciata over night. Successivamente si procede con una prima aggiunta di K₂CO₃ (2 eq, 0.061 g, 0.44 mmol) e di Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro) (0.5 eq, 0.051 g, 0.11 mmol). Passate 4 ore si esegue una seconda aggiunta di K₂CO₃ (2 eq, 0.061 g, 0.44 mmol) e di Bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro) (0.5 eq, 0.051 g, 0.11 mmol). Si ha poi l'eliminazione del solvente e si recupera il solido con DCM (10 mL) ed il lavaggio della fase organica con 3 aliquote di Brine (3x10 mL); mentre la fase acquosa viene

lavata 3x10 mL con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazioe della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta mediante HPLC-MS semipreparativa. I metodi usati per il controllo HPLC-MS e HPLC-MS semipreparativa sono riportati rispettivamente nella tabella 8 e 16 nel capitolo 10.

10.3.3 Sintesi del 2-[[4-(4-metossifenil)(difenil)metil]sulfanil]etanolo

Il primo step di reazione prevede la protezione del tiolo con 4-metossitrifenil cloruro di metile



A 1.5 mL di N,N-dimetilformammide (DMF) anidra si aggiunge 4-metossitrifenil cloruro (1 eq, 0.198 g, 0.64 mmol). Successivamente si aggiungono mercaptoetanolo (1 eq, 0.045 mL, 0.64 mmol) e il K₂CO₃ (1.2 eq, 0.11 g, 0.77 mmol). La soluzione viene mantenuta in agitazione, sotto azoto a 60° per 1h. La reazione viene controllata tramite TLC (Acetato di etile : etere di petrolio 1:9). R_f = 0.078

Si elimina il solvente a pressione ridotta, si recupera il prodotto in DCM (15 mL) e si lava la fase organica con 3 aliquote di H₂O (3 x 5 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3x5) mL con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazioe della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta.

Resa = 77 %

La resa effettiva risulta leggermente superiore al 100%. Tale valore è attribuibile alla presenza di una frazione residua di DMF, utilizzata come solvente nel corso della reazione,

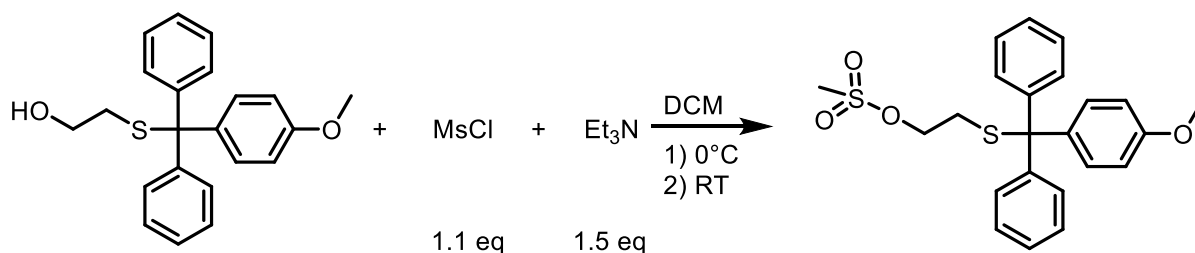
che permane nel prodotto isolato. Il rapporto molare DMF/prodotto è stato determinato mediante analisi NMR ed è risultato pari a 4:6.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.5 (t 2H, S-CH₂-CH₂), 3.5 (t 2H, OH-CH₂-CH₂), 4.1 (s 3H, CH₃-O), 6.8 (d 2H, CH-C-O), DA 7.1 A 7.4 (m 12H, CH-CH-CH).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 35.2 (CH₂-S), 55.3 (CH₃-O), 61 (OH-CH₂), 67 (S-C), 114 (CH-CH-C), 127 (CH-CH-CH), 128.1 (C-CH-CH), 129.6 (CH-CH-CH), 131 (C-CH-CH), 136.4 (C-C-S), 145.3 (C-C-CH), 159 (C-O-CH₃).

10.3.3 Sintesi del metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile

Il secondo step di sintesi prevede la mesilazione del gruppo ossidrilico.



A 75 mL di DCM si aggiunge 2-[[[(4-metossifenil)(difenil)metil]sulfanil]etanolo (1 eq, 0.669 g, 1.2 mmol). Successivamente si aggiungono il mesilcloruro (1.5 eq, 0.220 mL, 2.87 mmol) e il Et₃N (2.1 eq, 0.556 mL g, 4.01 mmol) con bagno di ghiaccio. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione e azoto a temperatura ambiente per 1h. La reazione si controlla tramite TLC (DCM). Si ha poi l'eliminazione del solvente, si recupera il solido ottenuto in DCM (15 mL) e si lava la fase organica con NH₄Cl 1M (3x20 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3x20 mL) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidificazione della fase organica, e dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente mediante rotavapor.

R_f = 0.76 (DCM)

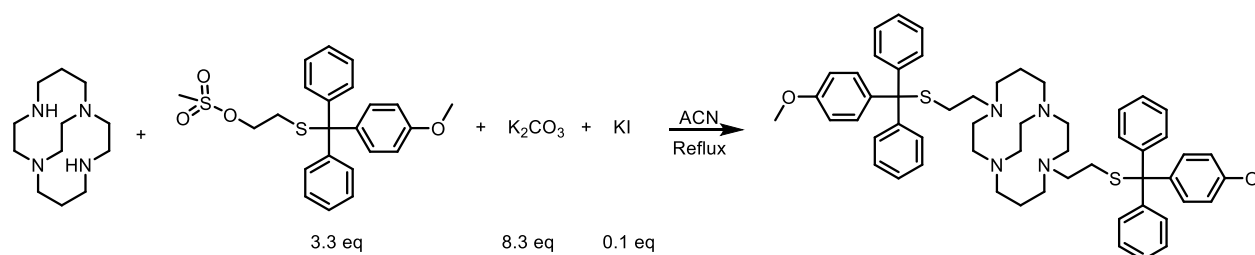
Resa=78%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.6 (t 2H, CH₂-CH₂-S), 2.9 (s 3H, CH₃-S), 3.7 (t 2H, O-CH₂-CH₂), 3.8 (s 3H, CH₃-O), 6.9 (m 2H, O-C-CH), da 7.2 A 7.5 (m 12H, CH-CH-CH).

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): 30 (CH₂-CH₂-S), 38 (CH₃-S), 56 (CH₃-O), 63 (O-CH₂-CH₂), 64 (S-C-CH), 114 (CH-CH-C), 127 (CH-CH-CH), 128.1 (C-CH-CH), 129.6 (CH-CH-CH), 131 (C-CH-CH), 136.4 (C-C-S), 145.3 (C-C-CH), 159 (C-O-CH₃).

10.3.4 Sintesi del legante CB-TE2S protetto

Il terzo step di reazione prevede l'alchilazione del braccio, sintetizzazione negli step precedenti, e il cyclam con ponte etilenico.



A 1.5 mL di acetonitrile si cyclam cross-linkato (1 eq, 0.030 g, 0.13 mmol). Successivamente vengono aggiunti metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile (1.8 eq, 0.102 g, 0.24 mmol), K_2CO_3 (3.3 eq, 0.060 g, 0.44 mmol) e KI in quantità catalitiche. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a refluxo per 24 h. Trascorse 24 ore si esegue una prima aggiunta di braccio (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol) e K_2CO_3 (2 eq, 0.035 g, 0.13 mmol). Passate 4 ore si esegue una seconda aggiunta di braccio (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol) e K_2CO_3 (2 eq, 0.035 g, 0.13 mmol). Al termine di ulteriori 4 ore si ha l'eliminazione del solvente, si recupera il solido ottenuto con DCM (15 mL) ed il lavaggio della fase organica con di NH_4Cl 1M (3 x 20 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3x20 mL) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na_2SO_4 per ottenere l'anidificazione della fase organica, e dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente mediate rotavapor. Successivamente l'estratto viene ridisciolto in ACN (1 mL) e vengono aggiunti il metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol), K_2CO_3 (1 eq, 0.018 g, 0.13

mmol) e KI in quantità catalitiche. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione refluxo per 24 ore. La reazione viene monitorata tramite HPLC-MS. il metodo usato è riportato in tabella 20 del capitolo 13. Successivamente si elimina il solvente, si recupera il prodotto in DCM (10 mL) e si lava la fase organica con H₂O (3 x 10 mL), mentre la fase acquosa viene lavata (3x10) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazione della fase organica, e dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta. La purificazione è stata fatta tramite colonna cromatografica in silice in modo da avere la separazione dai sottoprodotti ottenuti durante la reazione. La colonna viene impaccata ed eluita con una fase mobile costituita da DCM:MeOH 98:2. Dopo aver raccolto le prime frazioni contenenti sottoprodotti, si cambia eluente passando ad una miscela DCM:MeOH:NH₃ 95:5:0.1 in modo da favorire l'eluizione del prodotto. Di seguito sono elencati la resa e R_f tramite TLC (DCM:MeOH 95:5) post colonna cromatografica.

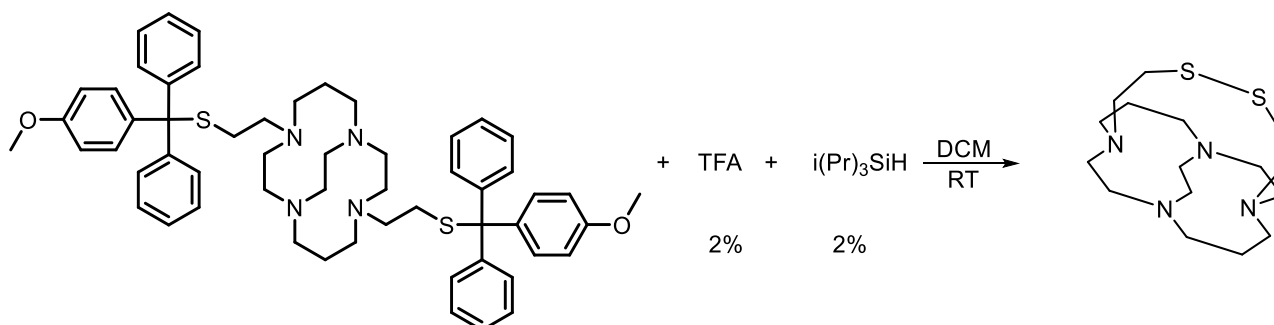
R_f = 0.1 (DCM:MeOH 95:5)

Resa=23%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.8 (m 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.6-3.1 (m 16H, CH₂-CH₂-N), 3.1 (m 2H, N-CH₂-CH₂-N), 3.7 (N-CH₂-CH₂-N), 4 (s 6H, CH₃-O), 6.8 (m 2H, CH-C-O), da 7.1 a 7.4 (m 12H, CH-CH-CH).

10.3.5 Deprotezione

Lo step successivo prevede la deprotezione, mediante l'utilizzo di TFA in presenza di alcune gocce di i(Pr)₃SiH come scavenger.

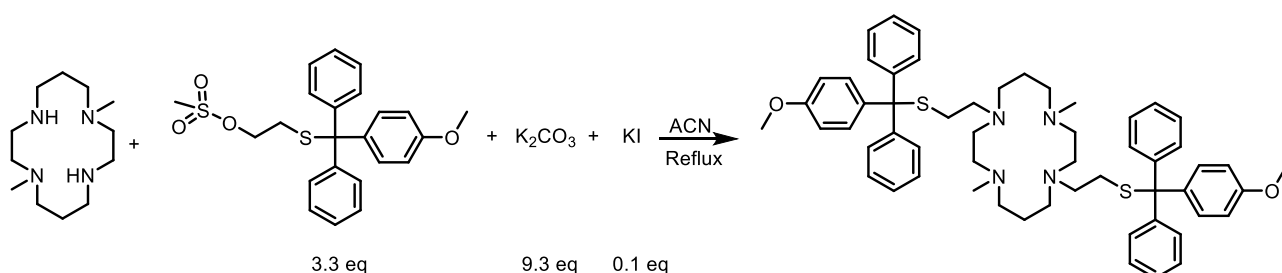


Per la deprotezione si aggiunge, alla fase organica (1 eq, 0.005 g, 0.0056 mmol) estratta precedentemente una miscela di acido trifluoroacetico (TFA) e triisopropilsilano in rapporto 98:2 (0.5 mL). La soluzione viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente si elimina il solvente a pressione ridotta e si eseguono 2 lavaggi con Etere di Petrolio (1 mL) per separare eventuali sottoprodotti, formatosi durante la reazione, dal prodotto ottenuto. La reazione si controlla tramite HPLC-MS. Il metodo usato è riportato in tabella 23 al 13.

Il legante così ottenuto è stato utilizzato per la complessazione senza ulteriori purificazioni.

10.3.6 Sintesi del legante TEme₂S protetto

La sintesi del legante TEme₂S prevede l'alchilazione del braccio, sintetizzazione negli step precedenti, e il trans-dimetilCyclam.



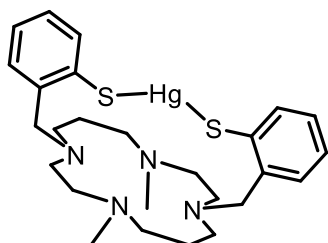
A 3.5 mL di acetonitrile si aggiunge trans-dimetil-Cyclam (1 eq, 0.030 g, 0.13 mmol) sciolti in ACN (3.5 mL). Successivamente vengono aggiunti metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile (1.8 eq, 0.101 g, 0.24 mmol), K₂CO₃ (3.3 eq, 0.060 g, 0.43 mmol) e KI in quantità catalitiche. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a refluxo per una notte. Trascorse 24 ore si esegue una prima aggiunta di braccio (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol) e K₂CO₃ (2 eq, 0.035 g, 0.13 mmol). Passate 4 ore si esegue una seconda aggiunta di braccio (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol) e K₂CO₃ (2 eq, 0.035 g, 0.13 mmol). Al termine di ulteriori 4 ore si elimina il solvente, si recupera il prodotto in DCM (10 mL) e si lava la fase organica con H₂O (3x10 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3x10 mL) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na₂SO₄ per ottenere l'anidrifcazioe della fase organica

e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta.

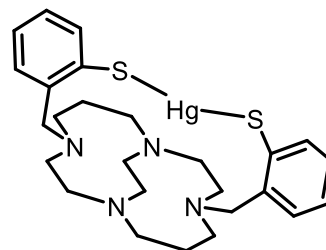
Successivamente l'estratto viene ridisciolti in ACN (1 mL) e vengono aggiunti metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile (0.5 eq, 0.028 g, 0.065 mmol), K_2CO_3 (1 eq, 0.018 g, 0.13 mmol) e KI in quantità catalitiche. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione refluxo per 24 ore. La reazione viene monitorata tramite HPLC-MS. Successivamente si elimina il solvente, si recupera il prodotto in DCM (10 mL) e si lava la fase organica con H_2O (3 x 10 mL); mentre la fase acquosa viene lavata (3x10 mL) con DCM. Infine, alla fase organica, si aggiunge Na_2SO_4 per ottenere l'anidrifcazioe della fase organica e, dopo filtrazione, si ha l'eliminazione del solvente a pressione ridotta.

Capitolo 11-Complessazione

11.1- Complessazione leganti TEMe₂SP e CB-TE₂SP

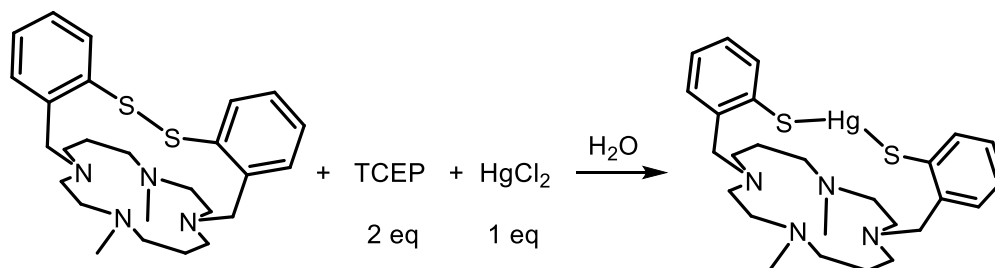


TEMe₂SP



CB-TE₂SP

11.1.1 Complessazione legante TEMe₂SP con Mercurio (II)



Il legante (circa 1.5 mg) lo si scioglie in acqua (60 μ L). Si aggiunge Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) (13 μ L). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti e controllata mediante HPLC-MS. Successivamente si aggiunge cloruro di mercurio (HgCl₂) disciolto in acqua (20 μ L), in quantità equimolare al legante. La soluzione viene mantenuta nelle medesime condizioni per 30 minuti a temperatura ambiente e controllata mediante HPLC-MS. Il metodo usato è riportato in tabella 26, al capitolo 13. In figura 33 è riportato l'analisi HPLC-MS; mentre in figura 34 e 35 sono mostrati rispettivamente il pattern teorico e quello sperimentale del complesso.

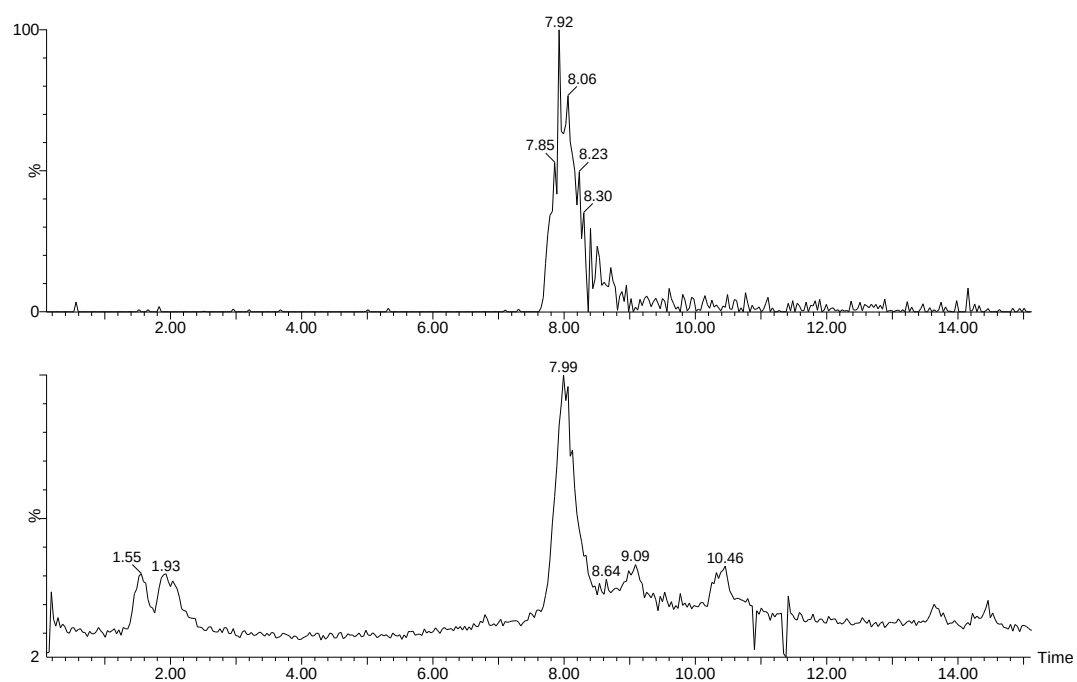


Figura 31 analisi HPLC-MS

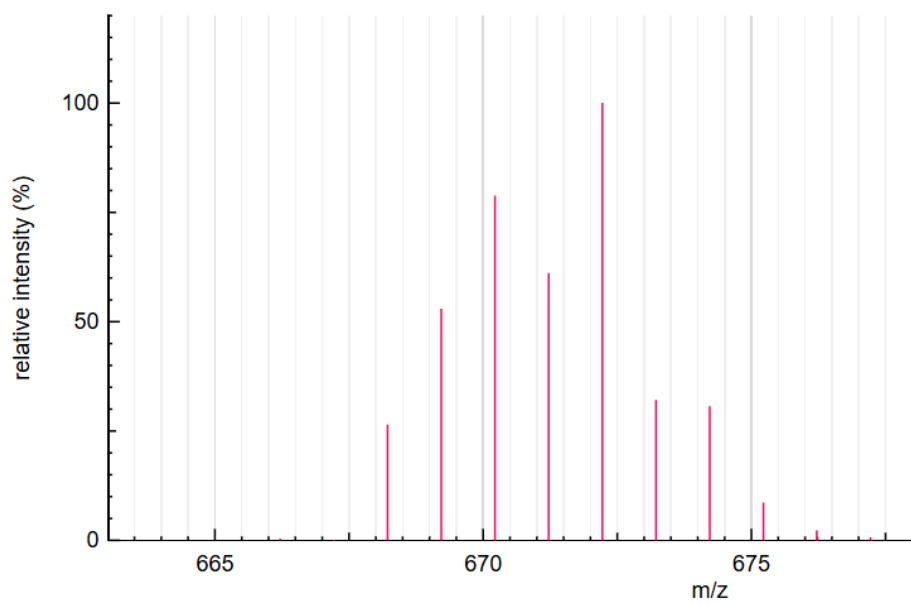


Figura 32 Pattern isotopico teorico del complesso con Hg

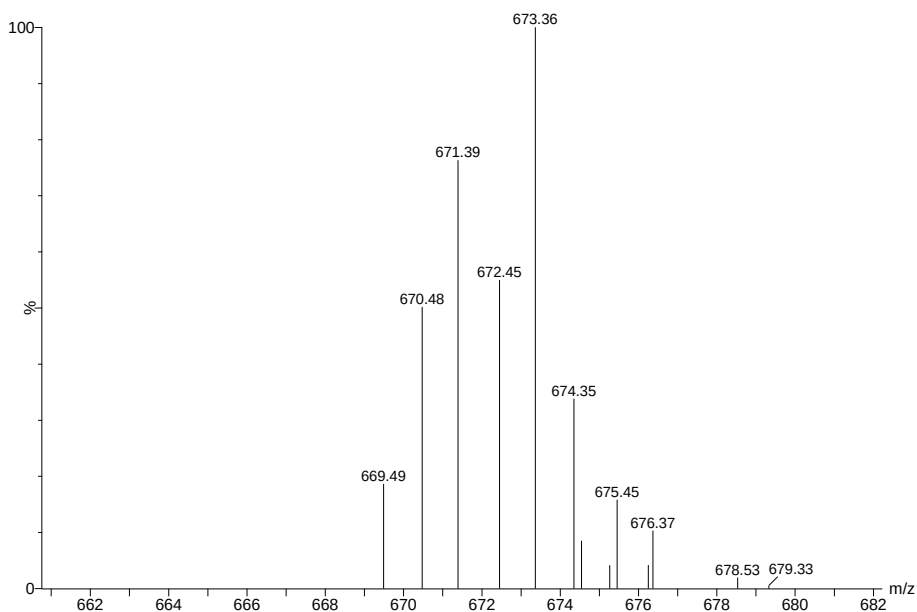
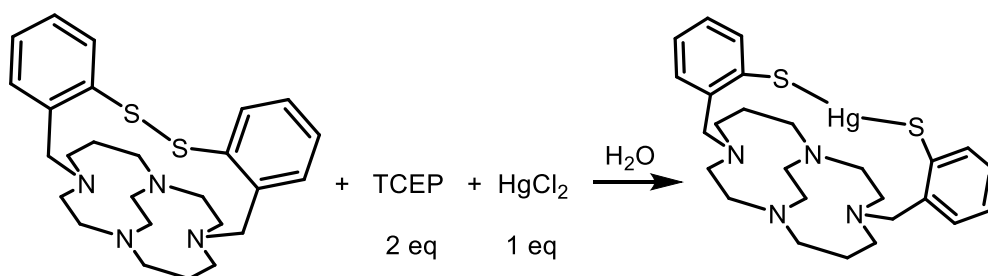


Figura 33 pattern sperimentale del complesso con Hg

11.1.2 Complessazione legante CB-TE2SP con Mercurio (II)



Il legante (circa 4 mg) lo si scioglie in acqua (350 μ L). Si aggiunge il Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) (circa 50 μ L). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti e controllata mediante HPLC-MS. Successivamente si aggiunge cloruro di mercurio (HgCl₂) disciolto in acqua (100 μ L), in quantità equimolare al legante. La soluzione viene mantenuta nelle medesime condizioni per 30 minuti a temperatura ambiente e controllata mediante HPLC-MS.

In figura 36 è riportato l'analisi HPLC-MS; mentre in figura 37 e 38 sono mostrati rispettivamente il pattern teorico e quello sperimentale del complesso.

La complessazione viene controllata mediante HPLC-MS. Il metodo usato è riportato in tabella 29, al capitolo 13.

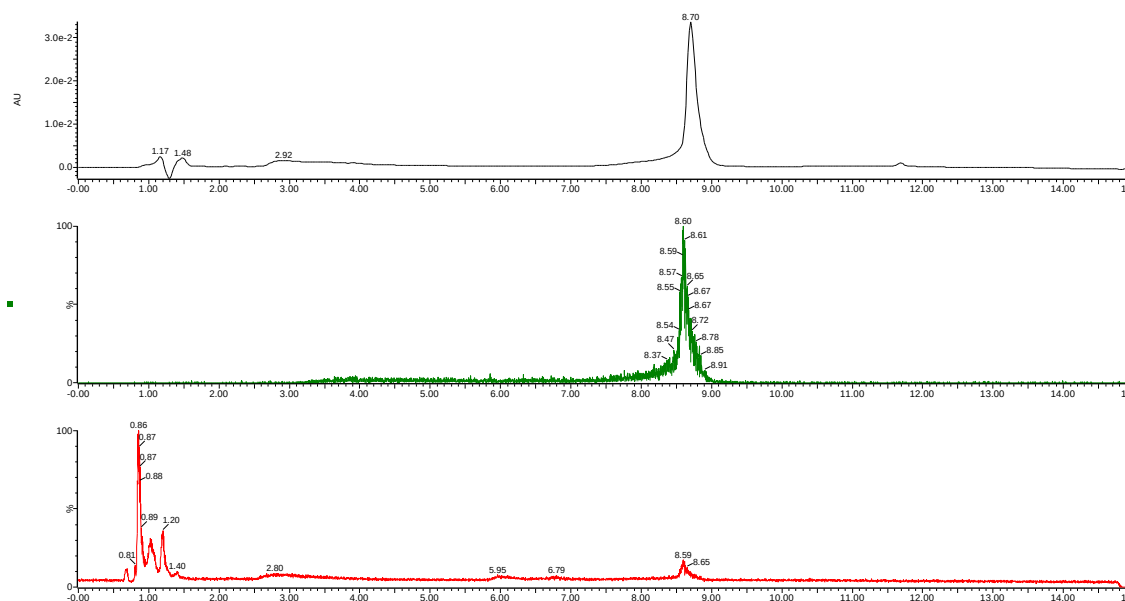


Figura 34 analisi HPLC-MS

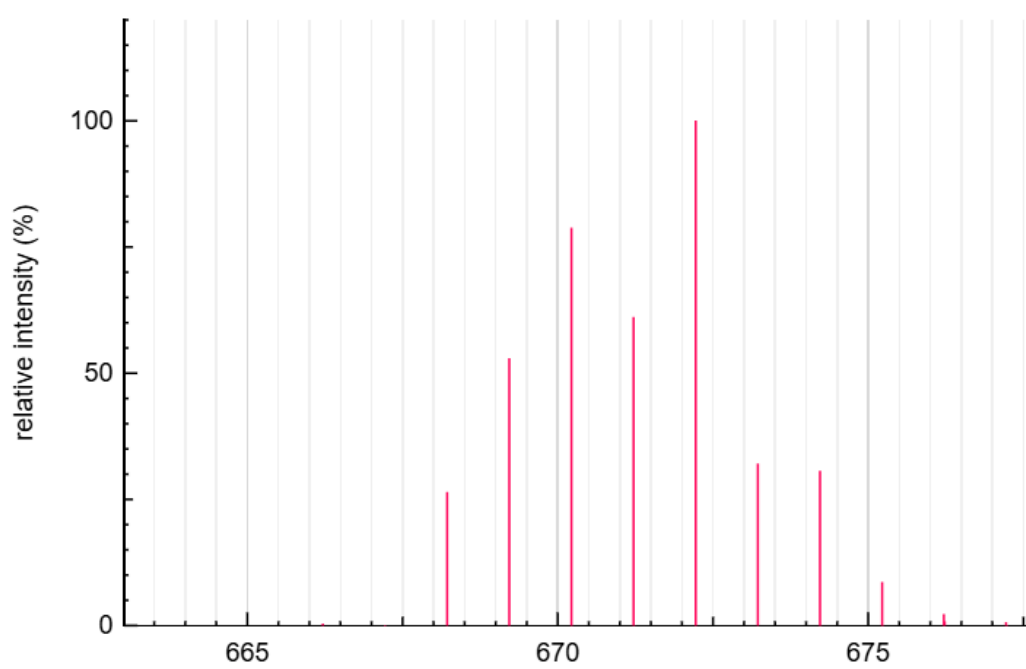


Figura 35 pattern isotopico teorico del complesso con Hg

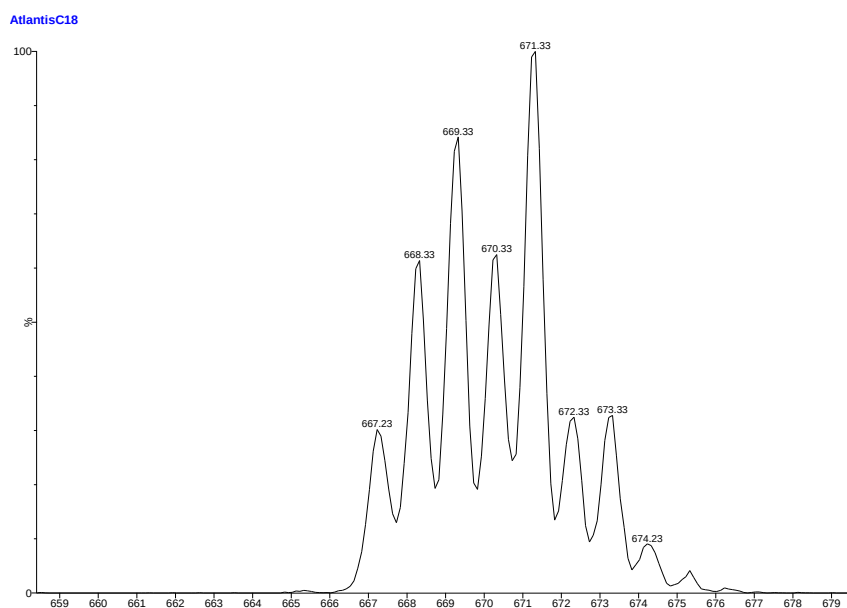
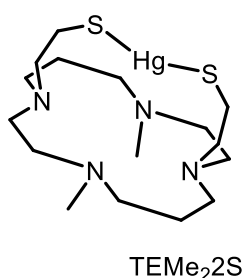
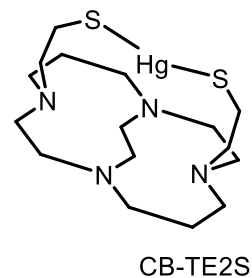
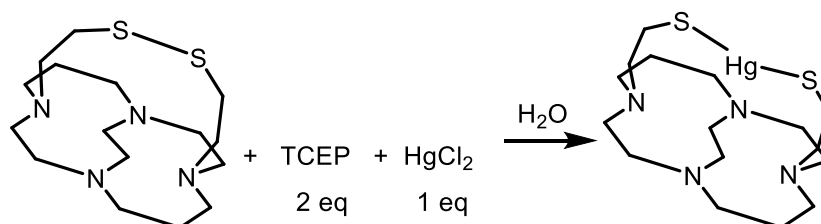


Figura 36 pattern sperimentale del complesso con Hg

11.2- Complessazione leganti TEMe_2S e $\text{CB-TE}_2\text{S}$



11.2.1 Complessazione legante $\text{CB-TE}_2\text{S}$ con Mercurio (II)

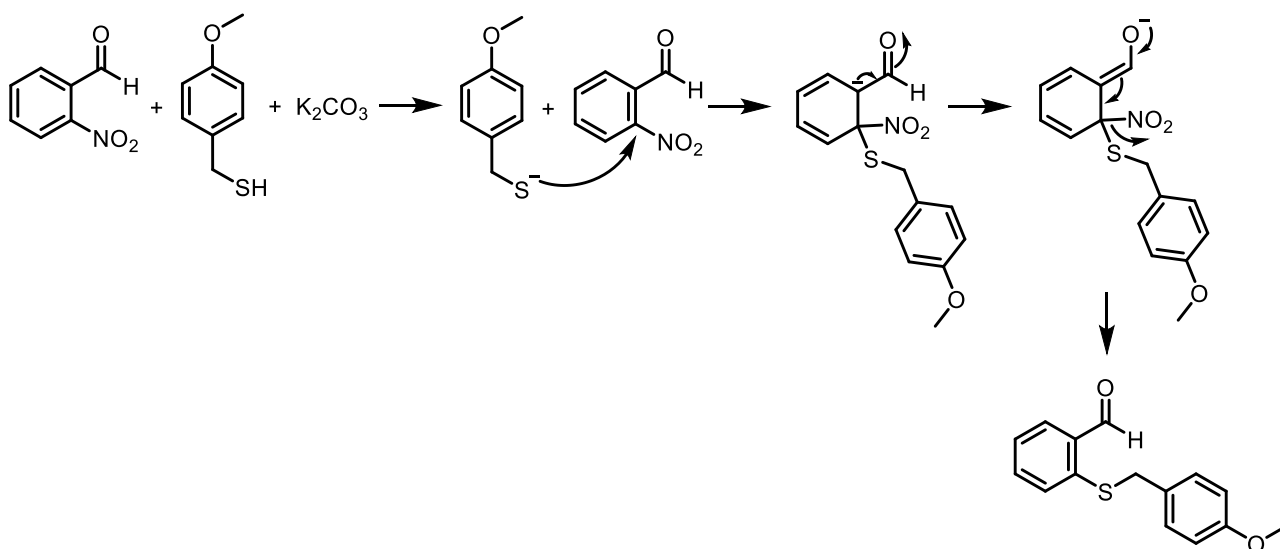


Il legante (circa 4 mg) lo si scioglie in acqua (350 μL). Si aggiunge un agente riducente, in questo caso Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) (circa 50 μL), con l'obiettivo di scindere il ponte disolfuro del legante. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente si aggiunge cloruro di mercurio (HgCl_2) disciolto in acqua (100 μL), in quantità equimolare al legante. La reazione viene mantenuta nelle medesime condizioni per 30 minuti a temperatura ambiente.

Capitolo 12-Risultati e discussione

12.1 Sintesi leganti TMe₂2SP e CB-TE2SP

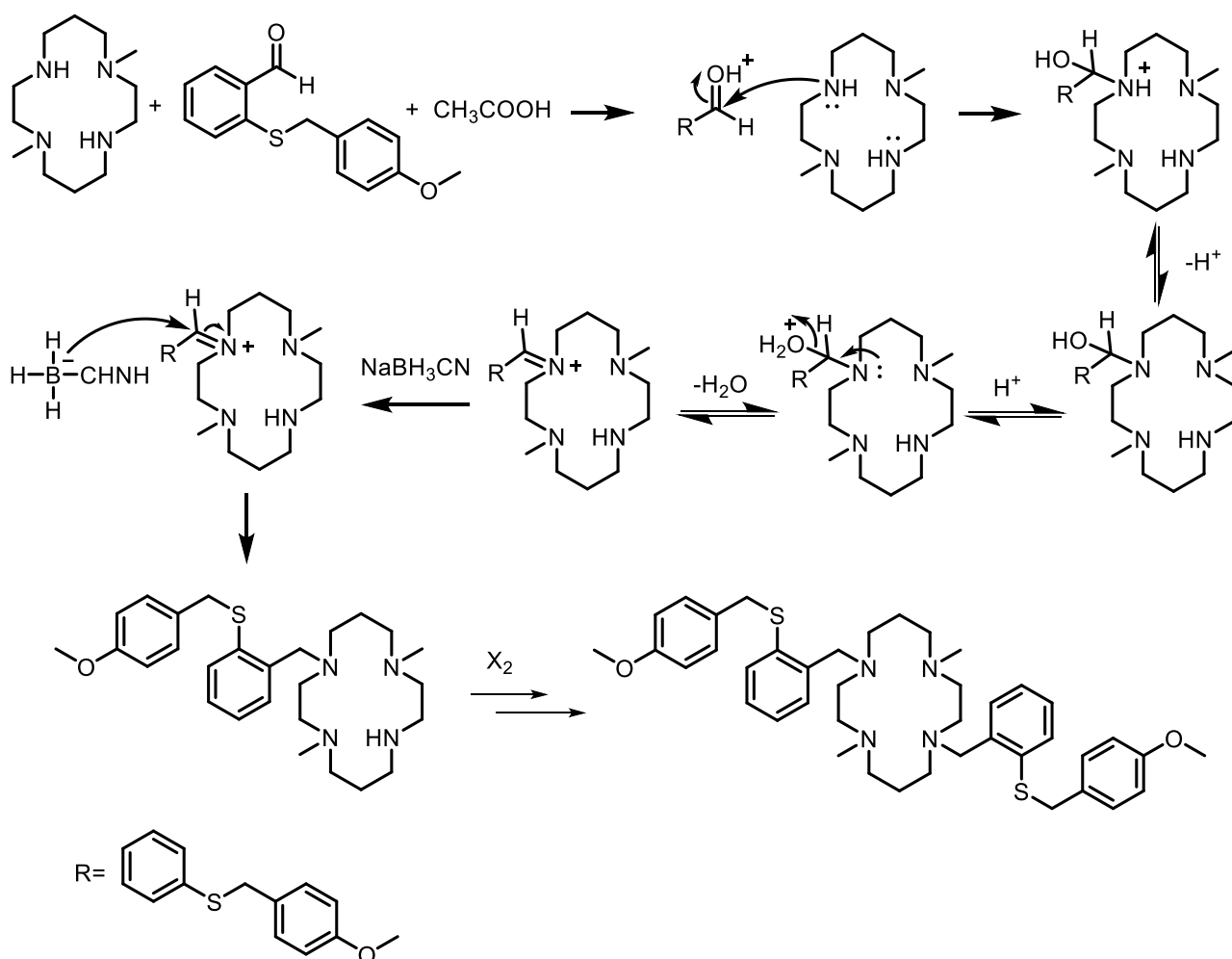
12.1.1 Sintesi 2-(4-metossibenzilsolfanil)-benzaldehyde



Il meccanismo attraverso cui il gruppo nitro della benzaldeide viene sostituito da un tiolo è una sostituzione nucleofila aromatica (S_NAr). Il tiolo viene deprotonato da una base presente nell'ambiente di reazione per generare lo ione tiolato. Il tiolato è un nucleofilo eccellente e molto reattivo grazie all'alta polarizzabilità dello zolfo. Lo ione tiolato attacca il carbonio aromatico (ipso) legato al gruppo nitro. Il doppietto elettronico dell'anello si delocalizza sul sistema aromatico, in particolare, sull'ossigeno del gruppo aldeidico che accetta la carica negativa tramite effetto mesomero elettrone-attrattore (risonanza). Si forma un intermedio anionico stabilizzato per risonanza, noto come complesso di Meisenheimer. Questo è il passaggio cineticamente più lento (stadio limitante della velocità).

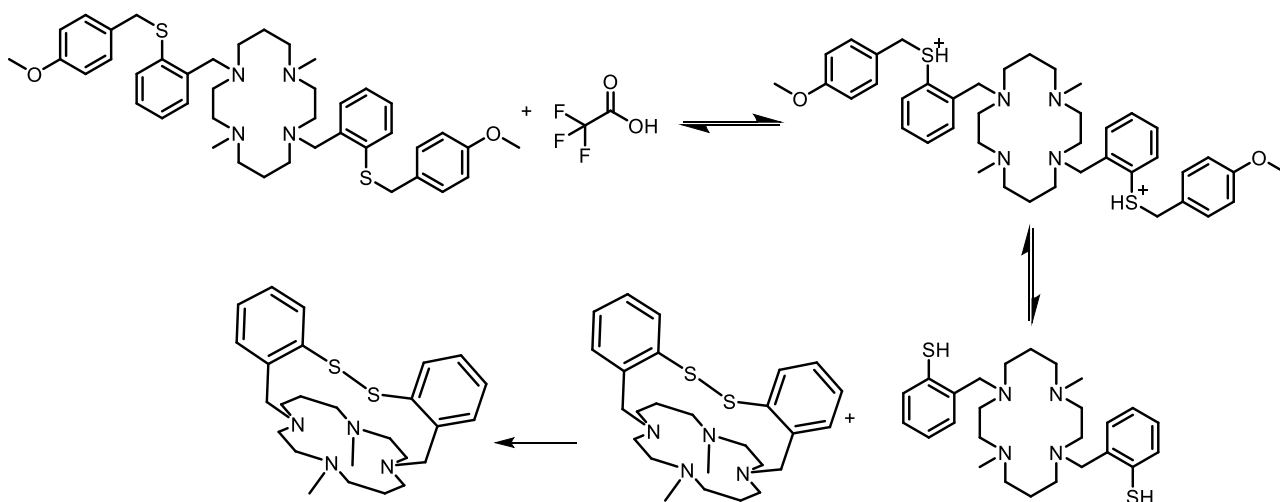
La carica negativa delocalizzata "ritorna" verso l'anello per ripristinare la stabilità aromatica. Durante questo processo, il gruppo nitro si stacca sotto forma di ione nitrito, che funge da gruppo uscente. Il risultato finale è la formazione di un legame stabile carbonio-zolfo, ottenendo un tioetere aromatico.

12.1.2 Sintesi TEme₂SP protetto



La reazione è un'amminazione riduttiva, in cui l'ammina secondaria attacca il carbonio carbonilico dell'aldeide (reso più elettrofilo grazie alla presenza dell'acido acetico), formando un'intermedio carbinolamminico instabile. L'intermedio perde una molecola d'acqua generando uno ione imminio che viene ridotto ad ammina grazie al sodiocianoboroidrurio (NaBH₃CN). Si usa NaBH₃CN in quanto riduce selettivamente lo ione imminio rallentando la riduzione dell'aldeide di partenza.

12.1.3 Deprotezione del TEme₂SP



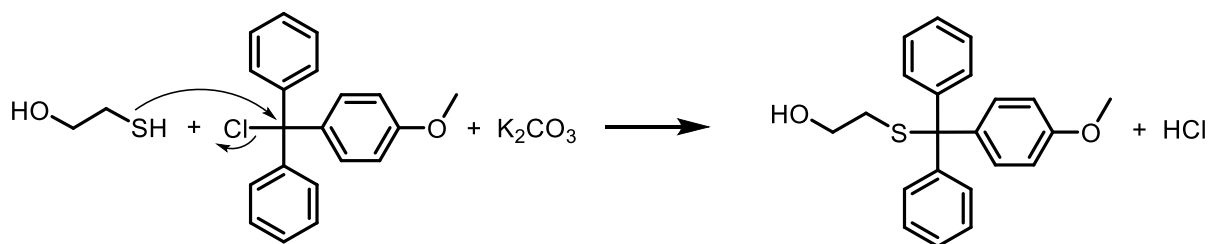
Il meccanismo di deprotezione prevede la protonazione dell'atomo di zolfo da parte dell'acido trifluoroacetico (TFA). In questo modo il gruppo protettivo diventa un ottimo gruppo uscente. Il legame carbonio-zolfo si rompe eteroliticamente, liberando il tiolo deprotezionato e generando un carbocatione molto reattivo. Per evitare che possa reagire nuovamente, si aggiunge alla miscela di reazione il triisopropilsilano (TIPS) che interviene neutralizzando il carbocatione formatosi precedentemente. Durante la reazione si è osservata la formazione di una miscela costituita da due specie, ovvero il legante contenente i tioli liberi e il legante caratterizzato dalla presenza del ponte disolfuro. Solo dopo alcuni giorni è stato possibile ottenere il legante completamente ossidato. Questo comportamento potrebbe essere attribuito alla parziale flessibilità del legante, che potrebbe impedire ai gruppi tiolici di avvicinarsi sufficientemente per favorire la formazione del ponte disolfuro.

Per quanto riguarda il legante CB-TE₂SP, il meccanismo di reazione risulta analogo a quello precedentemente descritto per il legante TEme₂SP; tuttavia, si è osservata una diversa velocità di formazione del prodotto finale. In particolare, si è riscontrata la formazione pressoché immediata della specie contenente il ponte disolfuro. Tale comportamento potrebbe essere attribuito alla maggiore rigidità strutturale del legante, determinata dalla presenza del ponte etilenico all'interno del macrociclo, che favorisce una maggiore vicinanza tra i gruppi tiolici. Questa maggiore vicinanza potrebbe facilitare la loro interazione e, di conseguenza, la formazione del ponte disolfuro.

12.1 Sintesi legante CB-TE2S

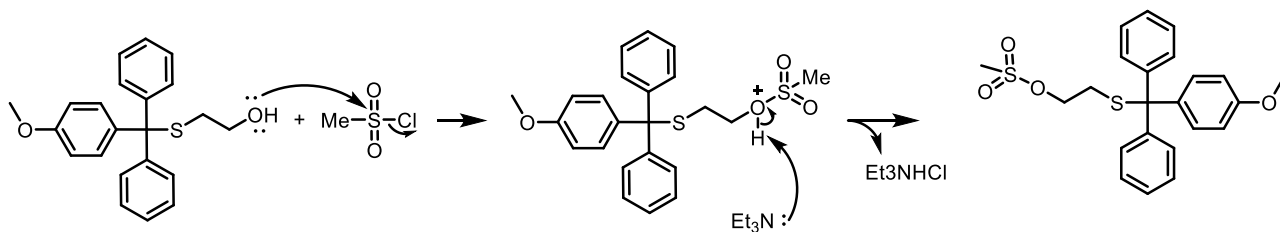
Per la sintesi dei chelanti TEme₂S e CB-TE2S, inizialmente si è valutata una strategia sintetica basata sulla costruzione diretta del macrobicciclo, o del triciclo nel caso del CB-TE2S, a partire da un derivato del Bis-(2-idrossietil)disolfuro. Sebbene la reazione di tosilazione sia avvenuta con successo, la successiva reazione che prevedeva la sintesi del macrobicciclo del TEme₂S non è andata a completezza. Si è pertanto deciso di adottare una strategia sintetica alternativa, che prevedesse l'introduzione di un gruppo protettore sui tioli. A tale scopo è stato scelto il gruppo metossitrile (MTT), caratterizzato dalla possibilità di essere rimosso selettivamente in condizioni acide blande.

12.2.1 Sintesi del 2-[[[(4-metossifenil)(difenil)metil]sulfanil]etanolo



La reazione di protezione avviene facendo reagire il tiolo con il 4-metossitrifenil cloruro, in presenza di una base (K₂CO₃) in modo da intrappolare l'acido cloridrico che si forma.

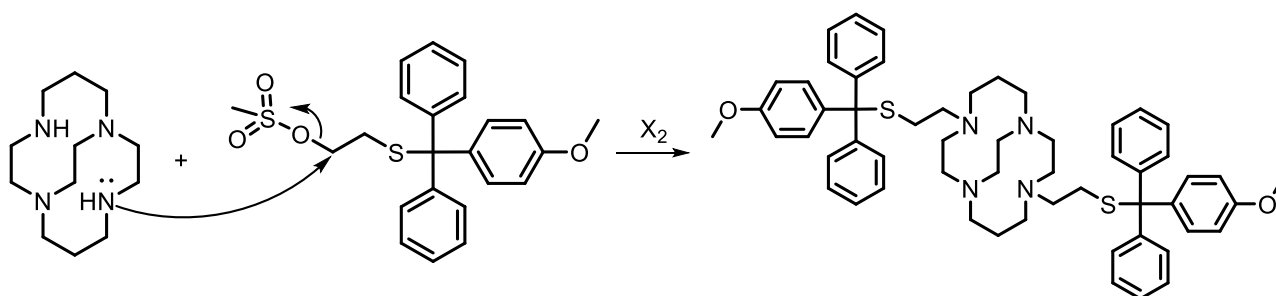
12.2.2 Sintesi del metansolfonato di 2-(((4-metossifenil)difenilmetil)tio)etile



Il meccanismo è una sostituzione nucleofila acilica in cui l'atomo di ossigeno dell'alcol, che

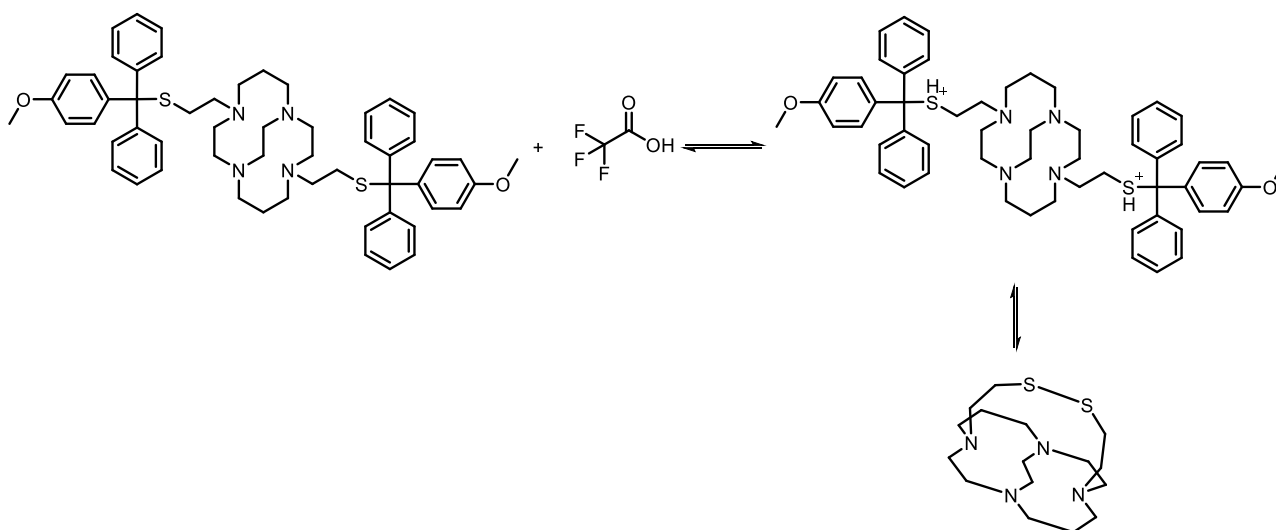
agisce da nucleofilo, attacca l'atomo di zolfo del gruppo mesilil cloruro (MsCl). Si rompe il legame zolfo-cloro con l'eliminazione di uno ione cloruro. La base (triethylammina) deprotona l'ossigeno dell'intermediario carico positivamente, formando il mesilato neutro stabile e il sale di ammonio.

12.2.3 Sintesi del legante CB-TE2S-protetto



La reazione segue un meccanismo di tipo S_N2 , il quale prevede un attacco nucleofilo da parte dell'ammina al carbonio elettrofilo vicino al gruppo uscente, in questo caso il mesilato. Contemporaneamente, si rompe il legame tra il carbonio e l'ossigeno del mesilato, con il distacco dello ione mesilato, che è un gruppo uscente stabile e debolmente basico.

12.2.4 Deprotezione del CB-TE2S



Il meccanismo di deprotezione prevede la protonazione dell'atomo di zolfo da parte dell'acido

trifluoroacetico (TFA). In questo modo il gruppo protettivo diventa un ottimo gruppo uscente. Il legame carbonio-zolfo si rompe etetolicamente, liberando il tiolo deprotetto e generando un carbocatione molto reattivo. Per evitare che possa reagire nuovamente, si aggiunge alla miscela di reazione il triisopropilsilano (TIPS) che interviene neutralizzando il carbocatione formatosi precedentemente.

Anche in questo caso, durante la reazione si è osservata la formazione immediata del legante contenente il ponte disolfuro. Tale comportamento potrebbe essere attribuito alla maggiore rigidità strutturale del legante, che favorisce una maggiore vicinanza tra i gruppi tiolici, facilitandone l'interazione e, di conseguenza, la formazione del ponte disolfuro.

Per questa via sintetica, la scelta del 4-metossitritile come gruppo protettore si è rivelata più vantaggiosa rispetto all'impiego del bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro). Ha infatti permesso di portare a termine la sintesi e di superare alcune delle principali problematiche riscontrate durante le prove sperimentali condotte con il bis-tosil-(2-idrossietil disolfuro). In particolare, nel corso della sintesi si osservato una progressiva diminuzione della solubilità, in quanto si è notata una tendenza a diventare più insolubile con il passare del tempo, dato da una possibile degradazione del prodotto. Inoltre, si era riscontrata una scarsa formazione di prodotto, evidenziata durante la fase di purificazione dal ridotto quantitativo di legante ottenuto. Inoltre l'impiego del gruppo 4-metossitritile per proteggere il mercaptoetanolo permette una deprotezione in condizioni più blande e facilitare una futura complessazione.

Per quanto riguarda la sintesi del legante TEMe_2S , nonostante si sia optato per la via sintetica che prevedeva l'uso del 4-metossitritile come gruppo protettore, non è stato possibile individuare condizioni di reazione ottimali. Pertanto, non si è riusciti a ottenere il prodotto finale. Tale esito è stato confermato anche dalle analisi HPLC-MS effettuate durante il monitoraggio della reazione, nelle quali non è stato osservato il picco caratteristico del prodotto atteso e neppure quello del mono-sostituito.

Capitolo 13-Metodi HPLC-MS

13.1.1 Metodo TEm₂SP protetto

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
TEm ₂ SP protetto	712	9.12

Tabella 4 R_f HPLC-MS

Tipo	XBridgePhenyl
Lunghezza	15 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	3.5µm

Tabella 5 caratteristiche colonna usata HPLC

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	90.0	10.0	1.5
2.00	90.0	10.0	1.5
14.50	0.0	100.2	1.5
15.00	0.0	100.0	1.5
15.01	0.0	100.0	1.5

Tabella 6 metodo HPLC-MS

13.1.2 Metodo TEm₂SP deprotezione

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
TEm ₂ SP	470	10.4

Tabella 7 R_f HPLC-MS

Tipo	AtlantisC18
Lunghezza	15 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 8 caratteristiche colonna HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	90.0	10.0	1.5
2.00	90.0	10.0	1.5
14.50	0.0	100.2	1.5
15.00	0.0	100.0	1.5
15.01	0.0	100.0	1.5

Tabella 9 metodo HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	90.0	10.0	17.00
2.00	90.0	10.0	17.00
15.00	0.0	100.2	17.00
17.00	0.0	100.0	17.00
18.00	90.0	10.0	17.00

Tabella 10 metodo HPLC-MS semi-preparativa

13.2.1 Metodo CB-TE2SP protetto

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
CB-TEMe ₂ SP protetto	710	11.2

Tabella 11 Rf HPLC-MS

Tipo	AtlantisC18
Lunghezza	15 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 12 caratteristiche colonna usata HPLC

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	60.0	40.0	1.5
2.00	60.0	40.0	1.5
14.50	0.0	100.2	1.5
15.00	0.0	100.0	1.5

15.01	0.0	100.0	1.5
-------	-----	-------	-----

Tabella 13 Metodo HPLC-MS

13.2.1 Metodo CB-TE2SP deprotezione

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
CB-TEMe ₂ SP protetto	468	11.67

Tabella 14 Rf HPLC-MS

Tipo	AtlantisC18
Lunghezza	15 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 15 caratteristiche colonna usata HPLC

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	80.0	20.0	1.5
2.00	80.0	20.0	1.5
14.50	0.0	100.2	1.5
15.00	0.0	100.0	1.5
15.01	0.0	100.0	1.5

Tabella 16 Metodo HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	80.0	20.0	17.00
2.00	80.0	20.0	17.00
15.00	0.0	100.2	17.00
17.00	0.0	100.0	17.00
18.00	90.0	10.0	17.00

Tabella 17 metodo HPLC-MS semipreparativa

13.3.1 Metodo CB-TE2S protetto

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
CB-TE2S-protetto	891	12.86

Tabella 18 Rf HPLC-MS

Tipo	XTerra C18
Lunghezza	10 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 19 caratteristiche colonna usata HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	90.0	10.0	1.0
2.00	90.0	10.0	1.0
14.50	0.0	100.2	1.0
15.00	0.0	100.0	1.0
15.01	0.0	100.0	1.0

Tabella 20 Metodo HPLC-MS

13.3.2 Metodo CB-TE2S deprotezione

Legante	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
CB-TE2S	344	11.50

Tabella 21 Rf HPLC-MS

Tipo	XTerra C18
Lunghezza	10 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 22 caratteristiche colonna usata HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	99.0	1.0	1.0
2.00	99.0	1.0	1.0
14.50	0.0	100.2	1.0
15.00	0.0	100.0	1.0
15.01	0.0	100.0	1.0

Tabella 23 Metodo HPLC-MS

12.4.1 Metodo Complessazione TEMe₂SP con Mercurio (II)

Complesso	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
TEMe ₂ SP-Hg	672	7.99

Tabella 24 Rf HPLC-MS

Tipo	XTerra C18
Lunghezza	10 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 µm

Tabella 25 caratteristiche colonna usata HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	90.0	10.0	1.0
2.00	90.0	10.0	1.0
14.50	0.0	100.2	1.0
15.00	0.0	100.0	1.0
15.01	0.0	100.0	1.0

Tabella 26 Metodo HPLC-MS

13.4.2 Metodo Complessazione CB-TE2SP con Mercurio (II)

Complesso	Peso molecolare	Rt (HPLC-MS)
CB-TE2SP-Hg	670	8.59

Tabella 27 Rf HPLC-MS

Tipo	XTerra C18
Lunghezza	10 mm
Diametro	4.6 mm
Particelle	5 μ m

Tabella 28 caratteristiche colonna usata HPLC-MS

Tempo (mins)	Acqua	ACN	Flusso (mL/min)
0.00	60.0	40.0	1.0
2.00	60.0	40.0	1.0
14.50	0.0	100.2	1.0
15.00	0.0	100.0	1.0
15.01	0.0	100.0	1.0

Tabella 29 Metodo HPLC-MS

Capitolo 14–Conclusioni

L'obiettivo della tesi, ovvero l'individuazione di una via sintetica per la preparazione dei leganti, è stato parzialmente raggiunto. Per quanto riguarda i due leganti contenenti braccia aromatiche, rispettivamente TEMe_2SP e $\text{CB-TE}_2\text{SP}$, le vie sintetiche proposte sono state portate a compimento con successo. Analogamente, anche per il legante alifatico $\text{CB-TE}_2\text{S}$, la strategia basata sull'impiego del gruppo protettore del tiolo 4-metossitritile si è rivelata la scelta ottimale. Invece, per il legante TEMe_2S non è stato possibile giungere all'individuazione di una via sintetica ottimale. I leganti ottenuti sono stati successivamente impiegati negli studi preliminari di complessazione con il mercurio (II). I complessi dei leganti TEMe_2SP e $\text{CB-TE}_2\text{SP}$ sono stati ottenuti e la loro formazione è stata confermata mediante analisi HPLC-MS. Al contrario, non è stata osservata la formazione del complesso con il legante $\text{CB-TE}_2\text{S}$.

Tra gli obiettivi futuri si valuterà una diversa via sintetica per il legante TEMe_2S , utilizzando l'etilenolfuro come alchilante e si cercherà di ottenere il complesso di Hg del legante $\text{CB-TE}_2\text{S}$. Un altro obiettivo sarà l'ottimizzazione delle condizioni di complessazione dei leganti TEMe_2S e $\text{CB-TE}_2\text{S}$, con metalli soft per cercare di traslare le condizioni di complessazione con isotopi naturali a condizioni di marcatura con i corrispondenti radioisotopi. Il lavoro sviluppato durante questo progetto di tesi offre la possibilità di ampliare la ricerca in ambito della medicina nucleare riguardante l'imaging e la terapia con radioisotopi soft.

Capítulo 15-Bibliografía

- (1) Neves, M.; Kling, A.; Oliveira, A. Radionuclides Used for Therapy and Suggestion for New Candidates. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2005**, 266 (3), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s10967-005-0920-5>
- (2) Nelson, B. J. B.; Andersson, J. D.; Wuest, F. Targeted Alpha Therapy: Progress in Radionuclide Production, Radiochemistry, and Applications. *Pharmaceutics* **2020**, 13 (1), 49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010049>
- (3) Sgouros, G. Alpha-Particles for Targeted Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60 (12), 1402–1406. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.007>
- (4) Lacoeyille, F.; Arlicot, N.; Faivre-Chauvet, A. Targeted Alpha and Beta Radiotherapy: An Overview of Radiopharmaceutical and Clinical Aspects. *Médecine Nucl.* **2018**, 42 (1), 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2017.12.002>
- (5) Hindié, E.; Larouze, A.; Alcocer-Ávila, M.; Morgat, C.; Champion, C. Palladium-103 ($^{103}\text{Pd}/^{103\text{m}}\text{Rh}$), a Promising Auger-Electron Emitter for Targeted Radionuclide Therapy of Disseminated Tumor Cells - Absorbed Doses in Single Cells and Clusters, with Comparison to ^{177}Lu and ^{161}Tb . *Theranostics* **2024**, 14 (11), 4318–4330. <https://doi.org/10.7150/thno.95436>
- (6) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (5), 1501–1516. <https://doi.org/10.1021/cr0782426>
- (7) Pysz, M. A.; Gambhir, S. S.; Willmann, J. K. Molecular Imaging: Current Status and Emerging Strategies. *Clin. Radiol.* **2010**, 65 (7), 500–516. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2010.03.011>
- (8) Livieratos, L. Basic Principles of SPECT and PET Imaging. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*; Fogelman, I., Gnanasegaran, G., van der Wall, H., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 345–359. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9_12
- (9) Sadeghi, M. M.; Glover, D. K.; Lanza, G. M.; Fayad, Z. A.; Johnson, L. L. Imaging Atherosclerosis and Vulnerable Plaque. *J. Nucl. Med.* **2010**, 51 (Supplement 1), 51S-65S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068163>
- (10) Al-Sharify, Z. T.; Al-Sharify, T. A.; Al-Sharify, N. T.; Yahya Naser, H. A Critical Review on Medical Imaging Techniques (CT and PET Scans) in the Medical Field. *IOP Conf.*

Ser. Mater. Sci. Eng. **2020**, 870 (1), 012043. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/870/1/012043>

(11) Kilicoglu, O.; Sepay, N.; Ozgenc, E.; Gundogdu, E.; Kara, U.; Alomairy, S.; Al-Buriahi, M. S. Evaluation of F-18 FDG Radiopharmaceuticals through Molecular Docking and Radiation Effects. *Appl. Radiat. Isot.* **2023**, 191, 110553. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2022.110553>

(12) Lu, F.-M.; Yuan, Z. PET/SPECT Molecular Imaging in Clinical Neuroscience: Recent Advances in the Investigation of CNS Diseases. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2015**, 5 (3), 433–447. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.03.16>

(13) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases.

(14) Han, B.; Weatherley, A. J.; Mumford, K.; Bolan, N.; He, J.-Z.; Stevens, G. W.; Chen, D. Modification of Naturally Abundant Resources for Remediation of Potentially Toxic Elements: A Review. *J. Hazard. Mater.* **2022**, 421, 126755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126755>

(15) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1: Fundamental Principles. *J. Chem. Educ.* **1968**, 45 (9), 581. <https://doi.org/10.1021/ed045p581>

(16) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part II: Underlying Theories. *J. Chem. Educ.* **1968**, 45 (10), 643. <https://doi.org/10.1021/ed045p643>

(17) Hancock, R. D.; Martell, A. E. Hard and Soft Acid-Base Behavior in Aqueous Solution: Steric Effects Make Some Metal Ions Hard: A Quantitative Scale of Hardness-Softness for Acids and Bases. *J. Chem. Educ.* **1996**, 73 (7), 654. <https://doi.org/10.1021/ed073p654>

(18) Winuprasith, T.; Koirala, P.; McClements, D. J.; Khomein, P. Emulsion Technology in Nuclear Medicine: Targeted Radionuclide Therapies, Radiosensitizers, and Imaging Agents. *Int. J. Nanomedicine* **2023**, Volume 18, 4449–4470. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416737>

(19) Chen, K.; Chen, X. Design and Development of Molecular Imaging Probes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10 (12), 1227–1236. <https://doi.org/10.2174/156802610791384225>

(20) Tosato, M.; Randhawa, P.; Asti, M.; Hemmingsen, L. B. S.; O'Shea, C. A.; Thaveenrasingam, P.; Sauer, S. P. A.; Chen, S.; Graiff, C.; Menegazzo, I.; Baron, M.; Radchenko, V.; Ramogida, C. F.; Di Marco, V. Capturing Mercury-197m/g for Auger

Electron Therapy and Cancer Theranostic with Sulfur-Containing Cyclen-Based Macrocycles. *Inorg. Chem.* **2024**, 63 (30), 14241–14255. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c02418>

(21) Naskar, N.; Lahiri, S. Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Front. Med.* **2021**, 8, 675014. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.675014>

(22) Pruis, I. J.; van Dongen, G. A. M. S.; Veldhuijzen van Zanten, S. E. M. The Added Value of Diagnostic and Theranostic PET Imaging for the Treatment of CNS Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (3), 1029. <https://doi.org/10.3390/ijms21031029>

(23) Tosato, M.; Franchi, S.; Dalla Tiezza, M.; Orian, L.; Gyr, T.; Alker, A.; Zanoni, G.; Pastore, P.; Andrighetto, A.; Köster, U.; Jensen, M.; Mäcke, H.; Asti, M.; Di Marco, V. Tuning the Framework of Thioether-Functionalized Polyazamacrocycles: Searching for a Chelator for Theranostic Silver Radioisotopes. *Inorg. Chem.* **2023**, 62 (50), 20777–20790. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c02456>

(24) Hrobárik, P.; Kaupp, M.; Riedel, S. Is Allred's [Hg(Cyclam)]³⁺ a True Mercury(III) Complex? *Angew. Chem.* **2008**, 120 (45), 8759–8761. <https://doi.org/10.1002/ange.200802233>

(25) Randhawa, P.; Olson, A. P.; Chen, S.; Gower-Fry, K. L.; Hoehr, C.; Engle, J. W.; Ramogida, C. F.; Radchenko, V. Meitner-Auger Electron Emitters for Targeted Radionuclide Therapy: Mercury-197m/g and Antimony-119. *Curr. Radiopharm.* **2021**, 14 (4), 394–419. <https://doi.org/10.2174/1874471014999210111201630>

(26) Randhawa, P.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Koniar, H.; Davey, P. R. W. J.; Chen, S.; Radchenko, V.; Ramogida, C. F. Quantitative Dual-Isotope Preclinical SPECT/CT Imaging and Biodistribution of the Mercury-197m/g Theranostic Pair with [197m/gHg]HgCl₂ and a [197m/gHg]Hg-Tetrathiol Complex as a Platform for Radiopharmaceutical Development. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2025**, 10, 67. <https://doi.org/10.1186/s41181-025-00391-2>

(27) Straathof, N. J. W.; Magnus, C. B.; Zhuravlev, F.; Jensen, A. I. Novel Bifunctional [16]aneS₄-Derived Chelators for Soft Radiometals. *Molecules* **2021**, 26 (15), 4603. <https://doi.org/10.3390/molecules26154603>

(28) Walker, A. N.; Ayala, M. A.; Mondal, S.; Bergagnini, M. C.; Bui, P. J. D.; Chidester, S. N.; Doeden, C. I.; Esjornson, L.; Sweany, B. R.; Garcia, L.; Krause, J. A.; Oliver, A. G.;

Prior, T. J.; Hubin, T. J. A Bridge Too Far? Comparison of Transition Metal Complexes of Dibenzyltetraazamacrocycles with and without Ethylene Cross-Bridges: X-Ray Crystal Structures, Kinetic Stability, and Electronic Properties. *Molecules* **2023**, *28* (2), 895. <https://doi.org/10.3390/molecules28020895>

(29) Kimura, S.; Bill, E.; Bothe, E.; Weyhermüller, T.; Wieghardt, K. Phenylthiyl Radical Complexes of Gallium(III), Iron(III), and Cobalt(III) and Comparison with Their Phenoxy Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (25), 6025–6039. <https://doi.org/10.1021/ja004305p>