UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

"AMEDEO AVOGADRO"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

Approcci sintetici innovativi a una sonda tetramerica paramagnetica per MRI

Relatore

Prof. Giovanni B. Giovenzana

Candidato

Andrea Cametti

Correlatori

Dr.ssa Camilla Cavallotti

Dr. Fabio Travagin

Anno Accademico 2023-2024

Sessione Straordinaria

Firmato digitalmente da Giovanni Battista Giovenzana
Data: 25.03.2025 16:15:27 CET
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

INDICE

ABBREVIAZIONI **1**

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE **3**

1.1 Diagnostica per immagini 3

1.2 Risonanza magnetica per imaging (MRI) 3

1.3 Principi base della risonanza magnetica nucleare (NMR) 6

1.3.1 Gradienti di campo 11

1.3.2 Il contrasto nelle immagini MRI 12

1.4 Agenti di contrasto per imaging a risonanza magnetica (MRI) 13

1.4.1 Complessi metallici 14

1.4.2 Complessi metallici paramagnetici come agenti di contrasto per MRI 17

1.5 Agenti chelanti 19

1.5.1 Tipologie di agenti chelanti 20

1.6 Agenti chelanti bifunzionali e complessi corrispondenti 24

1.7 Molecular imaging e relativi agenti di contrasto 27

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI **29**

CAPITOLO 3 - RISULTATI E DISCUSSIONI **31**

3.1 Introduzione 31

3.2 Progettazione e sintesi di una sonda alternativa 37

3.2.1 Approcci sintetici alternativi 42

3.2.2 Sintesi complesso finale 51

CAPITOLO 4 - CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI 53

CAPITOLO 5 - SEZIONE SPERIMENTALE 55

5.1 Materiali e metodi 55

5.2 Sintesi della molecola spacer 57

5.3 Sintesi del dimero paramagnetico bifunzionale simmetrico 67

CAPITOLO 6 - BIBLIOGRAFIA 81

RINGRAZIAMENTI 85

ABBREVIAZIONI

MI	*Molecular Imaging* (Imaging molecolare)
CT	*Computed Tomography* (Tomografia assiale computerizzata)
US	*Ultrasound* (Ultrasuoni/Ecografia)
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance* (Risonanza magnetica nucleare)
MRI	*Magnetic Resonance Imaging* (Risonanza magnetica per immagini)
CA	*Contrast Agent* (Agente di contrasto)
DOTA	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico
DOTAM	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico monoammide
DO3A	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triacetico
DTPA	Acido dietilentriamminopentaacetico
AAZTA	Acido 6-amino-6-metil-1,4-diazepan-*N,N',N'',N'''*-tetracetico
TEA	Trietilammina
DMF	*N,N*-Dimetilformammide
HBTU	(2-(1*H*-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato)

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Diagnostica per immagini

Le principali tecniche diagnostiche impiegate in clinica per l'ottenimento di immagini dell'organismo sono le seguenti:

- Risonanza magnetica per immagini (MRI)
- Tomografia assiale computerizzata (TAC)
- Tomografia a emissione di fotone singolo (SPECT)
- Tomografia a emissione di positroni (PET)
- Ecografia (US)
- Imaging ottico (OI)

Il lavoro di questa tesi si è focalizzato sulla Risonanza Magnetica per Immagini (MRI) e in particolare sull'approccio alla sintesi di nuovi agenti di contrasto per MRI.

1.2 Risonanza magnetica per imaging (MRI)[1]

La risonanza magnetica per *imaging* (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI), è una tecnica atta alla generazione di immagini tridimensionali ad alta risoluzione mediante l'utilizzo combinato di un intenso campo magnetico statico e di onde a radiofrequenze.
Viene usata prevalentemente a scopi diagnostici e in campo biomedico ed è basata sul principio fisico della risonanza magnetica nucleare (NMR).
Le immagini che si ottengono sono delle mappe tridimensionali la cui intensità di ogni *voxel* (unità di volume) dipendono dalla densità dei nuclei osservati, che nella totalità delle analisi cliniche attuali è il nucleo ^{1}H

(protone), principalmente presente sotto forma di acqua e in concentrazione minore nelle biomolecole.

Le onde che vengono utilizzate per la generazione delle immagini sono onde di frequenza radio, con una frequenza di almeno nove ordini di grandezza inferiori rispetto ai raggi X e γ che sono ionizzanti.[2,3]
Per questo motivo, la tecnica è particolarmente sicura per la salute del paziente dato che quest'ultimo non è sottoposto a radiazioni che possano provocare danni cellulari e in generale alle biomolecole.

L'ampio uso negli ultimi 40 anni della MRI ha promosso lo studio e lo sviluppo di un'importante classe di farmaci, quella degli agenti di contrasto.

Queste molecole grazie al loro paramagnetismo accelerano il tempo di rilassamento nucleare degli atomi di idrogeno delle molecole di acqua, amplificando il contrasto all'interno del tessuto biologico preso in esame, che si traduce in una migliore risoluzione delle immagini che vengono acquisite.
È dimostrato che il tempo di rilassamento dei nuclei di ^{1}H di un tessuto fisiologicamente sano è generalmente diverso rispetto a quello di un tessuto tumorale, permettendo di differenziarli nelle immagini MRI.
Inoltre si possono ricavare parametri importanti anche riguardo alla funzionalità di un organo preso in esame o ad esempio di quelli relativi al flusso ematico.

In questi ultimi decenni circa il 30% delle scansioni totali fatte con MRI e eseguite in strutture sanitarie si sono avvalse dell'utilizzo di agenti di contrasto, la quasi totalità dei quali basati su complessi di Gd(III).

Lo ione Gd(III) è fortemente paramagnetico, ha 7 elettroni spaiati e presenta un tempo di rilassamento elettronico ottimale per questa applicazione.

Grazie a queste caratteristiche è impiegato nella produzione di agenti di contrasto.

Nonostante queste ottime premesse, lo ione Gd(III), che *in vivo* è sotto forma di acquoione $[Gd(H_2O)_8]^{3+}$ mostra una marcata tossicità.
Per la somministrazione al paziente è necessario che il metallo sia complessato con forti chelanti organici in modo da sequestrarlo all'interno di una molecola stabile ed inerte e mitigarne in tal modo gli effetti indesiderati.

Sono richieste quantità abbastanza elevate (1-5 grammi) di complessi di Gd(III) per ottenere immagini del corpo umano con una risoluzione soddisfacente a causa della distribuzione dell'agente di contrasto nei diversi distretti corporei.

Una prima generazione di agenti di contrasto è rappresentata da complessi di Gd(III) inerti di basso peso molecolare, che si distribuiscono in modo non selettivo nel circolo sanguigno e nei tessuti, essendo poi rapidamente escreti per via renale.
Una seconda generazione di agenti di contrasto è costituita da complessi di Gd(III) progettati per essere più direzionabili nei vari tessuti, in modo tale da visualizzare con maggior contrasto determinati distretti corporei, e somministrarli in dose inferiore, riducendo proporzionalmente i possibili effetti collaterali.

1.3 Principi base della risonanza magnetica nucleare (NMR)[4]

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR, *nuclear magnetic resonance*) è una tecnica strumentale di analisi che, utilizza la differenza di energia presente nei vari stati di *spin* assunti da un nucleo quando questo è sottoposto ad un campo magnetico esterno. Questo permette di ottenere informazioni dettagliate riguardo alla struttura delle molecole in esame osservando il comportamento degli stessi nuclei atomici sottoposti al campo.

Si misura così l'assorbimento della radiazione della frequenza radio applicata, la quale, provoca transizioni di *spin* nucleare, in atomi come ^{1}H e ^{13}C.

Ponendo questi nuclei in un campo magnetico esterno con una intensità elevata (B_0) questi si disporranno in una orientazione parallela (livello a minore energia) o antiparallela (livello a maggiore energia) in risposta alle linee di forza impresse dal campo magnetico stesso.

L'intensità del campo magnetico va ad influire sul numero dei nuclei che si orienteranno nei due livelli mediante l'equazione di Boltzmann:

$$N_1/N_0 = \exp^{\Delta E/KbT}$$

Dove:

- N_1: numero di nuclei sul livello a energia più elevata
- N_0: numero di nuclei sul livello a energia più bassa
- ΔE: differenza energetica tra i due livelli
- K_b: costante di Boltzmann
- T: temperatura assoluta

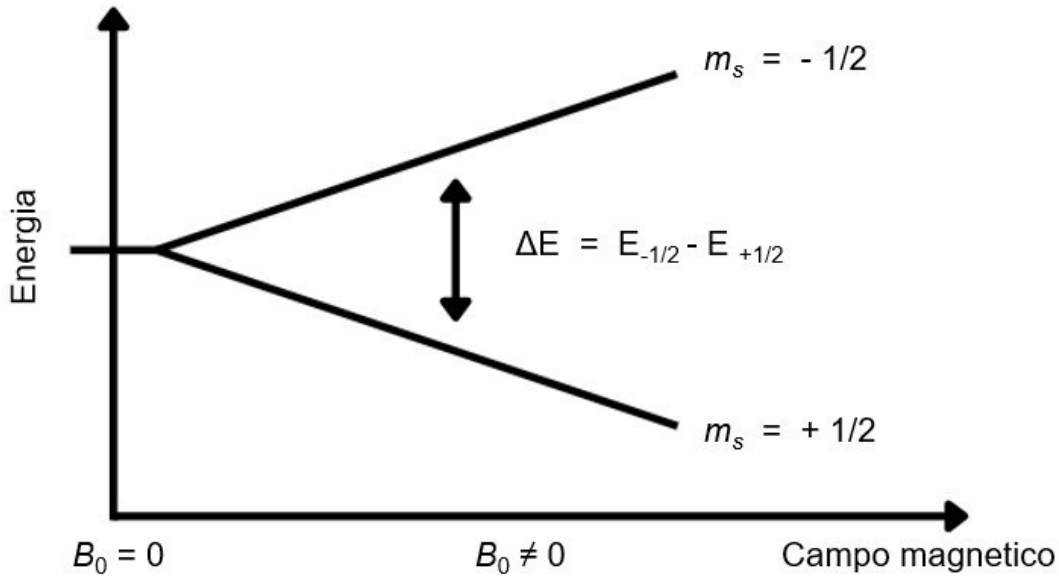


Figura 1.3.1: Livelli energetici di un nucleo a *spin* ½ in funzione del campo magnetico applicato

La figura 1.3.2 rappresenta la somma dei momenti magnetici che portano alla formazione della magnetizzazione macroscopica (M_0) ovvero un momento magnetico singolo.

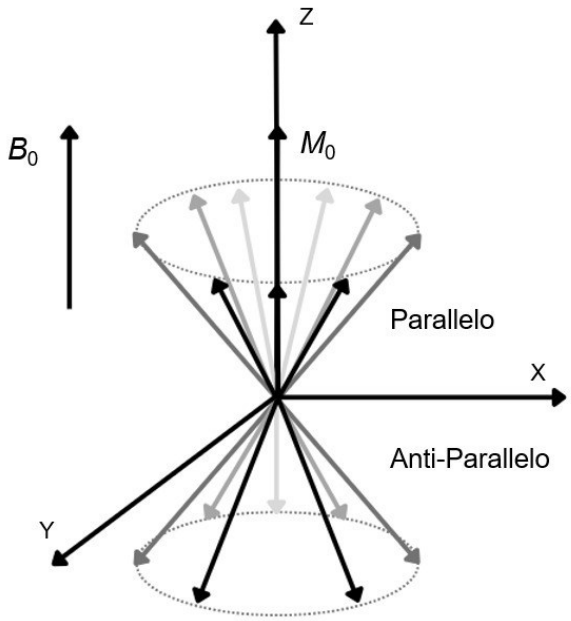


Figura 1.3.2 Coni di precessione di protoni immersi in un campo magnetico (B_0)

I nuclei compiono un movimento di precessione intorno alla direzione del campo magnetico.
Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari si svolge mediante una frequenza proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli, detta frequenza di Larmor:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

Dove:

- ω_0: velocità angolare di precessione (legata alla frequenza da questa relazione $\omega_0 = 2\pi\nu_0$)
- γ: costante giromagnetica, indica il rapporto tra il momento magnetico e il momento angolare intrinseco dello *spin*, diverso per ogni specie nucleare

Questa equazione spiega come nuclei diversi possono essere discriminati mediante la diversità delle frequenze di risonanza grazie alla variazione dell'intensità del campo magnetico.
Per poter originare questo evento si deve apporre sull'asse x un impulso di onde radio ad alta intensità per un limitato periodo (da 100 a 1000 MHz).
Si potrà ottenere, sia per gli *spin* energeticamente più bassi sia per quelli più alti, un'orientazione perpendicolare all'asse Z grazie all'assorbimento di energia da parte dei nuclei di ^1H, solo ed esclusivamente se la frequenza raggiunge dei valori uguali o nell'intorno della frequenza di Larmor di quei suddetti atomi.
Il numero di *spin* che possono raggiungere i livelli energetici più alti è proporzionale al tempo di durata dell'impulso stesso e alla sua potenza.
A questo fenomeno ne consegue una diminuzione e un successivo annullamento della magnetizzazione macroscopica sull'asse z, gli *spin*

infine procederanno in coordinazione conservando la medesima fase e la stessa velocità.
La magnetizzazione macroscopica netta si trasla dall'asse z al piano xy e ivi intercettata dal rivelatore di segnale elettromagnetico, l'impulso è anche detto di 90°.
La frequenza eguale a quella di Larmor invia al ricevitore un segnale elettrico, questo viene registrato sottoforma di intesità del segnale in funzione del tempo, questo segnale viene chiamato FID (*Free Induction Decay*), libero decadimento dell'induzione.

Con la tecnica NMR è possibile osservare solo i nuclei che possiedono un momento magnetico nucleare di *spin*, proprio perché solo questi si orienteranno al campo magnetico applicato.

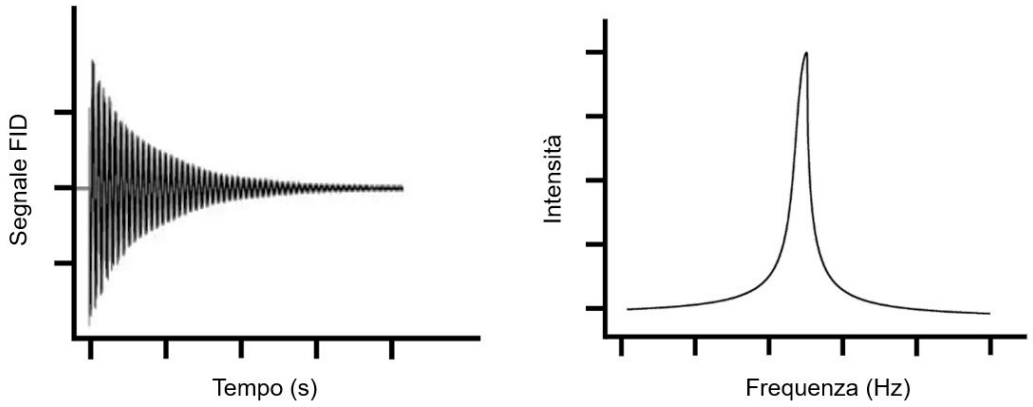


Figura 1.3.3 FID, trasformata di Fourier e spettro NMR

Mediante la trasformata di Fourier la risultante viene espressa in termini di intensità di segnale in funzione della frequenza, questo permette di passare da un grafico che è in funzione del tempo, ovvero il FID, a uno che è in funzione delle frequenze, il vero e proprio spettro NMR.
Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono contemporaneamente eccitati dall'impulso della frequenza radio contenente l'intero intervallo di frequenze necessario.

Al termine dell'impulso gli *spin* tornano al loro stato energetico basale, proprio durante il rilassamento l'energia accumulata viene rilasciata o verso l'ambiente molecolare oppure verso lo stato a energia maggiore.
Il rilassamento longitudinale T_1 dipende dall'intensità di B_0 ed consiste nel tempo necessario a ottenere il recupero, sull'asse z, della magnetizzazione macroscopica dopo la cessazione dell'impulso a 90°.
Nell'indagine NMR applicata alla diagnostica medica, il tempo di rilassamento T_1 è indicativo del tessuto in esame in cui sono immersi gli stessi atomi di idrogeno presi in esame.
Il secondo meccanismo che entra in campo è la perdita di coerenza di fase, ed è attribuibile all'interazione tra i campi magnetici statici dell'ambiente molecolare limitrofo e gli *spin* stessi.
Successivamente, il tempo T_2 è il tempo di rilassamento trasversale, non è dipendente dall'intensità stessa di B_0 e indica la quantità di tempo impiegata a perdere il segnale acquisito proveniente dall'impulso a 90°.
Gli elettroni di un atomo, trovandosi immersi in un campo magnetico, si disporranno in direzione del campo applicato.
Si viene a formare attorno al nucleo stesso un piccolo campo magnetico che si oppone al campo applicato esterno.
Il campo B del nucleo è più piccolo rispetto a quello di B_0, si possono esprimere con la seguente formula:

$$B = B_0 (1-\sigma)$$

Dove:
σ: costante di schermo

La nuvola elettronica di ogni nucleo in una determinata molecola cambia sia per la tipologia di nuclei in gioco che per i legami presenti all'interno della stessa molecola.
Inoltre, il B è diverso per ogni nucleo e ne determina il *chemical shift*, ovvero la frequenza di risonanza propria.

1.3.1 Gradienti di campo[5]

Nella pratica clinica per acquisire una immagine NMR di un determinato paziente bisogna indagare i nuclei, di solito quello che si esamina è il protone dell'acqua, dato che la popolazione di molecole di acqua all'interno del corpo è molto elevata.
I nuclei in analisi devono contenere le informazioni riguardanti la loro stessa posizione spaziale.
La tecnica di applicazione di un gradiente di campo è impiegata per ogni metodo MRI allo scopo di determinare la posizione del segnale. Essa consiste nel variare in modo lineare il campo magnetico attraverso il campione, provocando così un cambiamento anch'esso lineare della frequenza dei nuclei.
Applicando campi magnetici più piccoli, al campo magnetico principale per qualche millisecondo, si potrà ottenere in questo modo un gradiente di campo. Questo perché se si utilizzasse solo un campo omogeneo unico, tutti i nuclei risuonerebbero alla stessa frequenza, indipendentemente dalla loro posizione nel corpo. In questo modo si genera una differenza di *chemical shift*, proprio perché la frequenza di Larmor dei protoni sarà diversa in base alla loro locazione. Per discriminare i nuclei, è necessario ruotare il gradiente nelle tre direzioni (x, y, z) per poi successivamente individuarli nello spazio mediante le tre dimensioni.

$$B_{tot} = B_0 + G_{(x,y,z)}$$

In questo modo vengono registrati e raccolti più spettri del campione in esame grazie alla variazione della direzione dei gradienti stessi.
Questa operazione infatti, viene replicata e ripetuta per diverse volte modificando a turno uno dei gradienti.
Si procederà infine, dopo aver acquisito molte proiezioni, alla ricostruzione dell'immagine *in toto* del oggetto grazie alla diversità delle angolazioni da cui derivano le varie immagini che poi vengono unite.

Durante un esame MRI, il paziente è circondato da un campo magnetico statico e intenso B_0, al quale sono sovrapposti gradienti di campo variabili nello spazio e nel tempo. La frequenza di Larmor dei protoni dei vari distretti del corpo sarà quindi differente e funzione della loro diversa ubicazione spaziale. Questo procedimento permette di ottenere una mappa tridimensionale della densità dei protoni dell'organismo nei diversi punti dello spazio, dando origine all'immagine impiegata in ambito diagnostico.

1.3.2 Il contrasto nelle immagini MRI[6]

L'intensità del segnale NMR associata a ciascun *voxel* (elemento di volume, analogo tridimensionale del "*pixel*") viene rappresentata attraverso una scala di grigi. Ogni *pixel* può assumere diverse sfumature di grigio, esprimibili attraverso un numero. Il contrasto è determinato quantitativamente dalla differenza tra le intensità di *voxel* spazialmente vicini o confinanti. Ad esempio, se consideriamo l'intensità di due *voxel* adiacenti, possiamo dire che vi è contrasto tra di essi quando i loro valori numerici differiscono. Al contrario, se non si riscontra alcuna variazione tra le due intensità, il contrasto risulta assente.
Il contrasto permette di discernere e individuare due oggetti adiacenti e contigui ma con caratteristiche strutturali diverse. Ciò risulta fondamentale per individuare le informazioni anatomiche dell'organismo analizzato, e soprattutto cercare di differenziare un tessuto malato da uno che invece è fisiologicamente sano.

1.4 Agenti di contrasto per imaging a risonanza magnetica (MRI)

Un agente di contrasto impiegato per la MRI deve possedere delle caratteristiche sia chimico-fisiche che di biocompatibilità ben definite tra cui:

- Deve diminuire il tempo di rilassamento dei protoni delle molecole di acqua nell'organismo.

- Il farmaco formulato per l'analisi di risonanza magnetica deve essere il più possibile biocompatibile e atossico. L'eventuale tossicità deve essere indagata sia per le caratteristiche legate direttamente alla molecola stessa e alla specie paramagnetica ma anche per le modifiche farmacocinetiche metaboliche causate dall'assunzione *in vivo,* che possono portare a una tossicità secondaria.

- Deve possedere un'emivita abbastanza breve per evitare fenomeni di accumulo e per essere eliminato velocemente dopo il suo utilizzo diagnostico.

- Deve essere di facile preparazione e conservazione.

- Avere possibilmente una selettività tissutale in modo da dirigere l'agente di contrasto verso la zona da posta in esame, in modo da diminuire il dosaggio e i conseguenti possibili effetti avversi.

Queste caratteristiche sono possedute in particolare dai complessi di ioni metallici paramagnetici. Le proprietà magnetiche garantiscono l'effetto di rilassamento dei protoni delle molecole di acqua in cui si vengono a trovare, mentre l'elevata stabilità cinetica e termodinamica del complesso permettono di avere un profilo di sicurezza elevato nei confronti della tossicità determinata dallo ione metallico libero.

1.4.1 Complessi metallici[7]

I complessi metallici sono formati da un agente chelante (o “ligando”) in grado di interagire con uno ione metallico paramagnetico che viene intrappolato saldamente in una struttura tridimensionale simile ad una gabbia.

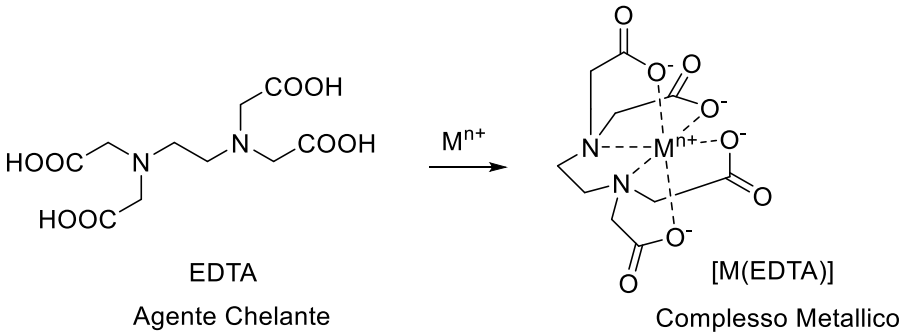


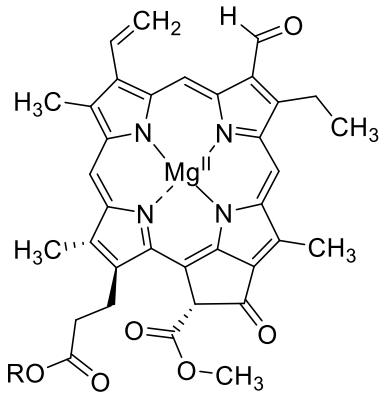
Figura 1.4.1 Agente chelante e formazione del complesso metallico

In un complesso, ogni ligando possiede uno o più doppietti elettronici liberi (gruppi donatori o “leganti”), il numero dei doppietti elettronici spaiati che il ligando utilizza per la coordinazione con il metallo viene definito denticità.
Quando il legante impiega solamente un gruppo donatore viene chiamato monodentato, quando invece ne utilizza più di uno definisce polidentato.
Il numero di legami tra il metallo e tutti i suoi leganti viene chiamato numero di coordinazione del complesso.
I composti di coordinazione possono essere sia complessivamente neutri che ionici in funzione della carica dello ione metallico e dell’agente chelante.

La costante di equilibrio termodinamica per questa reazione è definita come costante di formazione K_f del complesso:

$$M^{n+} + mL^{n-} \rightarrow ML \qquad K_f = [ML]/[M^{n+}][L^{n-}]^m$$

Complessi con una K_f elevata sono stabili chimicamente e possono essere adatti a un'applicazione in ambito farmaceutico o industriale.
Una cinetica di reazione veloce è importante per evitare tempi di reazione eccessivamente prolungati o per eludere condizioni di reazione difficili e poco applicabili su grandi quantità, mentre un cinetica di dissociazione lenta permette di mantenere l'integrità del complesso per tempi lunghi.
I complessi metallici sono comuni negli organismi viventi, un buon esempio è la clorofilla.



CLOROFILLA

Figura 1.4.2 Complesso metallico della clorofilla

La clorofilla è un pigmento di colore verde situato all'interno del cloroplasto delle piante, delle alghe e dei cianobatteri, è essenziale per il processo di fotosintesi, mediante il quale le piante utilizzano la luce per fissare anidride carbonica e da questa produrre glucosio e ossigeno.
La struttura tetrapirrolica della clorofilla condivide la via biosintetica con altri pigmenti presenti in altri sistemi viventi, come dle clorine e le porfirine.
La presenza del metallo permette alla struttura di rimanere rigida, questo è indispensabile per il funzionamento del meccanismo della fotosintesi.
Un altro esempio notevole di complesso metallico naturale è il gruppo eme, un importante complesso, che va a comporre l'emoglobina presente all'interno degli eritrociti. L'emoglobina è il pigmento rosso responsabile del colore del sangue e presenta diverse isoforme. L'emoglobina permette

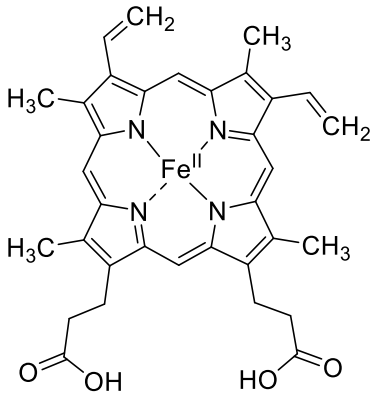
all'organismo di effettuare la respirazione aerobica grazie alla sua capacità di legare l'ossigeno.

L'eme è contenuto anche in altre proteine come nella mioglobina e nei citocromi P450, ed è membro della classe delle porfirine e contiene uno ione Fe^{2+}. Costituisce quello che è definito gruppo prostetico, ovvero la parte non proteica di una metalloproteina.

Più in dettaglio, questa metalloproteina è costituita da quattro catene polipeptidiche, ciascuna di esse contenente un gruppo eme il quale agisce come un ligando planare dianionico tetradentato.

Ogni ione Fe^{2+} del gruppo eme può espandere la sua sfera di coordinazione legandosi ad un atomo di ossigeno, questa interazione avviene perpendicolarmente rispetto all'anello aromatico planare della porfirina e solo in tessuti, come nei polmoni, dove è presente una elevata concentrazione di ossigeno.

La metalloproteina trasporta poi l'ossigeno nei tessuti periferici dove può infine liberare l'ossigeno legato in precedenza.



EME

Figura 1.4.3 Gruppo eme

1.4.2 Complessi metallici paramagnetici come agenti di contrasto per MRI[1,6]

I complessi metallici impiegati come agenti di contrasto per MRI devono possedere determinate caratteristiche, in particolare devono essere complessi paramagnetici.
Gli ioni metallici paramagnetici usati nella chimica di coordinazione sono situati all'interno dei blocchi *d* e *f* della tavola periodica. I metalli nel gruppo *d*, sono forti acidi di Lewis, ovvero accettori di doppietti elettronici, in grado di stabilire legami covalenti (dativi coordinati), con ioni o molecole che fungono da basi di Lewis, dunque da donatori di doppietti elettronici.
Molti complessi di metalli paramagnetici in possesso delle caratteristiche ideali di magnetismo sono però al contempo notevolmente tossici.
La sintesi di agenti chelanti in grado di formare complessi stabili permette di ridurre in modo rilevante la tossicità, modificandone però anche il comportamento chimico e in misura meno marcata in parte anche quello magnetico.
Il complesso metallico stesso può essere modificato per avere gruppi funzionali atti a direzionare la molecola in una sede specifica del corpo per il *targeting* molecolare.

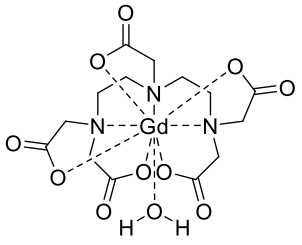
Gli elementi metallici che possono essere utilizzati nella sintesi di complessi paramagnetici utili come agenti di contrasto per MRI sono:

- **Gadolinio**: i complessi dello ione trivalente Gd^{3+} sono gli agenti di contrasto per MRI maggiormente utilizzati nella diagnostica clinica, con decine di milioni di dosi somministrate annualmente. Le proprietà magnetiche dello ione Gd^{3+} sono particolarmente favorevoli per questo specifico utilizzo diagnostico, ma la elevata tossicità di questo ione lantanoideo rende necessaria la formazione preliminare di un complesso estremamente stabile dal punto di vista termodinamico e cinetico.

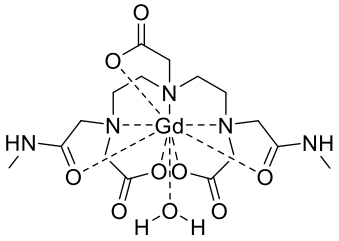
- **Manganese**:[8–10] I complessi dello ione Mn^{2+} sono efficaci nell'aumentare il contrasto nella MRI. Lo ione Mn^{2+} è fisiologicamente presente nell'organismo umano dove svolge il ruolo di cofattore di numerosi enzimi che catalizzano diversi processi biochimici nell'organismo. Nonostante ciò, è comunque necessario integrare lo ione Mn^{2+} in un complesso stabile per evitare squilibri metabolici nel caso di un suo utilizzo come agente di contrasto.

- **Ferro**:[11–13] elemento essenziale per l'organismo, nella forma di ione ferrico Fe^{3+} possiede, rispetto al Gd^{3+} caratteristiche magnetiche più modeste, ma ugualmente impiegabili per la preparazione di agenti di contrasto per MRI. La minore tossicità di questo ione, l'abbondanza naturale dell'elemento e l'ampia conoscenza della sua chimica di coordinazione lo rendono un candidato ideale per lo sviluppo di futuri agenti di contrasto per MRI.[14]

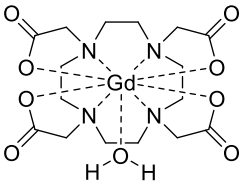
Gli agenti di contrasto paramagnetici impiegati nella MRI clinica sono principalmente a base di gadolinio e sono riportati in Figura 1.4.4.[1]



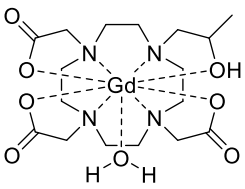
Gd-DTPA (acido gadopentetico)



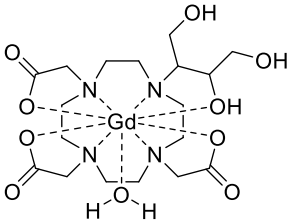
Gd-DTPA-BMA (gadodiamide)



Gd-DOTA (acido gadoterico)



Gd-HPDO3A (gadoteridolo)



Gd-DO3A-butrolo (gadobutrolo)

Figura 1.4.4 Agenti di contrasto utilizzati in clinica MRI

L’acido gadopentetico (Gd-DTPA) e la gadodiamide (Gd-DTPA-BMA) sono stati tra i primi complessi paramagnetici approvati per l’utilizzo *in vivo*, ma la struttura aciclica dell’agente chelante ne determina una bassa stabilità termodinamica, che porta al lento rilascio dello ione metallico, con effetti potenzialmente tossici. Questi agenti di contrasto non sono più utilizzati, lasciando spazio ai soli complessi formati con agenti chelanti macrociclici, come l’acido gadoterico (Gd-DOTA), il gadoteridolo (Gd-HP-DO3A) e il gadobutrolo (Gd-DO3A-butrolo), che sono caratterizzati da una maggiore stabilità chimica e da una minore potenziale tossicità da rilascio dello ione metallico.

1.5 Agenti chelanti[15]

La parola "chelare" proviene dall’antico greco e si riferisce alle chele possedute dai crostacei. Mediante i loro arti a forma di tenaglia, questi animali possono raccogliere e procurarsi il cibo e possono inoltre utilizzarli per scopi difensivi.

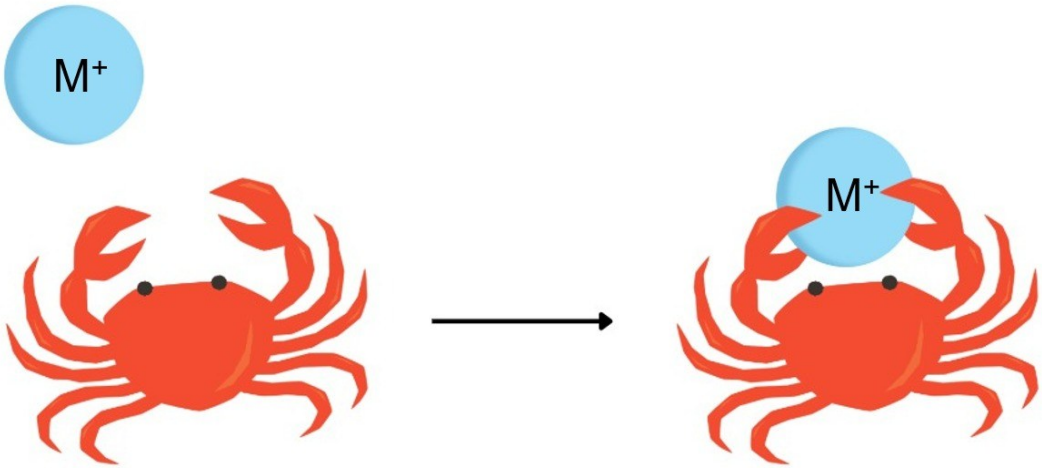


Figura 1.5.1 Esempio del meccanismo di azione di un agente chelante

Per analogia il termine è stato mutuato anche nella chimica. Un agente chelante infatti è un composto nel quale sono presenti due o più siti di legame all'interno della stessa molecola, che interagiscono e legano lo ione

metallico grazie ai doppietti elettronici liberi, per formare multipli legami di coordinazione.
Un agente chelante può essere classificato mediante il parametro della denticità, ovvero il numero di gruppi donatori che sono insiti nella molecola e che possono interagire con lo ione metallico.
Una ulteriore suddivisione nella classificazione può essere basata sulla struttura chimica dell'agente chelante o sulla tipologia dei gruppi donatori espressi dal legante stesso.

1.5.1 Tipologie di agenti chelanti[15]

Classificando gli agenti chelante attraverso la loro struttura base, si possono individuare tre famiglie principali:

- **Agenti chelanti aciclici:** sono la prima generazione di agenti chelanti di sintesi e sono costituiti da una struttura lineare o ramificata aciclica e sono i primi in ordine cronologico ad essere stati sintetizzati e commercializzati. Un esempio caratteristico di questa classe è l'EDTA, l'acido etilendiamminotetraacetico. L'EDTA si presenta come un solido bianco che è ben solubile in acqua e può interagire con buona parte dei metalli della tavola periodica formando dei complessi, ad esclusione per i metalli alcalini. Industrialmente, la sintesi dell'EDTA e dei suoi successivi derivati è composta da due reazioni, il primo passaggio è una reazione di cianometilazione sulla etilendiammina, conseguente a questa, si procede all'idrolisi dei gruppi nitrilici e alla produzione dell'EDTA in forma di sale tetrasodico. Negli anni è diventando l'agente chelante sintetico più utilizzato sul mercato sia per applicazioni farmaceutiche che a livello industriale. Questo agente chelante è in grado di interagire con diversi ioni metallici tramite la sua forma anionica ($EDTA^{4-}$), con la formazione di complessi esadentati aventi una geometria ottaedrica.

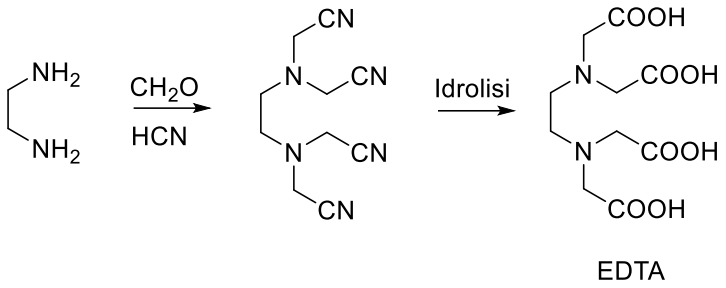


Figura 1.5.2 Schema di sintesi dell'EDTA

Il medesimo processo di sintesi viene applicato anche ad altri chlanti aciclici, tra i quali è possibile citare l'agente chelante tetradentato acido nitrilotriacetico (NTA) e l'agente chelante ottadentato acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA).

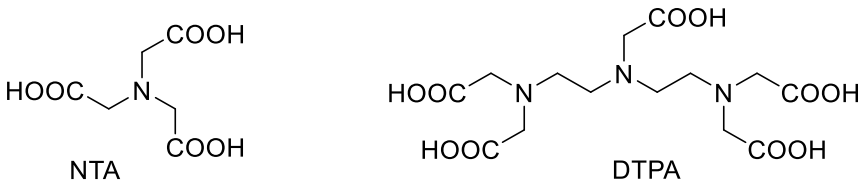


Figura 1.5.3 Struttura di NTA e DTPA

- **Agenti chelanti macrociclici**: sono caratterizzati da una struttura ciclica, con un anello di atomi (di carbonio e non) di dimensione non inferiore a 9 atomi. L'anello macrociclico rende rigida la molecola, permettendo di formare dei complessi particolarmente stabili. Per questo motivo gli agenti chelanti macrociclici rappresentano la prima scelta nella sintesi di complessi con ioni lantanoidi (come Gd^{3+}) per un successivo impiego e utilizzo in diagnosi, come per PET e MRI. La sintesi di agenti chelanti macrociclici richiede però numerosi passaggi sintetici e conseguenti purificazioni, anche spesso complessi, che aumentano i tempi e i costi di produzione. Inoltre, la formazione di questi complessi metallici è caratterizzata da una cinetica di reazione abbastanza lenta, che comporta la necessità di tempi lunghi (ore/giorni) e condizioni spinte per la reazione di

formazione del complesso vero e proprio, che possono risultare dannose per la stabilità chimica dei ligandi stessi.

Uno dei ligandi macrociclici più utilizzati è l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA)[16] il cui complesso di Gd(III) viene impiegato come agente di contrasto in diagnosi clinica.[17] Il DOTA è un agente chelante ottadentato, basato su una struttura anulare a 12 atomi di carbonio e possiede un totale di otto gruppi donatori: quattro gruppi carbossilici e quattro ammine terziarie, che possono contribuire tutti o in parte, a coordinare lo ione metallico posto al centro.

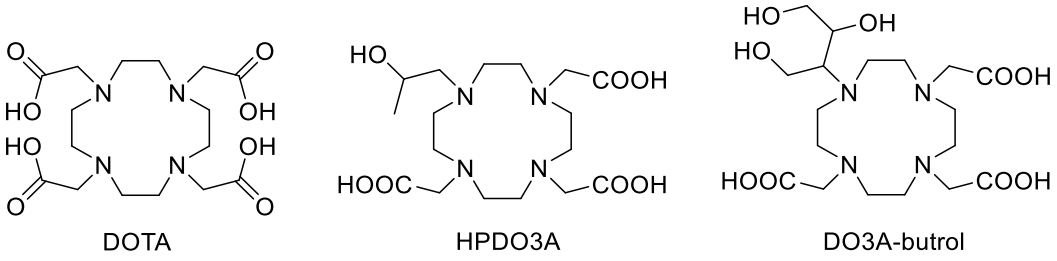


Figura 1.5.4 Struttura di DOTA, DO3A e HPDO3A

Le abilità complessanti particolarmente spiccate di DOTA ne hanno determinato la preparazione di numerosi analoghi. Tra essi è possibile citare l'idrossipropil-DO3A (HP-DO3A) e il derivato butantriolico DO3A-butrol, usati per la preparazione di complessi di Gd^{3+} impiegati per la diagnostica clinica come agenti di contrasto per MRI.[1]

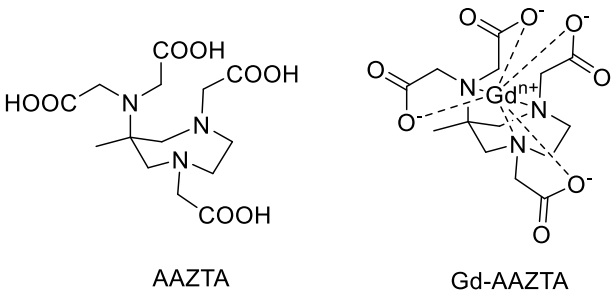
- **Agenti chelanti mesociclici**:[18] questa famiglia di agenti chelanti sono composti da un anello formato dai 5 agli 8 atomi (di carbonio e non).

  Rappresentativo per questo tipo di complessi è l'acido 6-amino-6-metil-1,4-diazepan-*N,N',N'',N'''*-tetracetico (AAZTA),[19] utilizzato come agente di contrasto in clinica diagnostica PET, SPECT e MRI. Composto da quattro gruppi carbossilici e tre atomi di azoto che partecipano all'interazione, è un legante eptadentato, che può

formare complessi stabili con molti ioni metallici diversi, tra cui quelli della serie dei lantanoidi.

Nel caso del complesso $[Gd(AAZTA)]^-$, questo dimostra, in soluzione acquosa, una buona stabilità termodinamica, una discreta inerzia riguardo a composti endogeni quali anioni bidentati e infine una elevata rilassività (parametro che misura l'efficienza dell'agente di contrasto).[Q]

La struttura di AAZTA è modificabile, si possono introdurre gruppi funzionali reattivi al suo interno che possono essere utilizzati per legare delle molecole vettore, consentendo, anche per questo tipo di complesso, la formazione di agenti chelanti bifunzionali.[20]



AAZTA Gd-AAZTA

Figura 1.5.4 Struttura di AAZTA e del complesso Gd-AAZTA

1.6 Agenti chelanti bifunzionali e complessi corrispondenti[21,22]

Le molteplici applicazioni dei complessi metallici in numerosi ambiti scientifici e tecnologici hanno fatto emergere la necessità di legare tali composti ad altre molecole. La formazione di un legame stabile tra un complesso metallico permette ad esempio di immobilizzarlo sulla superficie di un materiale o di una nanoparticella, oppure di congiungerlo ad una molecola "vettore" che abbia il compito di direzionare il complesso verso un bersaglio molecolare specifico.

A tale scopo sono quindi stati progettati e sviluppati diversi agenti chelanti cosiddetti "bifunzionali" (BFCA, *bifunctional chelating agents*) riportati in Figura 1.6.1. La funzione principale di queste molecole rimane quella di coordinare stabilmente uno ione metallico; la seconda funzione è tipicamente svolta da un gruppo funzionale reattivo, posizionato in modo tale da non disturbare la coordinazione dello ione metallico.

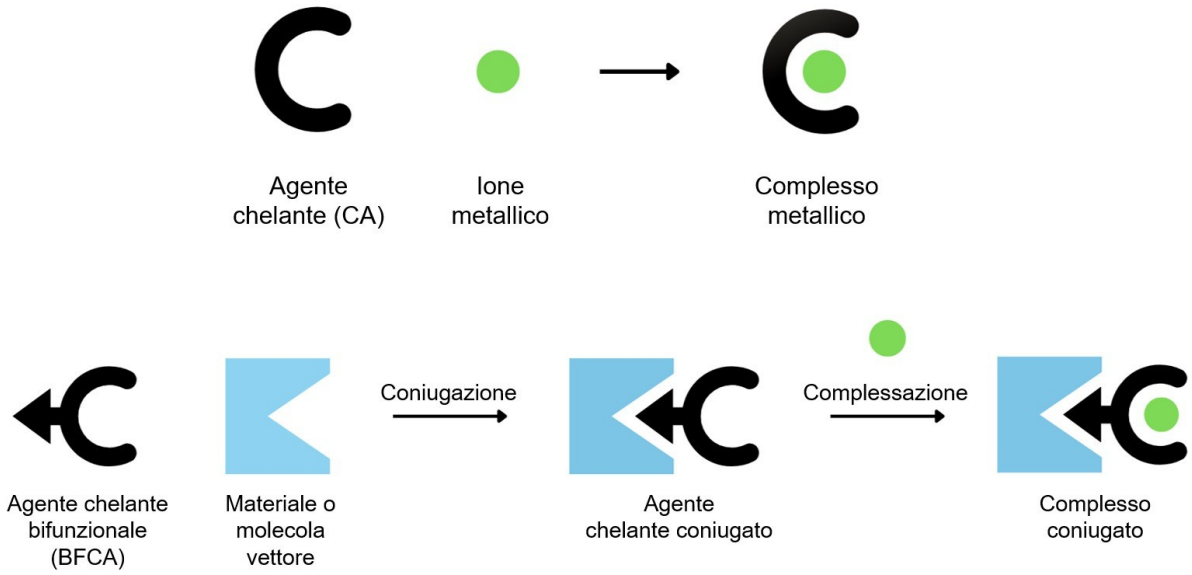


Figura 1.6.1 Formazione di un complesso coniugato

I BFCA sono generalmente costituiti da una struttura base derivante da un agente chelante classico, sul quale è installato un residuo contenente un gruppo funzionale agevolmente coniugabile, solitamente rappresentato da un gruppo amminico, carbossilico, maleimmidico o isotiocianato.

Alcuni esempi di BFCA sono riportati in Figura 1.6.2, nella quale sono evidenziati in colori distinti la porzione molecolare relativa alla funzione chelante (verde) e il residuo contenente il gruppo funzionale reattivo (rosso). I BFCA possono essere derivati da leganti aciclici, macrociclici e mesociclici. I due BFCA aciclici riportati in Figura 1.6.2 derivano dall'agente chelante DTPA e recano rispettivamente un gruppo remoto carbossilico e un isotiocianato. I BFCA macrociclici più comuni derivano dall'agente chelante DOTA e nel caso del DO3A un braccio acetico è rimosso per riservare un gruppo amminico secondario per una ulteriore funzionalizzazione mediante alchilazione. In alternativa un gruppo carbossilico di DOTA è impiegato per formare un legame ammidico con una catena alifatica recante un gruppo ω-amminico (DOTAM-pn)[23] o ω-maleimmidico (DOTAM-En-Mal),[24] quest'ultimo coniugabile attraverso reazioni di addizione di Michael. La formale ammidazione di DOTA con propargilammina porta a un derivato contenente un gruppo alchinico terminale, coniugabile mediante reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolare catalizzate da rame ("*click chemistry*").[25]

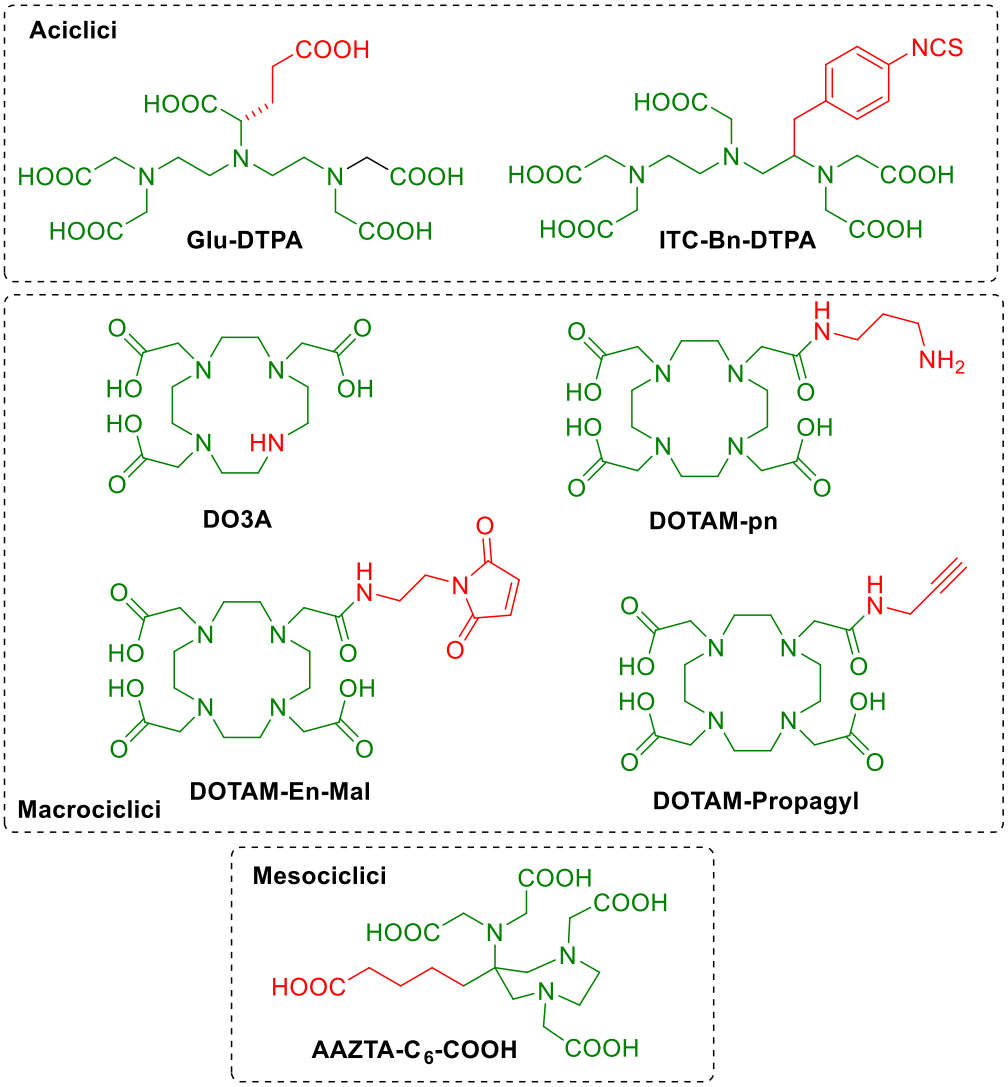


Figura 1.6.2 Esempi di BFCA

Anche nella famiglia dei leganti mesociclici sono stati recentemente introdotti e impiegati per reazioni di coniugazione diversi BFCA, tra cui si riporta a titolo di esempio il derivato ω-carbossilico AAZTA-C_6-COOH.[26]

1.7 Molecular imaging e relativi agenti di contrasto

Con il termine di "*Molecular Imaging*"[27] si indica l'applicazione di una delle varie tecniche diagnostiche per rendere visibili i processi biologici che avvengono a livello cellulare e molecolare in un organismo vivente, finalizzata a una diagnosi estremamente selettiva e precoce di diverse patologie.

Il *Molecular Imaging* è reso possibile dall'impiego di sonde diagnostiche coniugate a molecole vettrici, queste ultime impiegate per direzionare la sonda diagnostica presso un distretto corporeo specifico e per garantire una risposta modulabile in funzione di specifiche condizioni fisiche, chimiche o biologiche.

Molte sonde diagnostiche sono rappresentate da agenti metallici, e per questo motivo gli agenti chelanti bifunzionali descritti nel paragrafo precedente sono particolarmente preziosi per lo sviluppo di sonde coniugate a specifici vettori molecolari.

Un esempio di sonda coniugata per *Molecular Imaging* è rappresentato dal [^{68}Ga]-Ga-DOTA-TOC[28] (Figura 1.7.1), nel quale un complesso dell'isotopo emettitore di positroni ^{68}Ga è coniugato a un peptide ciclico in grado di legarsi selettivamente ai recettori della somatostatina, sovraespressi in particolari tipi di tumori neuroendocrini. L'impiego di [^{68}Ga]-Ga-DOTA-TOC è stato approvato dall'EMA nel 2016 e dall'FDA nel 2019, consentendo una diagnosi estremamente selettiva di questo particolare tipo di tumori particolarmente aggressivi.

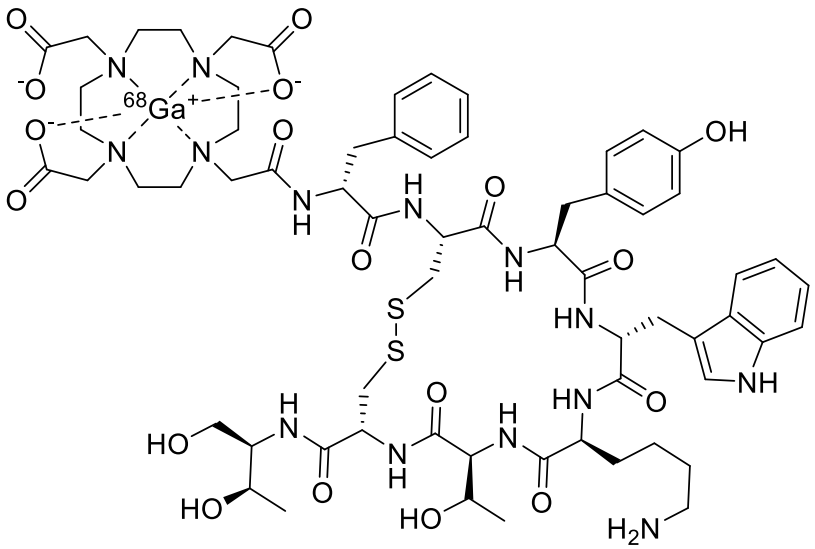


Figura 1.7.1 Sonda coniugata, composta dal radionucleotide ^{68}Ga, dal DOTA e dall'ocreotide

La ricerca di sonde per *Molecular Imaging* investe anche le altre tecniche diagnostiche, con diversi studi dedicati alla possibilità di coniugare sonde per *Optical Imaging*, sfociate nella recente approvazione della pegulicianina per la diagnostica del tumore alla mammella.[29]

Numerosi studi sono stati inoltre concentrati sulla possibilità di sviluppare sonde diagnostiche per *Molecular Imaging* basate sulla MRI, ambito nel quale si localizza questo specifico lavoro di tesi.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Il lavoro di questa tesi ha come obiettivo lo studio e l'eventuale sviluppo di un approccio sintetico alternativo a una sonda MRI per *Molecular Imaging*. Un gruppo di ricerca dell'Università del Piemonte Orientale ha recentemente sviluppato una sonda MRI in grado di legarsi selettivamente alla tropoelastina e di visualizzare con successo le placche aterosclerotiche nelle quali questa proteina si accumula, aumentandone l'instabilità.[30]

La sonda MRI impiegata per questo studio è un esempio di sistema coniugato, composto da un complesso metallico paramagnetico, che svolge la funzione attiva di agente di contrasto per MRI, del peptide vettore, deputato al direzionamento dell'intero coniugato sulla proteina *target*, e delle unità *linker* e *spacer* necessarie per collegare le porzioni molecolari garantendo l'integrità, la funzionalità e la solubilità del sistema completo.

La tecnica MRI è intrinsecamente meno sensibile rispetto alle tecniche di medicina nucleare e di *optical imaging*. Per questo motivo la sonda sviluppata comprende quattro unità identiche di complesso paramagnetico come rappresentato in Figura 2.1 che, moltiplicando l'effetto dei singoli chelati di Gd(III) compensano la minore sensibilità della tecnica.

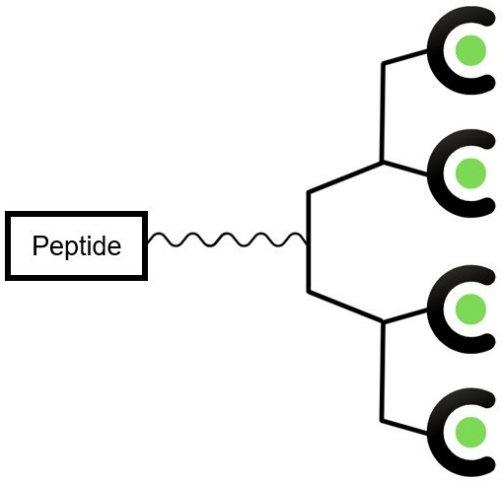


Figura 2.1 Rappresentazione schematica della struttura della sonda tetramerica

La struttura estremamente articolata della sonda richiede uno sforzo sintetico non indifferente. La sintesi completa del sistema tetramerico da composti commercialmente disponibili richiede non meno di 17 passaggi, escludendo la coniugazione con il peptide, realizzata come ultimo passaggio, e la costruzione del peptide stesso, realizzabile con tecniche di sintesi in fase solida automatizzata. Un approccio sintetico così lungo implica costi elevatissimi di produzione e quantità limitate di prodotto finale.
In questa tesi ci si è posti l'obiettivo di studiare una serie di modifiche strutturali della sonda, atte a mantenerne l'efficacia diagnostica ma al contempo a migliorarne l'accessibilità sintetica.
È stata progettata una sonda tetramerica alternativa, mantenendo le unità attive inalterate in numero e tipologia, e conservando la struttura peptidica che ha dimostrato l'effettivo *targeting*.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 Introduzione

L'impiego della MRI nel *Molecular Imaging* è oggetto di intense ricerche, spinte dalla capacità diagnostica di queste specifica tecnica, caratterizzata da una grande risoluzione di immagine e dalla disponibilità di sonde collaudate e sicure, ma anche affetta da una sensibilità inferiore rispetto ad altre tecniche di *imaging*.

La rottura delle placche aterosclerotiche è una delle cause principali di eventi cardiovascolari gravi. La localizzazione delle placche aterosclerotiche, accompagnate dalla misura della loro estensione e dalla definizione della loro stadiazione è di fondamentale importanza per la diagnosi e per il successivo trattamento del paziente.

Le diverse tecniche di *imaging* permettono, a vario grado, di localizzare e di valutare le placche aterosclerotiche; tuttavia, la qualità della diagnosi potrebbe essere incrementata attraverso l'impiego di sonde diagnostiche specifiche, che possano permettere di aumentare sensibilmente il contrasto dell'immagine in presenza di questo specifico stato patologico.

Nel 2018 è stata riportata nella letteratura scientifica[31] una nuova sonda MRI per *Molecular Imaging* composta da un complesso paramagnetico di Gd(III) coniugato con un peptide in grado di legarsi selettivamente alla tropoelastina ripostata in Figura 3.1.1.

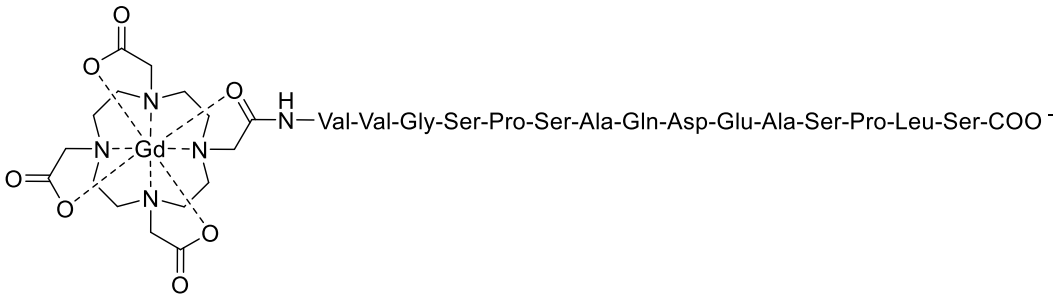


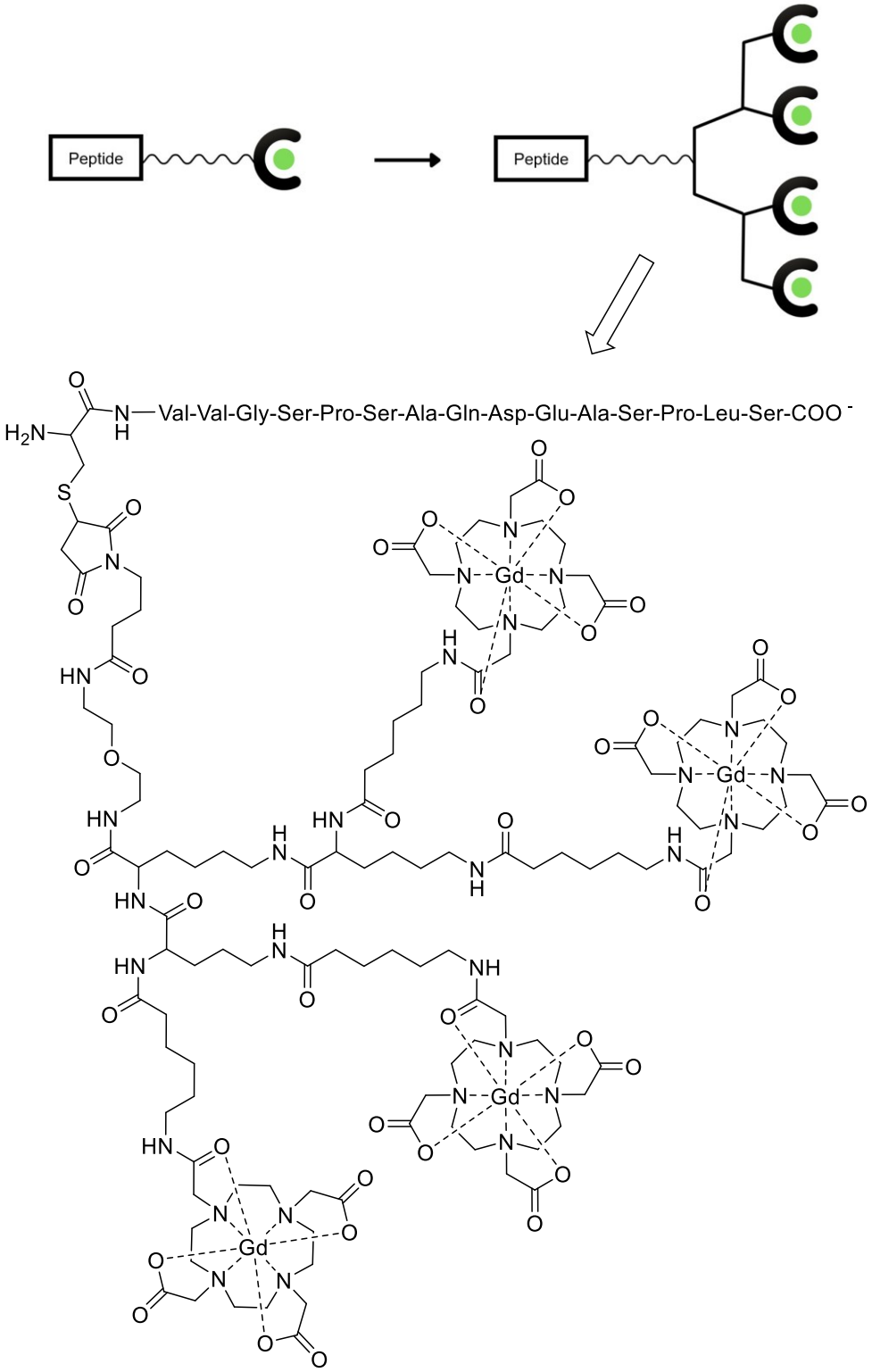
Figura 3.1.1 Sonda monomerica Gd-TESMA

La tropoelastina si accumula in caso di elastolisi e difetti di elastogenesi, ed è quindi considerata un perfetto *marker* per l'individuazione di placche aterosclerotiche.

Gli ottimi risultati in termini di visualizzazione selettiva delle placche aterosclerotiche nel topo hanno dimostrato l'efficacia di questo approccio a una sonda selettiva per *Molecular Imaging*.

Negli anni successivi, nell'ambito di una collaborazione con un gruppo di ricerca dell'Università del Piemonte Orientale, si è cercato di migliorare questo primo prototipo, aumentandone l'efficienza in termini di contrasto di immagine. A tale scopo, sono state impiegate due diverse strategie.

In un primo caso, mantenendo inalterato il peptide vettore che ha dimostrato un ottimo *binding* alla tropoelastina, si è perseguito l'aumento di rilassività attraverso la moltiplicazione delle unità di complessi di Gd(III), responsabili dell'effetto di contrasto. È stata quindi progettata una sonda di seconda generazione (Gd_4-TESMA), composta da 4 unità identiche di complesso di Gd(III), riportata in Figura 3.1.2.[30]



Gd_4-TESMA

Figura 3.1.2 Sonda tetramerica Gd_4-TESMA

La costruzione del sistema tetramerico ha richiesto una progettazione particolare, necessaria per unire le 4 unità di complesso di Gd(III) mantenendo una loro libertà conformazionale e per collegare la porzione parmagnetica tetramerica al peptide lasciando a quest'ultimo sufficiente spazio di manovra per conservare la possibilità di interazione con la tropoelastina. È stata quindi prevista una subunità molecolare che operasse il ruolo di *linker*, rappresentata da un *core* di tre molecole di lisina, e una subunità *spacer*, alifatica e flessibile, che permettesse di distanziare il gruppo di quattro complessi di Gd(III) dal peptide vettore.

Come atteso, l'efficienza di Gd_4-TESMA in termini di contrasto di immagine è nettamente superiore a quanto osservato con la sonda monomerica, confermando la bontà dell'approccio seguito.

Un secondo approccio mirato al miglioramento dell'efficienza di questa tipologia di sonda si è fondato sulla sostituzione delle unità di complessi paramagnetici di Gd(III) originariamente impiegate.

Le sonde Gd-TESMA e Gd_4-TESMA contengono infatti unità paramagnetiche rappresentate da complessi di Gd(III) dell'agente chelante macrociclico DOTAM (monoammide dell'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA)). L'agente chelante DOTAM è caratterizzato da un accesso sintetico e una funzionalizzazione molto agevole, che ne hanno fatto un cavallo di battaglia nella preparazione di complessi coniugati per diverse applicazioni. I complessi di Gd(III) dell'agente chelante DOTAM e dei suoi derivati mostrano tuttavia una rilassività relativamente bassa, superata nel tempo da complessi di Gd(III) più efficienti. Un esempio di agente chelante che forma complessi di Gd(III) con una maggiore rilassività è il legante mesociclico AAZTA, riportato in Figura 3.1.3a, sviluppato dal gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta questa tesi.

Una collaborazione tra l'Università del Piemonte Orientale e l'Università degli Studi di Torino ha permesso di costruire una subunità paramagnetica tetramerica nella quale i complessi di [Gd(DOTAM)] sono stati sostituiti da altrettante unità di [Gd(AAZTA)], rappresentata in Figura 3.1.3b.[32]

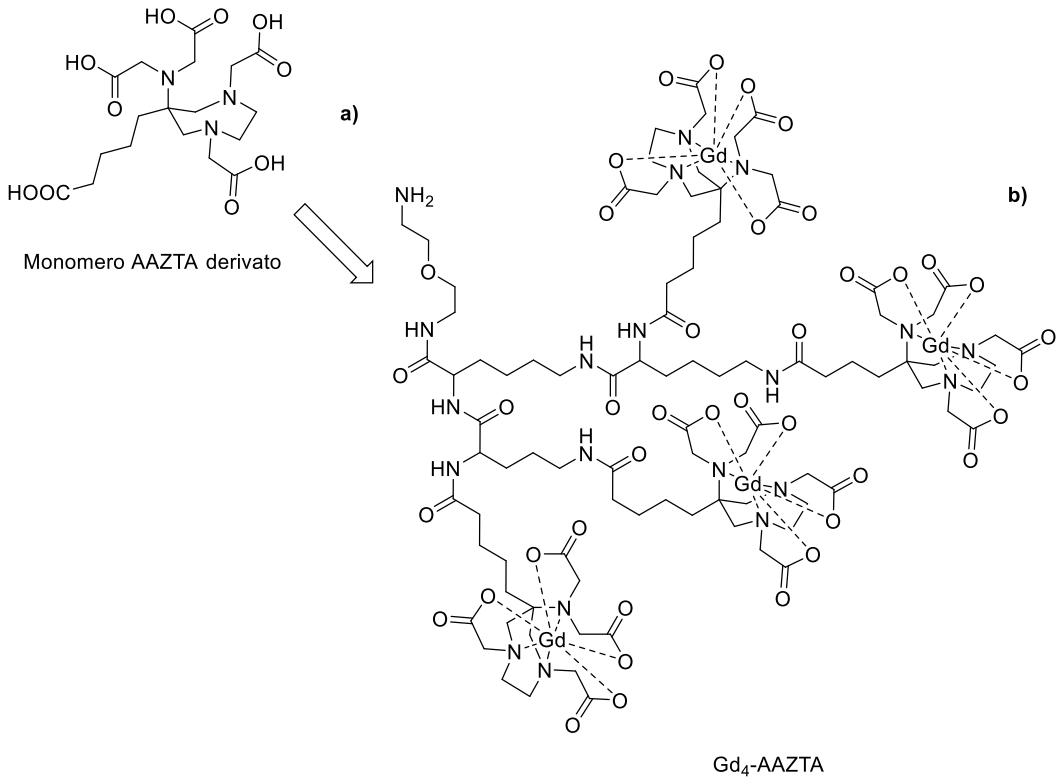


Figura 3.1.3 Unità monomerica AAZTA derivato (a) e complesso Gd_4-AAZTA (b)

Il sistema tetramerico riportato in Figura 3.1.3b e 3.1.4b rappresenta un'evoluzione del sistema originario contenente unità di [Gd(DOTAM)], riportato in Figura 3.1.4a, poiché i complessi [Gd(AAZTA)] sono caratterizzati da una rilassività più elevata, determinata dalla presenza sul centro metallico di due molecole di acqua coordinata (q = 2, *vs* q = 1 per [Gd(DOTAM)]). L'effetto positivo sul contrasto delle immagini di una rilassività più elevata delle singole unità paramagnetiche è ulteriormente magnificato dal sistema tetramerico, che moltiplica l'effetto del singolo complesso di Gd(III).

La preparazione sintetica del complesso [Gd(AAZTA)], della versione bifunzionale corredata del gruppo carbossilico remoto necessario e l'assemblaggio del sistema tetramerico richiede tuttavia un numero di passaggi più elevato rispetto al sistema tetramerico basato su [Gd(DOTAM)], che può contare su intermedi macrociclici commercialmente

disponibili che rendono più breve la parte di sintesi dedicata alla costruzione del legante macrociclico.

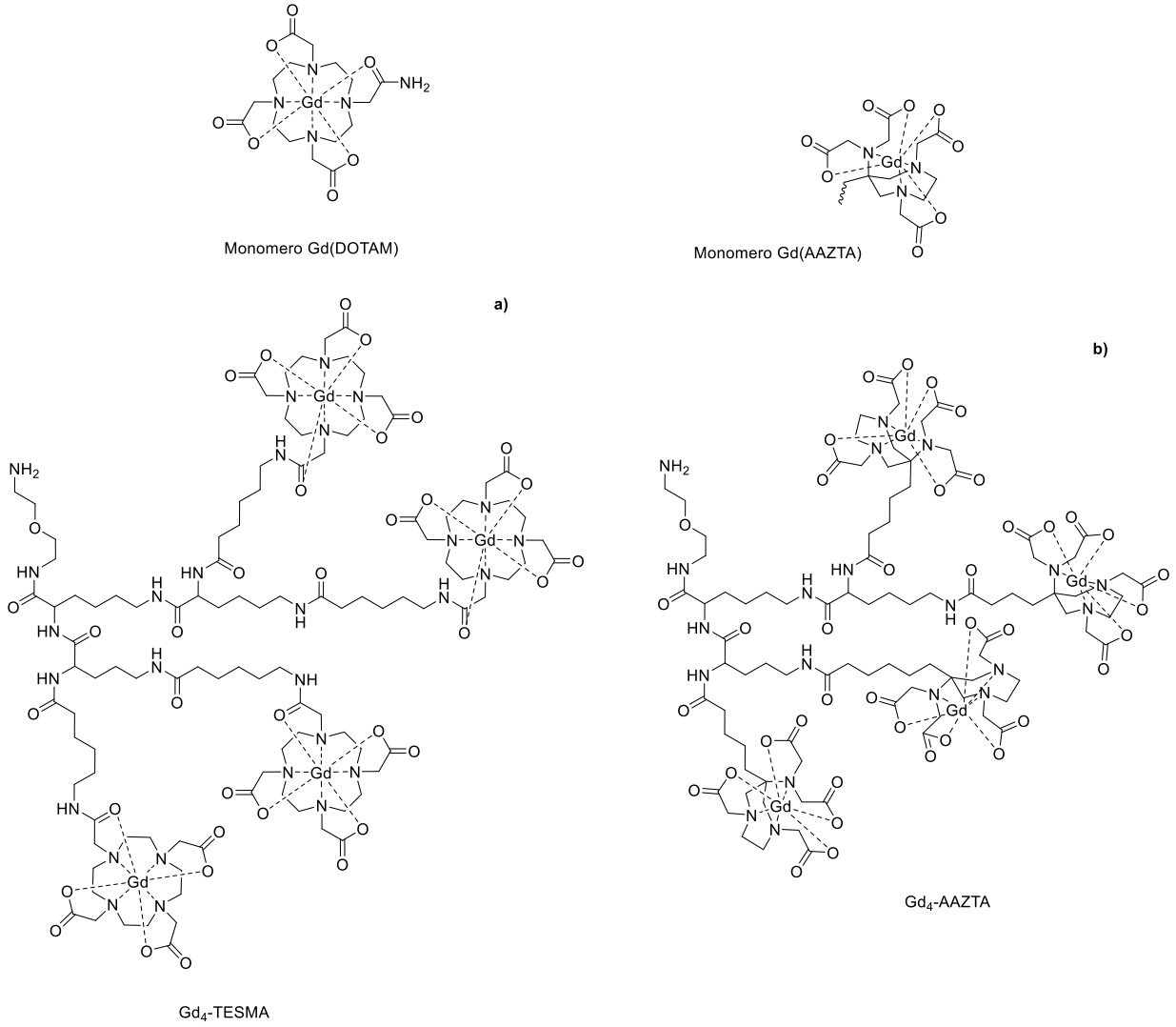


Figura 3.1.4 Unità monomerica [Gd(DOTAM)] e complesso Gd_4-DOTAM **(a)**, monomero [Gd(AAZTA)] e complesso Gd_4-AAZTA **(b)**

È comunque importante avere a disposizione due sistemi tetramerici alternativi, con caratteristiche strutturali e prestazioni differenti e che possono quindi essere impiegati per la progettazione e la preparazione di modulare di varie sonde coniugate per diverse applicazioni.

3.2 Progettazione e sintesi di una sonda alternativa

Il sistema tetramerico Gd_4-TESMA riportato in Figura 3.1.2 rappresenta alla data attuale la sonda più efficiente per la visualizzazione delle placche aterosclerotiche.[30]
In questo lavoro di tesi è stata progettata una sonda tetramerica alternativa, mantenendo inalterate in numero e tipologia le unità attive, e conservando la struttura peptidica che ha dimostrato l'effettivo *targeting*, con l'obiettivo di migliorarne l'accesso sintetico e, possibilmente, anche le prestazioni.

La struttura composita e particolarmente articolata di Gd_4-TESMA richiede uno sforzo sintetico importante. La sintesi completa di Gd_4-TESMA richiede un totale di 17 passaggi, escludendo la coniugazione con il peptide, realizzata come ultimo passaggio, e la costruzione del peptide stesso, realizzabile con tecniche di sintesi in fase solida automatizzata.
La preparazione del sistema Gd_4-TESMA si basa su una sintesi convergente a più reazioni, articolata in diverse fasi distinte. Il primo blocco comprende la preparazione di un *core* di tre lisine legate insieme, che funge da supporto centrale dell'intero sistema. Lo schema di reazione è riportato in Figura 3.2.1.

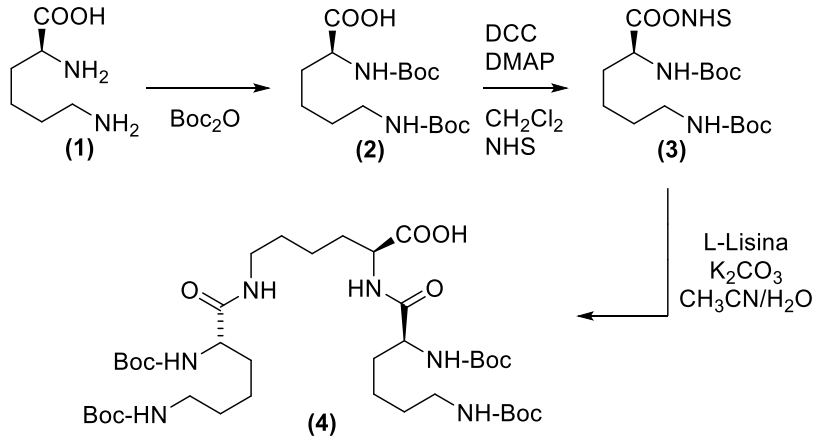


Figura 3.2.1 Gd_4-TESMA, sintesi del *core* di lisine (parte 1)

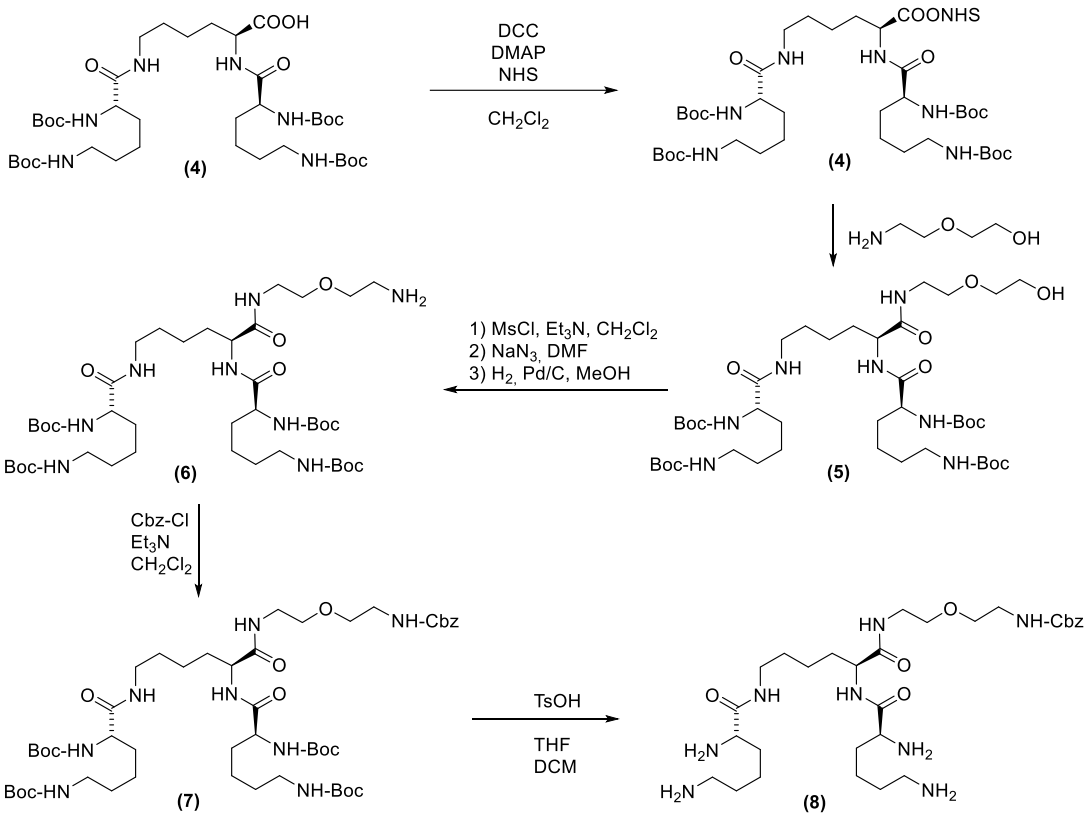


Figura 3.2.2 Gd_4-TESMA, sintesi del *core* di lisine (parte 2)

Nella seconda fase rappresentata in Figura 3.2.2, il *core* di trilisina viene corredato di uno spaziatore. La sintesi utilizza il 2-(2-amminoetossi)etanolo per la preparazione dell'intermedio **(5)**. Il gruppo ossidrilico terminale di quest'ultimo viene successivamente convertito nel gruppo amminico originale attraverso una sequenza classica di metansulfonilazione/sostituzione nucleofila con azide/riduzione, portando al composto **(6)**.

Il gruppo amminico periferico del composto **(6)** viene protetto con benzil cloroformiato, mentre un successivo trattamento con acido *p*-toluensolfonico deprotegge i quattro gruppi amminici originariamente presenti nei due residui di lisina distali del nucleo di trilisina, dando così il composto **(8)**.

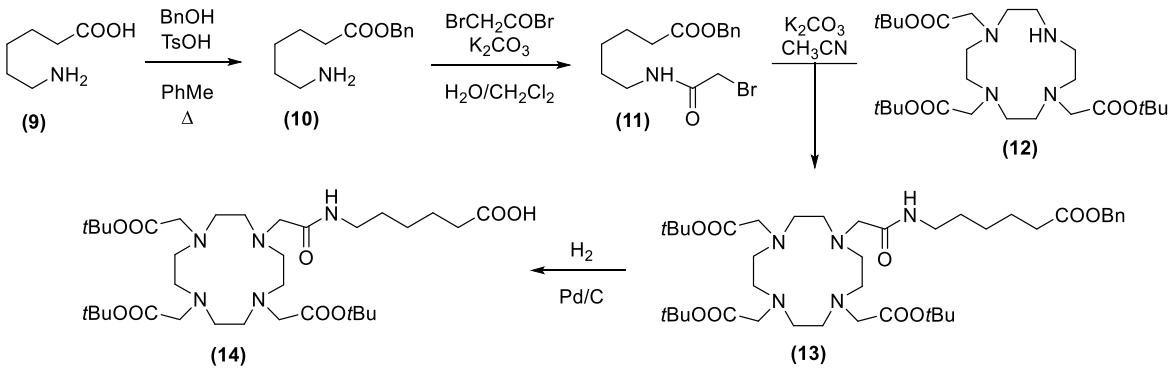


Figura 3.2.3 Gd_4-TESMA, costruzione del DOTAM-C_6

Parallelamente, si prepara un agente chelante bifunzionale a base di DOTA rappresentato in Figura 3.2.3.

Partendo dall'acido 6-aminoesanoico **(9)**, questo, viene convertito nel corrispondente estere benzilico, che viene poi acilato con bromoacetilbromuro per ottenere la bromoacetamide funzionalizzata **(11)**. Quest'ultima viene utilizzata per l'alchilazione dell'ammina secondaria del DO3A(*t*Bu)$_3$ **(12)** (già disponibile in commercio), portando al tetraestere completamente protetto **(13)**. La deprotezione selettiva dell'estere benzilico distale mediante idrogenolisi catalitica porta all'agente chelante bifunzionale reattivo DOTAM-C_6-COOH **(14)**. [33,34]

L'assemblaggio dell'intero *scaffold* tetramerico raffigurato in Figura 3.2.4, viene realizzato mediante la funzionalizzazione completa del *core* di trilisina **(8)**, attraverso una reazione con un leggero eccesso dell'agente chelante bifunzionale **(14)** in presenza di HBTU come reagente di *coupling*. La deprotezione esaustiva dei dodici gruppi esterei *t*-butilici viene ottenuta trattando il composto con un eccesso di acido formico, portando così alla formazione dell'agente chelante completamente sbloccato **(16)**.

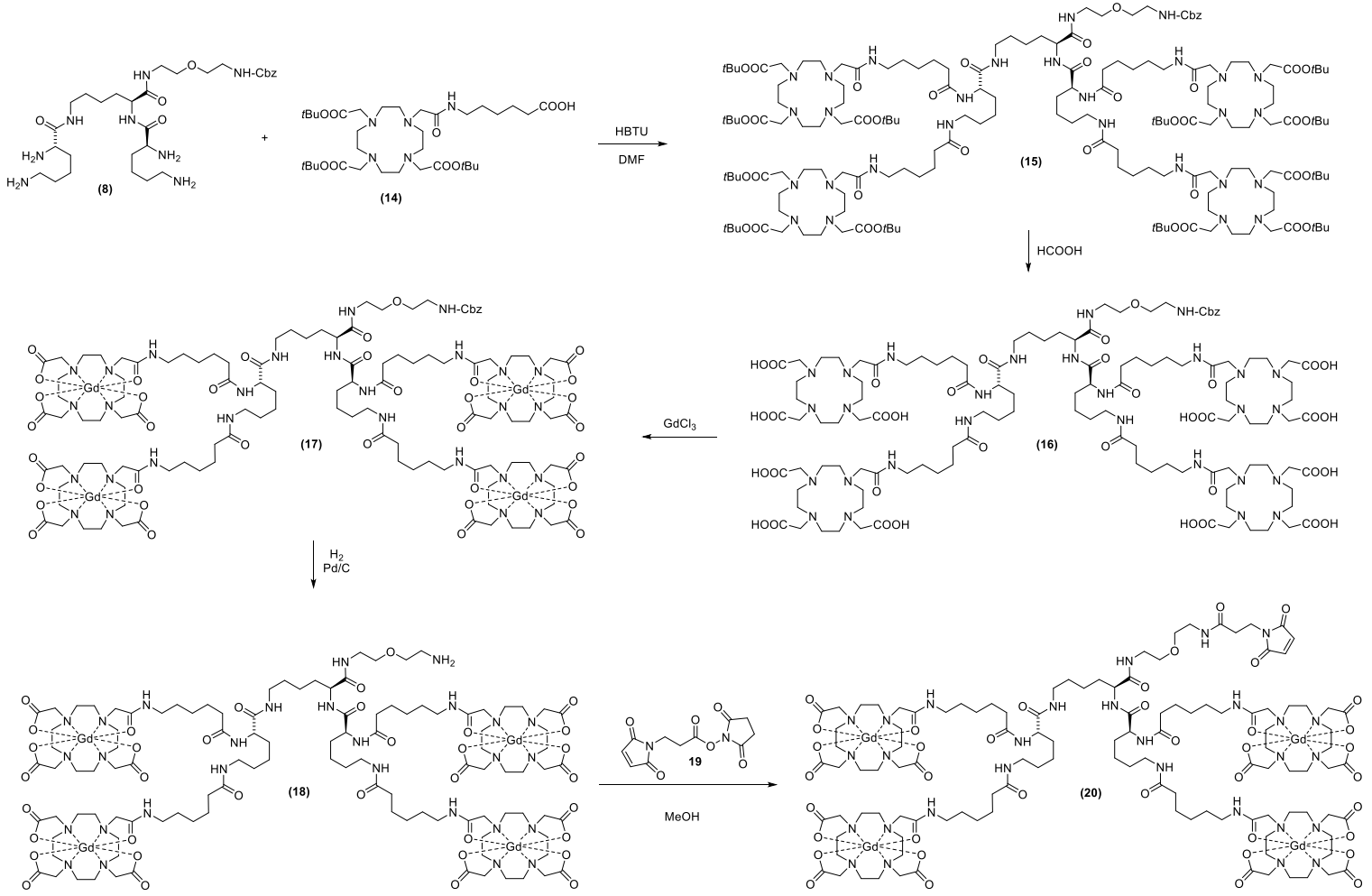


Figura 3.2.4 Gd_4-TESMA, assemblaggio finale del sistema

Una soluzione acquosa di quest'ultimo viene quindi trattata con una soluzione di gadolinio cloruro e successivamente sottoposta a un'estesa purificazione per ottenere il complesso paramagnetico tetramerico **(18)**. La deprotezione del gruppo protettivo *N*-benzoilossicarbonilico mediante idrogenolisi catalitica libera l'ammina primaria corrispondente, la cui reattività viene sfruttata per introdurre la maleimmide, reattiva verso i tioli. Questo passaggio avviene tramite trattamento con la molecola bifunzionale reperibile in commercio, acido 3-maleimidopropionico NHS estere **(19)**, portando al sistema paramagnetico tetranucleare **(20)**, pronto per l'ultimo passaggio di coniugazione con il peptide.

La sintesi del sistema paramagnetico tetranucleare, seppur razionalizzata con un approccio parzialmente convergente, è comunque caratterizzata da un numero molto elevato di passaggi sintetici. La lunghezza della sintesi porta inevitabilmente a una resa complessiva piuttosto bassa, e alla necessità di condurre ripetute campagne di produzione per la preparazione di quantità multigrammo del composto finale, con ciascuna delle campagne di produzione che richiede diverse settimane per il completamento della sintesi.

Nei paragrafi successivi sono mostrati e discussi gli approcci sintetici alternativi al sistema paramagnetico tetranucleare perseguiti nel corso della presente tesi.

3.2.1 Approcci sintetici alternativi

Il sistema paramagnetico tetranucleare descritto nel paragrafo precedente ha dato prova di un'efficienza diagnostica soddisfacente, coniugata a una elevata selettività nei confronti della tropoelastina che permette di individuare e identificare placche aterosclerotiche in modelli animali.
La presente tesi si pone l'obiettivo di valutare una serie di modifiche strutturali di questa sonda MRI, variazioni che devono conservarne l'efficacia diagnostica ma al contempo a migliorarne l'accessibilità sintetica.
Per mantenere l'efficienza diagnostica si ritiene necessario conservare la presenza di un sistema tetramerico di 4 unità di complessi di Gd(III), questi ultimi sono stabili e sono quindi selezionati nell'ambito dei chelati di leganti macrociclici. Si ritiene inoltre opportuno mantenere una relativa distanza tra il sistema tetramerico e il peptide vettore per non inficiare la mobilità rotazionale del primo e l'approccio alla proteina del secondo. Devono inoltre rimanere inalterati i requisiti fondamentali di stabilità chimica e dell'elevata solubilità in acqua dell'intera sonda.
Il lavoro di tesi è quindi iniziato con una prima fase di progettazione di una sonda tetramerica alternativa, potenzialmente in possesso dei succitati requisiti e che possa essere sintetizzata in un numero minore di passaggi.
Una prima considerazione preliminare riguardo alla sonda tetramerica riguarda il *core* tetramerico, originariamente costituito da un sistema di tre molecole di lisina, unite mediante legami ammidici rappresentato in Figura 3.2.5. I gruppi amminici delle unità di lisina sono successivamente impiegati per l'ancoraggio delle quattro unità di complessi di gadolinio. La molecola della lisina possiede due gruppi amminici (indicati dai descrittori α ed ε, che descrivono l'atomo di carbonio della catena amminoacidica sul quale è posizionato il gruppi amminico), che non sono correlati da elementi di simmetria. Il *core* di lisine presenta quindi un totale di quattro gruppi amminici che risultano quindi strutturalmente eterotopici.

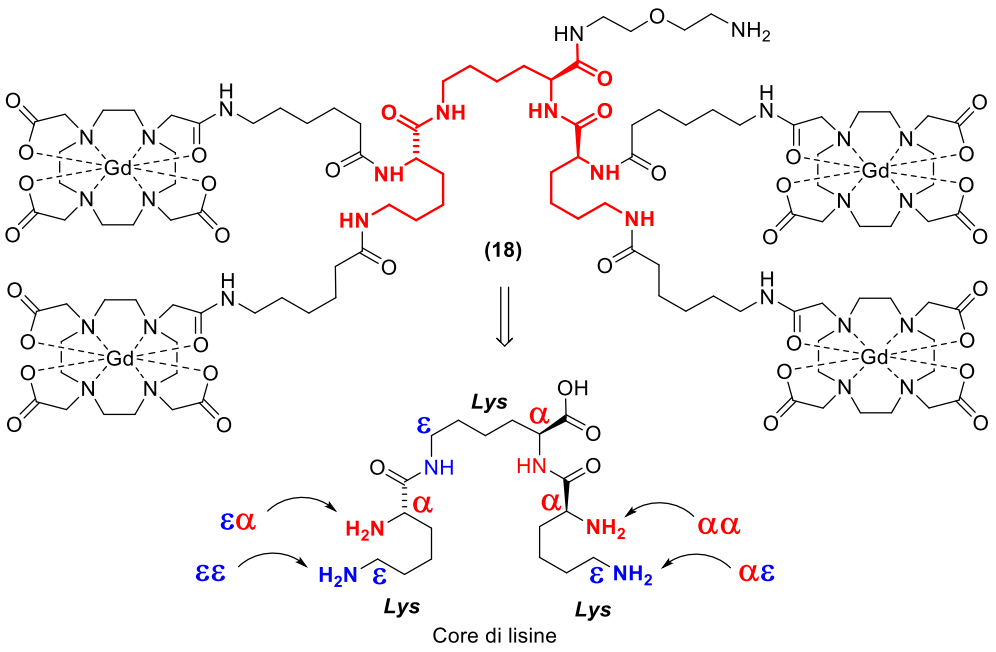


Figura 3.2.5 *Core* della sonda originaria composto da tre molecole di lisina

Nella costruzione della sonda tetramerica originaria la coniugazione dei complessi paramagnetici a questi quattro gruppi amminici ha mostrato diversi problemi. L'eterotopicità dei quattro gruppi amminici è probabilmente la causa delle diverse problematiche che si osservano in questo specifico passaggio. La reazione è infatti estremamente lenta a concludersi e si osserva la formazione di diversi sottoprodotti. Ciò può essere attribuito a leggere differenze di reattività dei gruppi amminici che si trovano in intorni chimici relativamente diversi e che possono quindi sperimentare un ingombro sterico differente (il gruppo amminico α è più ingombrato stericamente del gruppo amminico ε).

Nel *design* della nuova sonda tetramerica si è perciò deciso di progettare un sistema nel quale i quattro gruppi amminici fossero identici per simmetria, garantendo di conseguenza una reattività uniformata nel processo di coniugazione dei complessi paramagnetici. La simmetria strutturale può essere assicurata da un approccio sintetico convergente, nel quale due unità simmetriche vengono a loro volta collegate simmetricamente, generando un *core* tetramerico complessivamente

simmetrico riportato in Figura 3.2.6. L'approccio convergente è particolarmente vantaggioso dal punto di vista sintetico, in quanto riduce significativamente il numero di passaggi sintetici, dovendo preparare unità identiche che si ripetono nell'oligomero simmetrico.

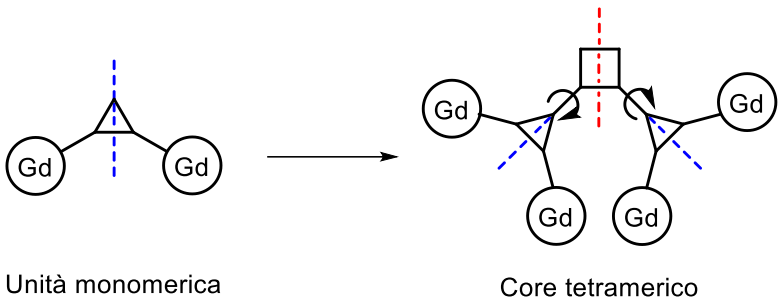


Figura 3.2.6 Progettazione di un core tetramerico simmetrico

Per la costruzione del sistema diamminico base simmetrico è stata selezionata come materia prima la dietilentriammina (**1**). Questa poliammina è commercialmente disponibile a un prezzo molto basso, essendo impiegata in larga scala come indurente di resine epossidiche, come assorbitore per gas acidi (es. CO_2) e come materia prima per diversi leganti nella chimica di coordinazione (es. DTPA).

La scelta della dietilentriammina (**1**) è motivata dalle sue caratteristiche strutturali: essa è infatti corredata di due gruppi amminici primari, simmetricamente disposti in posizione distale, e di un gruppo amminico secondario posizionato sul baricentro molecolare. La reattività della dietilentriammina è ben nota e i gruppi amminici primari sono tipicamente i primi a reagire con sistemi elettrofili, sia per la loro posizione periferica meno ingombrata, sia per la natura primaria dei gruppi amminici stessi.

Traendo profitto da questa reattività differenziale, la dietilentriammina (**1**) è stata trattata con anidride ftalica (**2**), operando in acido acetico a riflusso rappresentato in Figura 3.2.7.[35] La lavorazione della miscela di reazione permette di ottenere il derivato doppiamente protetto nelle posizioni distali (**3**).

Parallelamente, la diammina (**4**) (2,2'-(etilenediossi)bis(etilammina) o 1,2-bis(2-amminoetossi)etano)) è stata selezionata per fungere da unità di collegamento ("*spacer*") tra l'unità diamminica simmetrica e il resto della molecola. Anche questa diammina è commercialmente disponibile ed economica, e la sua struttura oligoeterea PEG-*like* permette di impartire al sistema risultante una maggiore idrofilia rispetto ad esempio a una normale catena alifatica polimetilenica/idrocarburica.

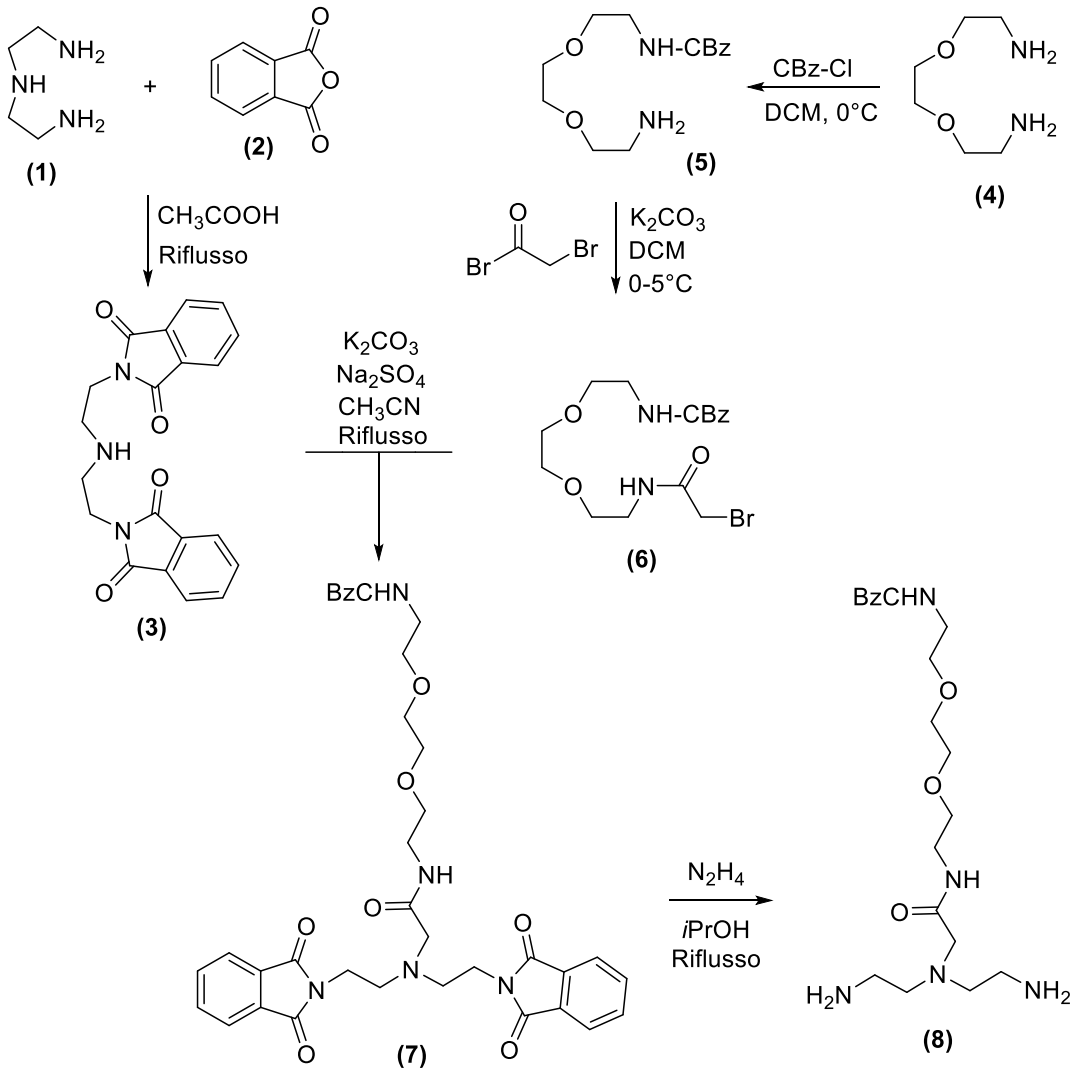


Figura 3.2.7 Sintesi dell'unità diamminica base simmetrica

La sintesi dell'unità diamminica base simmetrica è riassunta in Figura 3.2.7. La diammina (**4**) è monoprotetta per trattamento con un difetto stechiometrico di benzil cloroformiato (Cbz-Cl) in diclorometano, operando a freddo per mezzo di un bagno di ghiaccio.[36] Un *workup* combinato acido-base permette di isolare il derivato (**5**), successivamente trattato con α-bromoacetilbromuro in diclorometano in presenza di carbonato di potassio come *scavenger* dell'acido bromidrico sviluppato durante la reazione. La reazione di ammidazione porta al bromoacetilderivato (**6**), pronto per essere congiunto al gruppo amminico centrale della triammina diprotetta (**3**) mediante una classica reazione di alchilazione S_N2, condotta in acetonitrile a riflusso in presenza di una miscela di carbonato di potassio (base/*scavenger* di acidità) e di solfato di potassio (anidrificante). L'alchilazione porta, dopo purificazione cromatografica, al derivato (**7**), che è stato successivamente fatto reagire con idrazina in isopropanolo a riflusso per rimuovere i gruppi protettivi sugli atomi di azoto distali. In tal modo vengono liberati i gruppi amminici primari, completando la preparazione sintetica dell'unità diamminica base (**8**), nella quale è possibile apprezzare la simmetria strutturale ricercata a livello di progettazione.

Il successivo intervento strutturale riguarda il sistema paramagnetico, che nella sonda originale è supportato dal *core* "asimmetrico" di lisine.

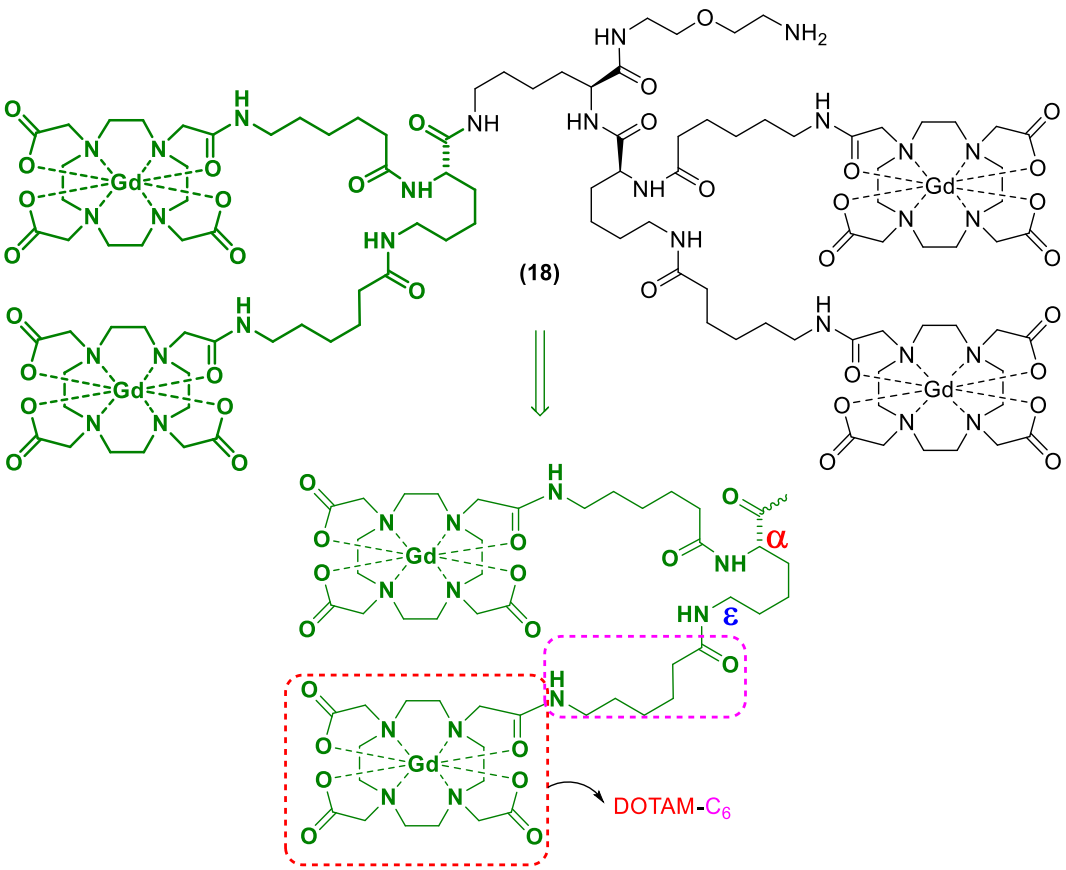


Figura 3.2.8 Quattro unità di DOTAM-C_6 della sonda originale tetramerica

La progettazione ha l'obiettivo di razionalizzare e rendere simmetrico anche la subunità paramagnetica del sistema, per ridurre il problema della reattività differenziale delle singole unità e per diminuire il numero di passaggi sintetici necessari per la sua preparazione.

A tale scopo, si è deciso di modificare la tipologia di agente chelante utilizzato per la preparazione del complesso attivo di Gd(III). Mantenendo fissa la natura macrociclica dell'agente chelante, necessaria per garantire una sufficiente stabilità del complesso *in vivo*, si è optato per la sostituzione dell'unità chelante di DOTAM-C_6 impiegata nella sonda originale con unità chelanti di HPDO3A, legante base del gadoteridolo,[37] agente di contrasto approvato da tempo per l'uso clinico.

La sostituzione di unità di [Gd(DOTAM-C_6)] con complessi [Gd(HPDO3A)] ha in linea di principio diversi vantaggi:

- Efficienza: il complesso [Gd(DOTAM-C_6)] mostra valori di rilassività inferiori a quelli mostrati dal complesso [Gd(HPDO3A)], a causa della minore velocità di scambio dell'acqua coordinata al centro metallico; questo effetto è particolarmente evidente per coniugati di questi complessi ad elevato peso molecolare.

- Accessibilità sintetica: l'agente chelante HPDO3A è sintetizzabile in un singolo passaggio dal sistema macrociclico commerciale DO3A, a differenza del legante DOTAM-C_6 che richiede 3 passaggi per l'introduzione della catena spaziatrice C_6.

Proseguendo nella progettazione e seguendo l'idea di una strategia convergente, due unità di [Gd(HPDO3A)] devono essere connesse simmetricamente per dare un dimero paramagnetico bifunzionale, riportato Figura 3.2.9, che sarà successivamente "raddoppiato" a tetramero per doppia reazione con la diammina simmetrica (**8**). Per la connessione è stata selezionata una subunità aromatica: l'acido 3,5-diidrossibenzoico (**9**), commercialmente disponibile ed economico, reagente trifunzionale necessario per la triforcazione molecolare. L'impiego di un'unità aromatica permette inoltre di avere un cromoforo che può essere di ausilio durante le operazioni cromatografiche di analisi e purificazione, essendo agevolmente monitorabile mediante rivelatori UV-Vis.

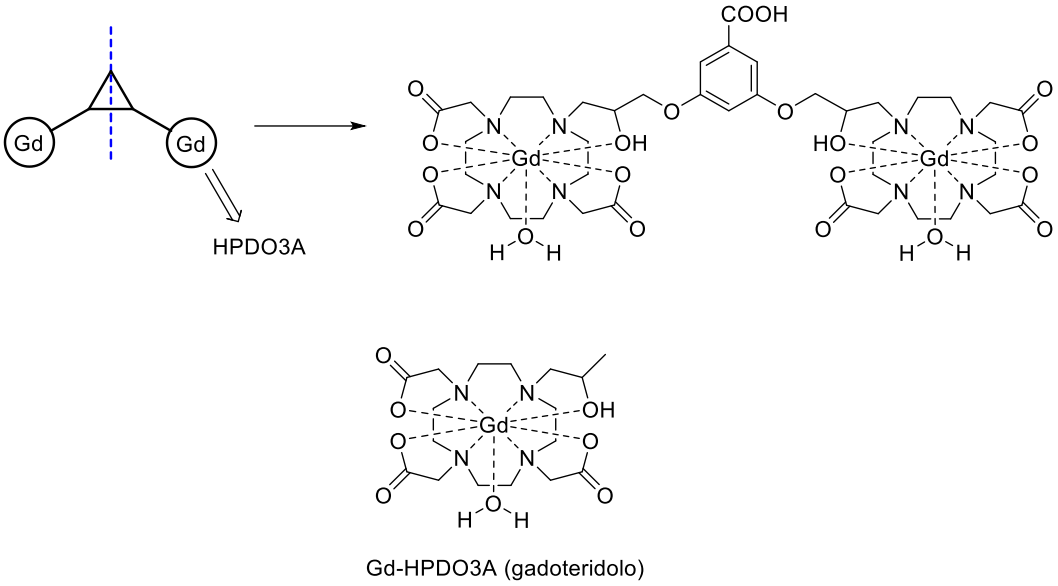


Figura 3.2.9 Progettazione del dimero paramagnetico bifunzionale simmetrico

La sintesi del dimero paramagnetico bifunzionale è riassunta in Figura 3.2.10.

L'acido 3,5-diidrossibenzoico (**9**) è esterificato in condizioni di Fischer (metanolo/acido solforico) per dare il corrispondente estere metilico (**10**).[38] I due gruppi fenolici del composto (**10**) sono successivamente alchilati con epicloridrina (**11**), adattando un protocollo riportato in letteratura[39] e generando il diglicidil derivato (**12**).

I due gruppi epossidici del composo (**12**) sono quindi impiegati per una reazione di doppia alchilazione, realizzata con altrettanti equivalenti molari dell'agente chelante macrociclico protetto DO3A(*t*Bu)$_3$ (**13**), reazione condotta in acetonitrile a riflusso in presenza di TEA. La doppia alchilazione permette di assemblare la struttura chelante del sistema dimerico (**14**), in forma protetta. L'idrolisi basica di tutti i gruppi esterei fornisce l'agente chelante dimerico deprotetto (**15**), pronto per accogliere lo ione metallico paramagnetico, introdotto mediante una reazione di complessazione. Si completa in questo modo la preparazione del dimero paramagnetico (**16**), che rappresenta l'unità base del sistema complessivo tetramerico desiderato.

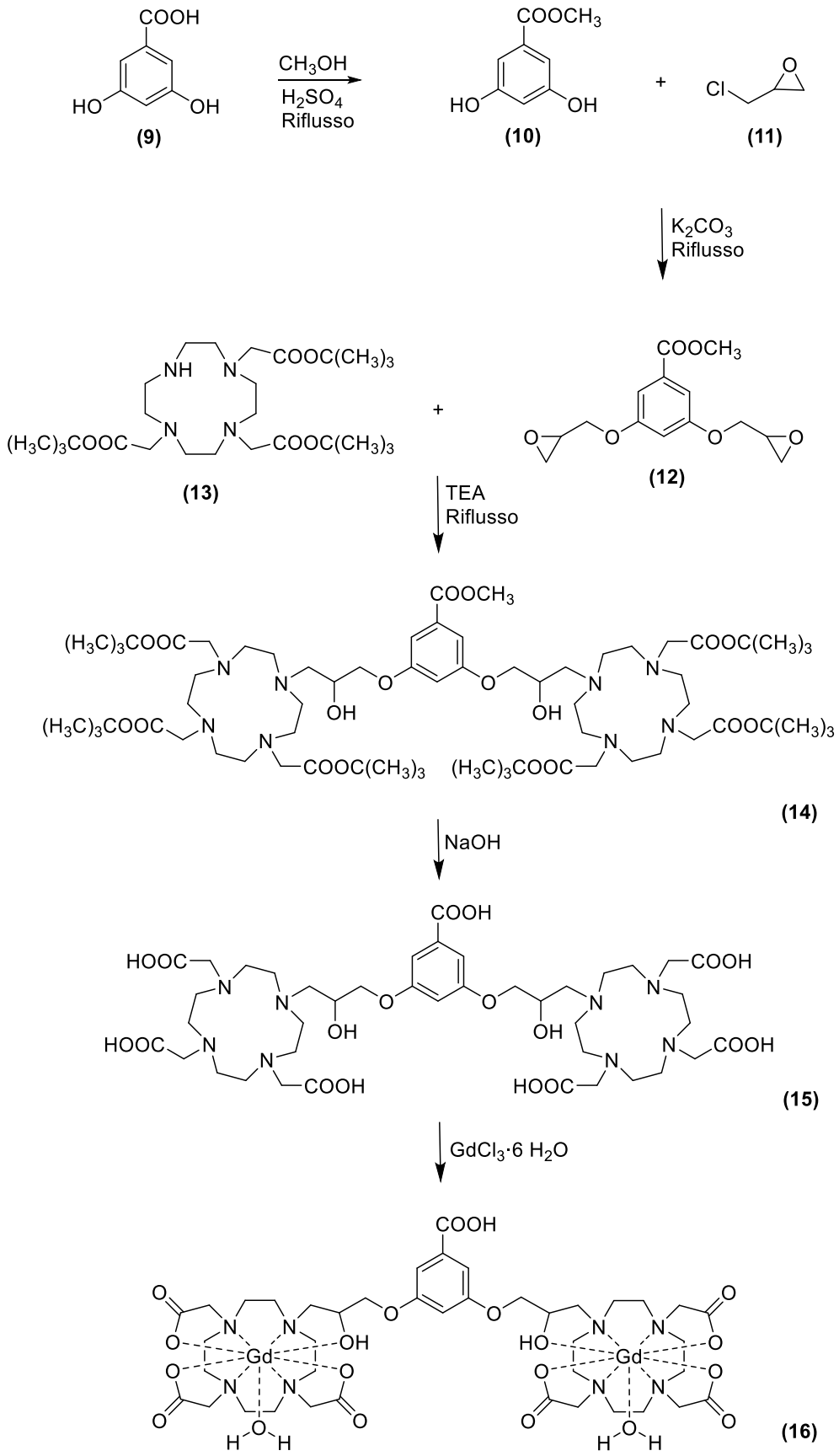


Figura 3.2.10 Sintesi del dimero paramagnetico bifunzionale simmetrico

3.2.2 Sintesi complesso finale

Completata con successo la preparazione delle subunità paramagnetiche dimeriche (composto (**16**)) e del *core* diamminico simmetrico (composto (**8**)), è ora possibile affrontare lo stadio finale della preparazione della sonda tetramerica, costituito dall'assemblaggio di due subunità paramagnetiche dimeriche sul *core* centrale diamminico riportato in Figura 3.2.11.

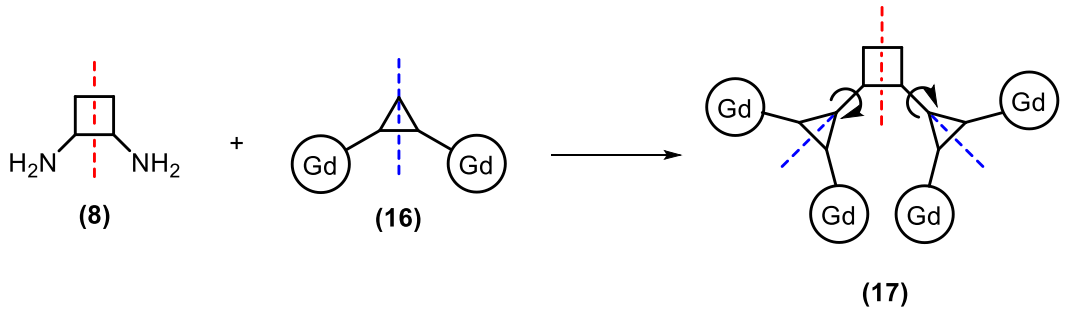


Figura 3.2.11 Progettazione della sonda tetramerica simmetrica

Il dettaglio sintetico di questo passaggio finale è riportato in Figura 3.2.12. Il composto (**8**) e il composto (**16**), in rapporto stechiometrico relativo 1:2, sono sciolti in DMF e, in presenza di TEA come base ausiliaria, sono stati trattati con l'agente condensante HBTU, operando a caldo (T = 80°C).
La disponibilità di quantità limitate delle subunità molecolari, limitata dalle attività di *screening* condotte sui vari passaggi sintetici, ha permesso di condurre un unico tentativo di assemblaggio nei tempi previsti per il lavoro di tesi. Dopo la verifica della conversione completa, la miscela di reazione è stata sottoposta a purificazione cromatografica, ottenendo una piccola quantità di coniugato. La presenza dello ione paramagnetico nella molecola ne preclude l'analisi NMR; per questo motivo, il composto cromatograficamente univoco è stato sottoposto ad analisi HRMS che ha confermato l'identità del composto (**17**).
La conferma dell'identità permette di considerare valida la via sintetica, anche le le quantità coinvolte nell'ultimo passaggio danno una risposta a positiva a livello di *proof of concept*.

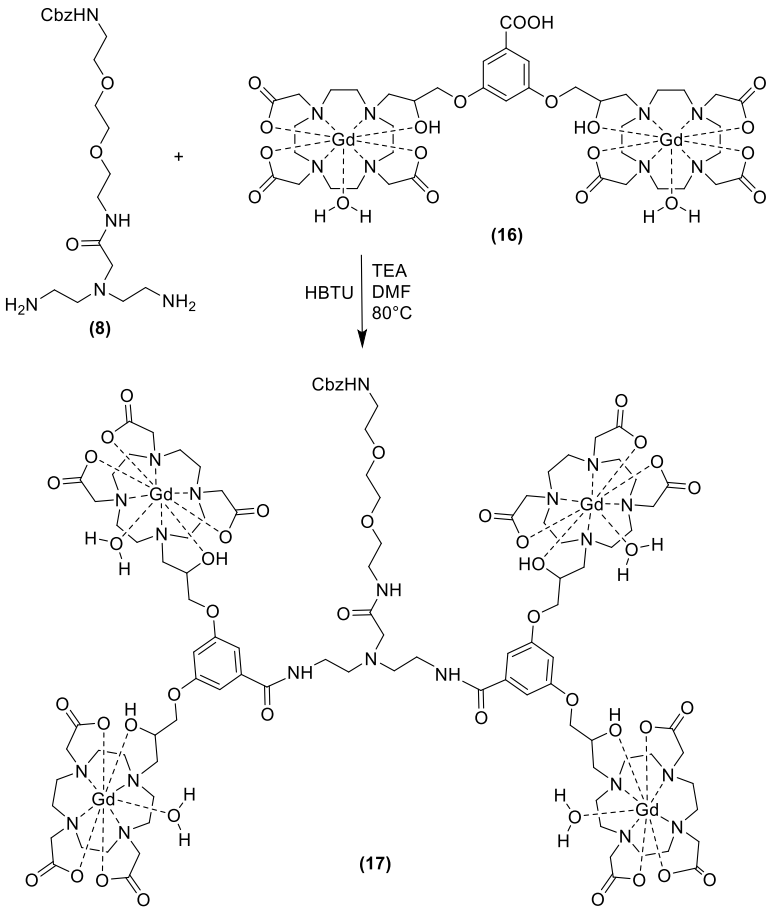


Figura 3.2.12 Sintesi della sonda tetramerica simmetrica

La sonda tetramerica simmetrica così ottenuta sarà successivamente impiegata per la coniugazione con il peptide, riportato in Figura 3.2.13, previa rimozione dell'ultimo gruppo protettivo (Cbz) sul gruppo amminico apicale dello *spacer*. Questo passaggio e la coniugazione sono rinviati a una successiva sintesi che sarà ripetuta su scala maggiore, rappresentando lo sviluppo futuro di questa tesi.

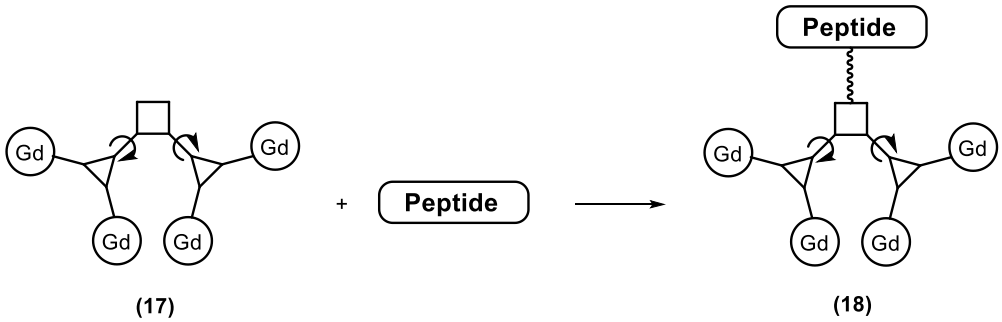


Figura 3.2.13 Sonda tetramerica alternativa simmetrica coniugata al peptide vettore

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro di ricerca sperimentale di questa tesi si è concentrato sulla revisione strutturale di una sonda MRI per *Molecular Imaging*.

La sonda MRI, sviluppata da un gruppo di ricerca dell'Università del Piemonte Orientale per la visualizzazione mediante risonanza magnetica di placche aterosclerotiche, è costituita da un sistema paramagnetico tetramerico collegato a un peptide che si lega selettivamente alla tropoelastina.

Il sistema paramagnetico tetramerico è supportato da una struttura base formata da tre unità di lisina, alle quali sono connesse quattro complessi di gadolinio(III) costituenti la parte attiva della sonda MRI. La struttura base è inoltre corredata di uno spacer idrofilo che reca all'estremità un gruppo funzionale reattivo per il collegamento al peptide "vettore".

La preparazione di questa sonda richiede un totale di 17 passaggi sintetici (escludendo il legame con il peptide). La lunghezza della sintesi richiede tempi molto lunghi e limita pesantemente la quantità di sonda preparata in ogni singola campagna di preparazione.

In questa tesi sono state studiate modifiche strutturali della sonda tetramerica, mirate a una costruzione più razionale della sonda stessa che mantenga (o migliori) le proprietà di contrasto dell'immagine della sonda originale, e al contempo permetta di avere un approccio sintetico più breve ed efficiente.

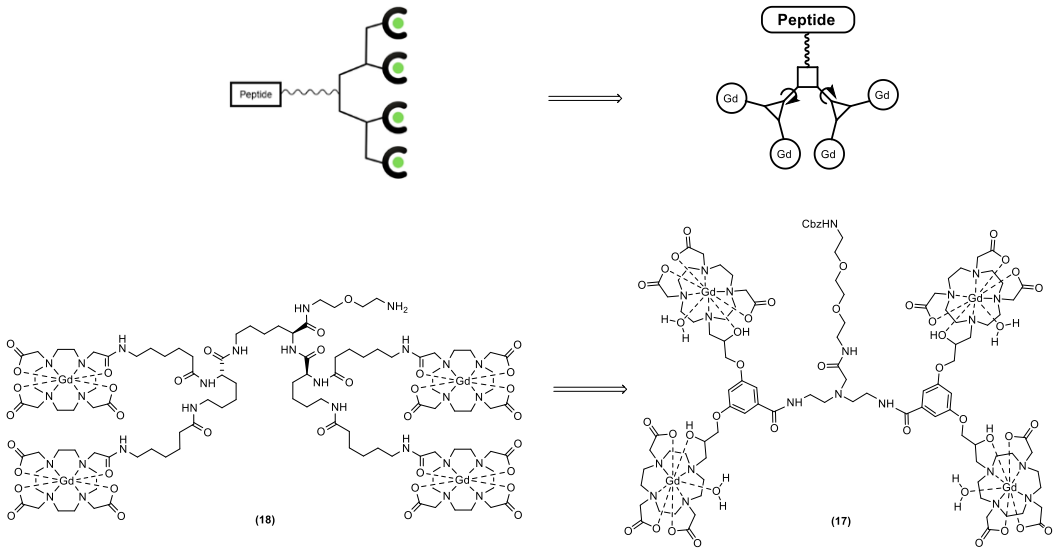


Figura 4.1 Modifiche strutturali introdotte sulla sonda originale per ottenere la sonda alternativa

In Figura 4.1 è possibile notare le modifiche introdotte a livello strutturale, che possono essere riassunte come segue:

- Le unità di complessi di Gd(III) mantengono la struttura macrociclica necessaria per l'inerzia chimica, ma sono derivate dall'agente chelante HP-DO3A, sinteticamente più accessibile rispetto all'agente chelante DOTAM-C_6 originariamente impiegato.
- La struttura base tetramerica ("*core*") di supporto è stata riprogettata e ora costituita da una struttura simmetrica e accessibile in modo convergente, essendo formata da due unità dimeriche simmetriche.
- Il *linker* idrofilo è stato leggermente allungato, per evitare disturbi sterici tra il sistema paramagnetico e il peptide, che deve essere libero di interagire con la proteina *target*.

La sintesi della nuova sonda tetramerica è stata studiata e condotta fino al composto (**17**), precursore stabile del passaggio di coniugazione al peptide. La sintesi è stata realizzata a livello di *proof of concept*, su quantità ridotte e puntando a valutare l'efficienza dell'intera sequenza, che risulta quindi composto da un numero inferiore di passagi (11 *vs* 17).

Gli sviluppi futuri di questo lavoro vedranno una fase di sviluppo, mirata all'ottimizzazione dei singoli passaggi sintetici.

CAPITOLO 5

SEZIONE SPERIMENTALE

5.1 Materiali e metodi

Nell'elenco sottostante sono riportati gli strumenti, i materiali e i metodi analitici che sono stati utilizzati per realizzare gli esperimenti.

^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR	Bruker Avance Neo 400 MHz or Jeol Eclipse ECP300
Colonna cromatografica	Macherey-Nagel silica gel 60 (0.063-0.200 mm)
TLC	Fluka (Sigma-Aldrich) silica gel matrix, indicatore di fluorescenza (254 nm)
Spettrometria di massa (HRMS)	Thermo Finnigan LCQ-Deca XP-PLUS ion trap spectrometer

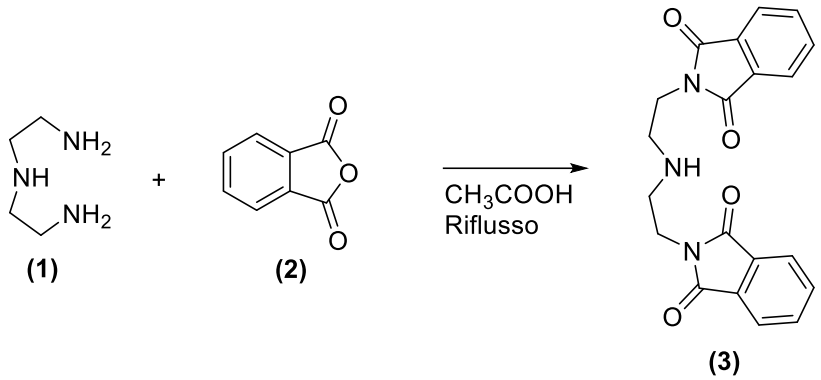
Per la rilevazione dei composti mediante TLC sono state utilizzate le seguenti soluzioni, prodotte in laboratorio mediante le seguenti ricette:

- **Reattivo di Dragendorff**: la preparazione di questo reattivo è svolta mediante la sospensione di bismuto ossinitrato ($Bi(O)NO_3$, 0.85 g), in acido acetico glaciale (10 mL) e H_2O (40 mL). A questa, si aggiunge goccia a goccia, una soluzione di ioduro di potassio (8 g) in H_2O (20 mL). Si osserva un'iniziale formazione di un precipitato nero (BiI_3) che, proseguendo l'aggiunta, si dissolve totalmente portando all'ottenimento di una soluzione arancione pronta all'utilizzo. Le ammine e in generale altre sostanze di natura basica appariranno sulla lastrina, mediante l'utilizzo di questo reattivo, come macchie rosse su uno sfondo giallo.

- **Soluzione di permanganato di potassio**: si ottiene miscelando una soluzione di $KMnO_4$ (2 g) in H_2O (100 mL), con una soluzione di $NaHCO_3$ (4 g) in H_2O (100 mL). La soluzione formatasi presenta una colorazione viola intenso. L'individuazione delle sostanze mediante questo reattivo si basa sulla colorazione prodotta da gruppi funzionali ossidabili.

5.2 Sintesi della molecola *spacer*

*Sintesi composto (**3**)*



(1) (2) (3)

Procedimento:

In un pallone a 3 colli da 250 mL munito di refrigerante a bolle, si introduce **(1)** (5.00 g, 0.0485 mol) in acido acetico glaciale (80 mL). Viene aggiunto, goccia a goccia, mediante imbuto gocciolatore e sotto vigorosa agitazione il reattivo **(2)** (14.35 g, 0.0970 mol).

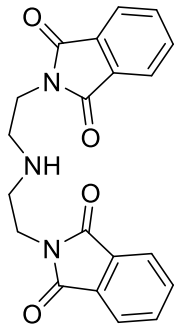
La miscela di reazione viene scaldata a riflusso (180°C), la temperatura viene così mantenuta fino a che non si forma un composto solido.

Successivamente, il grezzo di reazione viene digerito con etanolo e viene lasciato sotto agitazione per tutta la notte. In seguito si procede alla filtratazione, tenendo il solido e controllandolo con TLC (98/2 diclorometano/metanolo).

Si eliminano le tracce di etanolo presenti nel prodotto solido mediante pompa a vuoto.

Si ottiene in questo modo una polvere fine di colorazione marrone chiaro.

Caratterizzazione:



(3)

Formula molecolare: $C_{20}H_{17}N_3O_4$

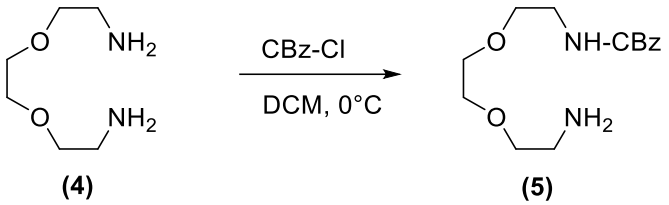
PM: 363.12 g/mol

Resa: 67.5%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ 7.71 – 7.63 (m, 8H), 3.74 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.93 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 1.33 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5 (C), 133.8 (CH), 132.2 (C), 123.2 (CH), 47.3 (CH_2), 37.6 (CH_2) ppm.

*Sintesi composto (**5**)*



(4) **(5)**

Procedimento:

In un pallone a 3 colli munito di termometro, imbuto gocciolatore e refrigerante ad aria viene agiunto **(4)** (24.7 mL, 0.169 mol) in diclorometano (200 mL), il pallone viene immerso in bagno di ghiaccio con NaCl e acetone per mantenere la temperatura a circa -10°C.

Viene addizionato nel pallone, molto lentamente (4-6 h), il benzil cloroformiato (6.00 mL, 0.0423 mol) in diclorometano (50 mL) mediante imbuto gocciolatore.

La reazione viene controllata in TLC (diclorometano/metanolo 98/2).

Il solvente viene rimosso con evaporatore rotante e il residuo viene disciolto in Et_2O (100 mL).

Si procede poi all'estrazione con HCl 3M, si opera un lavaggio con 50 mL di Et_2O per 2 volte, la fase acquosa viene raccolta e neutralizzata con NaOH fino a basificazione a pH 9, il controllo viene eseguito mediante pHmetro.

Si controlla con TLC (diclorometano/metanolo 95/5).

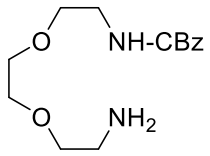
Successivamente si procede ad una estrazione finale con diclorometano 50 mL per 2 volte raccogliendo la fase organica.

Si svolge un'ultima TLC di controllo (diclorometano/metanolo 95/5).

Si anidrifica con Na_2SO_4 e si filtra.

Si evapora il solvente portandolo a secco con evaporatore rotante in modo da ottenere un olio giallo tenue.

Caratterizzazione:



(5)

Formula molecolare: $C_{14}H_{22}N_2O_4$

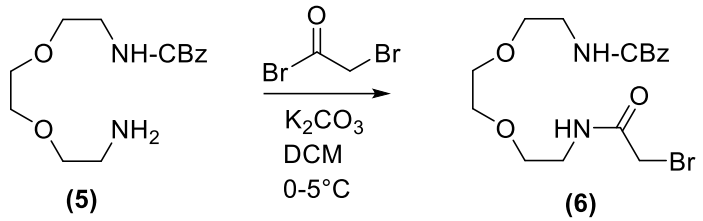
PM: 282.16 g/mol

Resa: 48.8%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 7.33 – 7.28 (m, 5H), 5.56 (br s, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.61 – 3.46 (m, 12H), 1.39 (s, 2H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 156.6 (C), 136.7 (C), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 73.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 66.7 (CH_2), 41.8 (CH_2), 41.0 (CH_2) ppm.

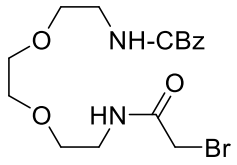
*Sintesi composto (**6**)*



Procedimento:

In un pallone a tre colli da 250 mL munito di termometro, refrigerante ad aria e imbuto gocciolatore da 10 mL si discioglie **(5)** (5.34 g, 0.0189 mol) in diclorometano (50 mL) e in K_2CO_3 (50 mL, 3.92 g in H_2O, 0.0284 mol).
A questa soluzione si gocciola lentamente il bromoacetil bromuro (1.65 mL 0.0189 mol) in diclorometano (5 ml) mediante un imbuto gocciolatore.
Il pallone deve essere raffreddato con un bagno di acqua e giaccio (0°C) e lasciato in agitazione magnetica tutta la notte (700 rpm).
Successivamente si controlla in TLC (diclorometano/metanolo 95/5) che la reazione sia conclusa e si prosegue all'estrazione del composto.
Si separano le fasi, la fase organica viene lavata con $NaHCO_3$ (2x40 mL), con HCl 0,1 M (1x40 mL) e con soluzione acquosa satura di cloruro di sodio (1x50 mL).
Si controlla con TLC che l'estrazione sia avvenuta correttamente e si anidrifica con Na_2SO_4, si filtra e si evapora il solvente con evaporatore rotante ottenendo un olio giallo-ambrato.

Caratterizzazione:



(6)

Formula molecolare: $C_{16}H_{23}BrN_2O_5$

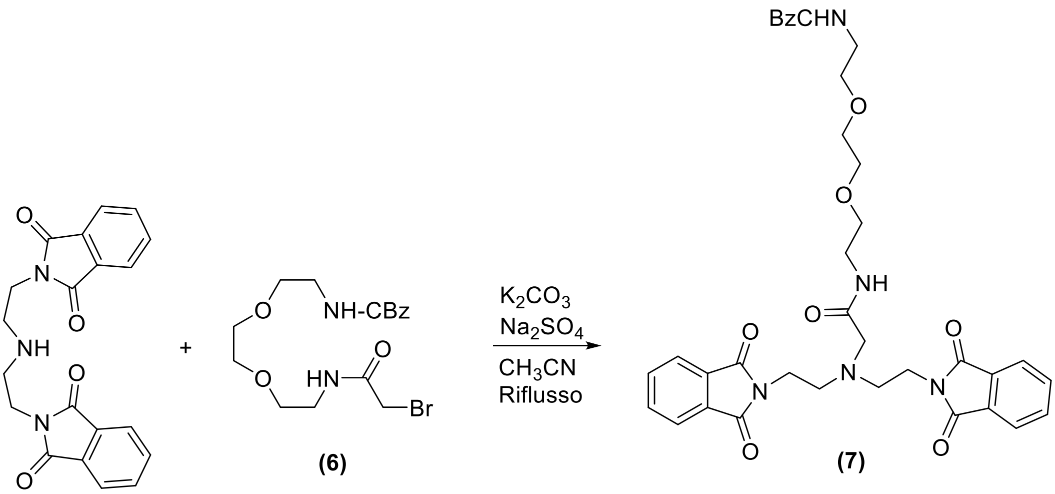
PM: 402.08 g/mol

Resa: 83.5%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 7.34 – 7.29 (m, 5H), 6.89 (br s, 1H), 5.32 (br s, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.61 – 3.36 (m, 12H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 165.7 (C), 156.5 (C), 136.6 (C), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 69.4 (CH_2), 66.8 (CH_2), 41.0 (CH_2), 40.0 (CH_2), 29.1 (CH_2) ppm.

*Sintesi composto (**7**)*



(3)

Procedimento:

In un pallone a 3 colli da 250 mL munito di imbuto gocciolatore da 25 mL, refrigerante a bolle e ancoretta magnetica si scioglie **(3)** (4.52 g, 0.0124 mol) in acetonitrile (50 mL), si scalda a riflusso (140°C) e si agita (500 rpm) fino a completa dissoluzione.

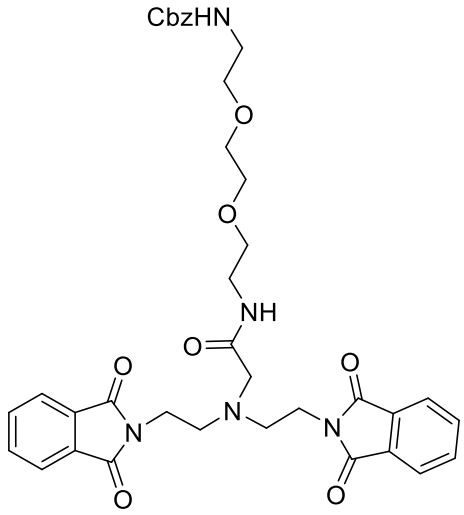
Quando il composto risulta completamente solubilizzato e limpido si aggiunge il K_2CO_3 (2.57 g) e Na_2SO_4 (0.200 g), dopodiché si fa gocciolare lentamente **(6)** (6.00 g, 0.0149 mol) nel pallone.

Dopo 4 ore si controlla su TLC l’andamento della reazione (diclorometano/metanolo 98/2 e una goccia di NH_3).

Si lascia la reazione a riflusso e in agitazione magnetica tutta la notte.

Successivamente si filtra il solido su Buchner, si lava con diclorometano e si procede all’estrazione mediante imbuto separatore. Si aggiungono 200 mL di H_2O e si lava la fase acquosa con diclorometano 100 mL per 3 volte, la fase organica viene poi trasferita in un pallone da 500 mL e evaporata mediante evaporatore rotante. Si procede alla separazione del grezzo mediante colonna con fase mobile (diclorometano/isopropanolo 98/2 e poi successivamente 95/5). Si ottiene un olio giallo-ambrato.

Caratterizzazione:



(7)

Formula molecolare: $C_{36}H_{39}N_5O_9$

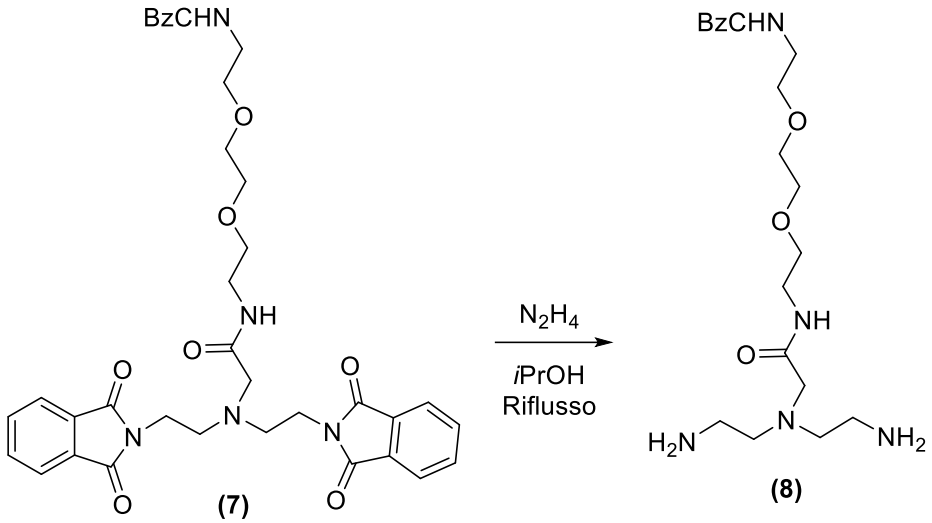
PM: 685.27 g/mol

Resa: 93.9%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 7.75 – 7.67 (m, 8H), 7.34 – 7.27 (m, 5H), 7.14 (br s, 1H), 5.46 (br s, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.72 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 3.56 – 3.51 (m, 6H), 3.43 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.37 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.28 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.22 (br s, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 298 K) *δ* 170.7 (C), 168.3 (C), 156.6 (C), 136.7 (C), 134.1 (CH), 132.1 (C), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 123.4 (CH), 70.5 (CH_2), 70.2 (2 CH_2), 69.6 (CH_2), 66.7 (CH_2), 59.2 (CH_2), 53.4 (CH_2), 41.0 (CH_2), 38.8 (CH_2), 36.1 (CH_2) ppm.

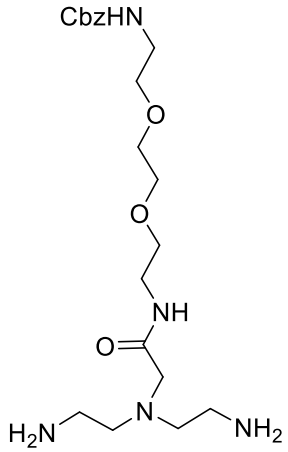
*Sintesi composto (**8**)*



Procedimento:

In un pallone da 10 mL munito di refrigerante a bolle, si solubilizza il composto **(7)** (0.100 g, $1.46 \cdot 10^{-4}$ mol) con isopropanolo (2 mL), si procede successivamente all'aggiunta di idrazina (0.0464 mL, $5.84 \cdot 10^{-4}$ mol).
La reazione viene scaldata a riflusso (100°C) per circa 2 ore.
Si controlla con TLC (diclorometano/isopropanolo 9/1 e una goccia di NH_3) per verificare la fine della reazione.
Il composto ottenuto viene fatto evaporare mediante evaporatore rotante. Si ottiene il prodotto sotto forma di un olio ambrato.

Caratterizzazione:



(8)

Formula molecolare: $C_{20}H_{35}N_5O_5$

PM: 425.26 g/mol

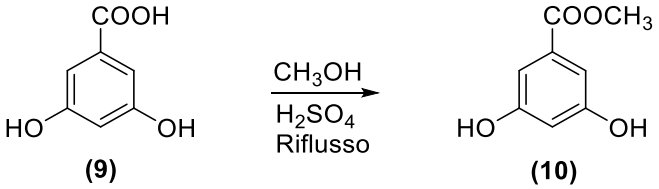
Resa: 64.1%

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, 298 K) *δ* 7.5 – 7.49 (m, 5H), 5.28 (s, 2H), 3.80 (br s, 4H), 3.75 – 3.71 (m, 4H), 3.53 – 3.49 (m, 4H), 3.31 (br s, 2H), 3.01 – 2.97 (m, 4H), 2.87 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.73 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD, 298 K) *δ* 161.5 (C), 158.8 (C), 138.4 (C), 129.5 (CH), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 73.0 (CH_2), 71.2 (CH_2), 70.9 (CH_2), 67.3 (CH_2), 59.6 (CH_2), 57.5 (CH_2), 49.8 (CH_2), 41.9 (CH_2), 41.7 (CH_2), 38.8 (CH_2) ppm.

5.3 Sintesi del dimero paramagnetico bifunzionale simmetrico

*Sintesi composto (**10**)*



Procedimento:

In un pallone da 250 mL munito di refrigerante a bolle si sospende **(9)** (12.00 g, 0.0779 mol) in metanolo (100 mL).

Si addiziona l'H_2SO_4 concentrato 94-98% (2.50 mL, 0.0466 mol) e si scalda a riflusso per tutta la notte.

Si controlla la fine della reazione con TLC (diclorometano/metanolo 95/5).

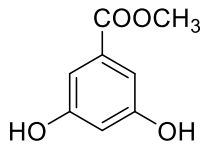
Il grezzo di reazione viene portato a secco con evaporatore rotante, il solido risultante viene sciolto in diclorometano (50 mL) e H_2O (50 mL).

Si procede mediante imbuto separatore all'estrazione della fase acquosa con 3x25 mL lavaggi di diclorometano e infine con un lavaggio con soluzione acquosa satura di cloruro di sodio.

Si anidrifica con Na_2SO_4, si filtra e si evapora il solvente con evaporatore rotante.

Si ottiene un solido bianco-giallo tenue.

Caratterizzazione:



(10)

Formula molecolare: $C_8H_8O_4$

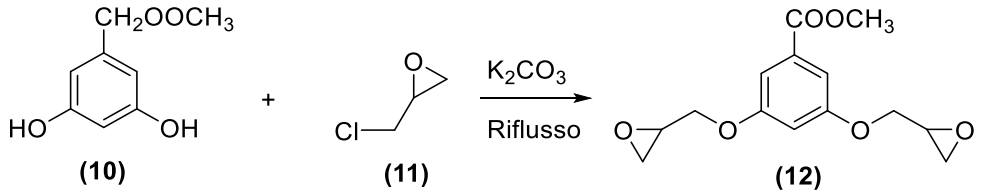
PM: 168.04 g/mol

Resa: 80.4%

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, 298 K) *δ* 6.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.47 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD, 298 K) δ 168.7 (C), 159.8 (C), 133.0 (C), 108.8 (CH), 108.3 (CH), 52.5 (CH_3) ppm.

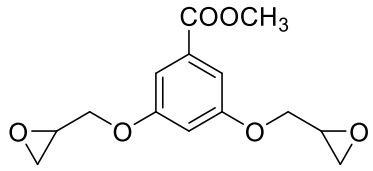
*Sintesi composto (**12**)*



Procedimento:

In un pallone a due colli da 100 mL munito di refrigerante a bolle, si aggiunge **(10)** (3.00 g, 0.0178 mol) e il K_2CO_3 (eq. 3, 0.0535 mol).
Mediante imbuto gocciolatore e lenta aggiunta si addiziona **(11)** (eq. 2.2, 3.08 mL, 0.0393 mol) sotto agitazione magnetica.
Si scalda la reazione a riflusso (130°C).
Si controlla la fine della reazione su TLC (9/1 diclorometano/metanolo) e si procede all'estrazione con imbuto separatore in diclorometano e H_2O con 3x25 mL di diclorometano raccogliendo la fase organica.
Si anidrifica con Na_2SO_4 e si evapora il solvente con evaporatore rotante.
Si purifica il grezzo di reazione con colonna su fase mobile (EtOAc/petroletere 9/1).

Caratterizzazione:



(12)

Formula molecolare: $C_{14}H_{16}O_6$

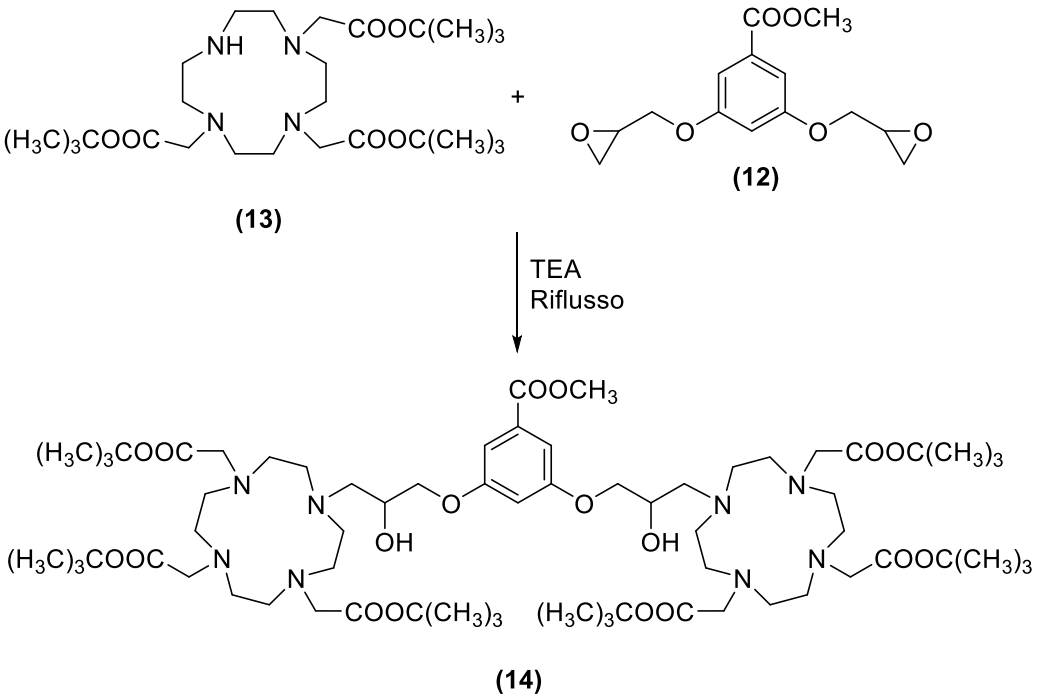
PM: 280.09 g/mol

Resa: 68.7%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ 7.19 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.70 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 11.0, 2.9 Hz, 2H), 3.93 (dd, J = 11.1, 5.8 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.35 - 3.32 (m, 2H), 2.89 (dd, J = 4.9, 4.1 Hz, 2H), 2.74 (dd, J = 4.9, 2.6 Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ 166.6 (C), 159.6 (C), 132.2 (C), 108.4 (CH), 107.1 (CH), 69.2 (CH_2), 52.4 (CH), 50.0 (CH_3), 44.7 (CH_2) ppm.

*Sintesi composto (**14**)*



(13) **(12)** **(14)**

Procedimento:

In un pallone da 50 mL munito di refrigerante a bolle, si addiziona a **(12)** (100.00 mg, $8.92 \cdot 10^{-4}$ mol) disciolto in 30 mL di acetonitrile (30 mL), il reattivo **(13)** (eq. 2.5, 0.00223 mol) e trietilammina (0.25 mL, eq. 2, 0.00178 mol).

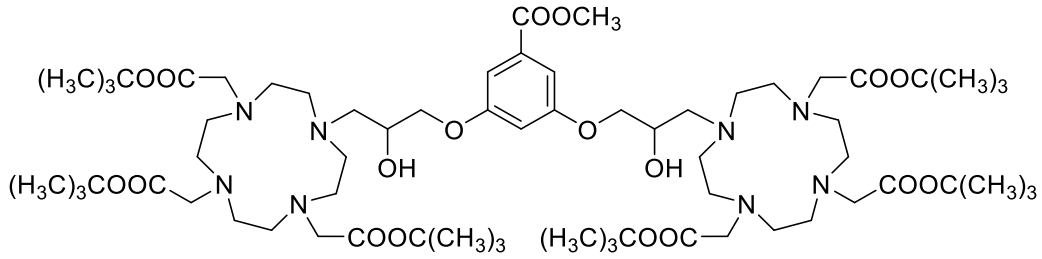
Si scalda a riflusso la reazione a 100°C per tutta la notte.

Si controlla la fine della reazione su TLC (diclorometano/metanolo 9/1 con 1 gg di NH_3).

Infine si conclude con purificazione tramite colonna in gradiente (inizialmente, 95/5 diclorometano/metanolo + 0,1% NH_3, procedendo fino a 9/1/0.1).

Si ottiene una polvere fine giallo-chiara.

Caratterizzazione:



(14)

Formula molecolare: $C_{66}H_{116}N_8O_{18}$

PM: 1308.84 g/mol

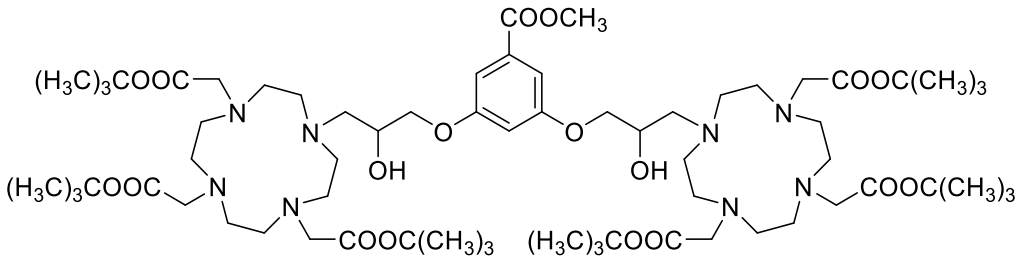
Resa: 33.8%

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ 7.10 - 7.08 (m, 2H), 7.00 - 6.97 (m, 1H), 4.84 (d, *J* = 36.3 Hz, 2H), 4.37 - 4.32 (m, 2H), 4.24 (br s, 2H), 4.08 - 4.02 (m, 2H), 3.86 – 3.85 (m, 3H), 3.70 (t, *J* = 16.1 Hz, 2H), 3.47 - 3.46 (m, 2H), 3.38 – 3.22 (m, 6H), 3.11 – 2.80 (m, 20H), 2.54 (t, *J* = 13.0 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 13.1 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 12.8 Hz, 6H), 2.19 – 2.03 (m, 8H), 1.49 – 1.42 (m, 54H) ppm.

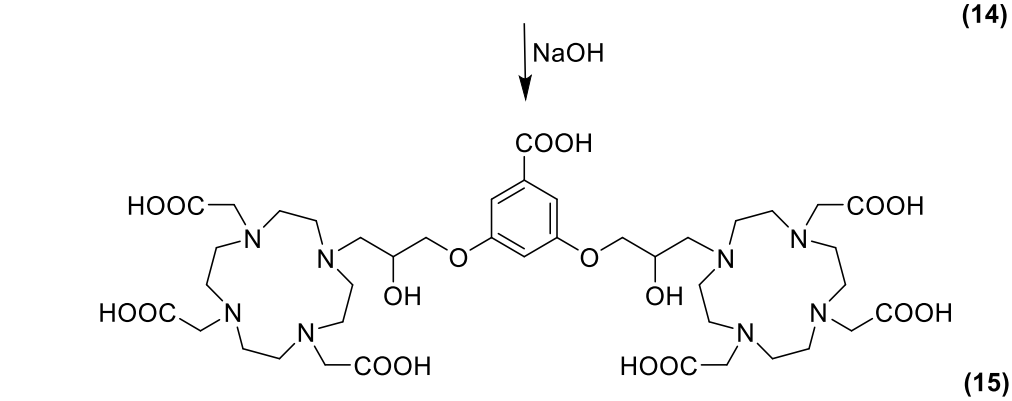
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 298 K) δ 173.1 (C), 172.3 (C), 166.9 (C), 160.0 (C), 131.7 (C), 109.3 (CH), 105.4 (CH), 82.6 (C), 82.3 (C), 71.7 (CH_2), 56.8 (CH_2), 56.7 (CH_2), 56.6 (CH_2), 55.6 (CH_2), 52.7 (CH_2), 52.2 (CH), 52.1 (CH_3), 49.4 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.3 (CH_3), 28.1 (CH_3) ppm.

HRMS (ESI$^+$): m/z = 655.42715 ($[M+2H]^{2+}$). Calc. For $C_{66}H_{116}N_8O_{18}+2H^+$: 655.42766.

*Sintesi composto (**15**)*



(14)



(15)

Procedimento:

In un pallone da 10 mL, si solubilizza **(14)** (100.00 mg, $7.73 \cdot 10^{-5}$ mol) con CH_3OH (3 mL), a questo, viene addizionata l'NaOH 2M (0.0365 µL, eq. 10, $7.73 \cdot 10^{-4}$ mol) mediante micropipetta.

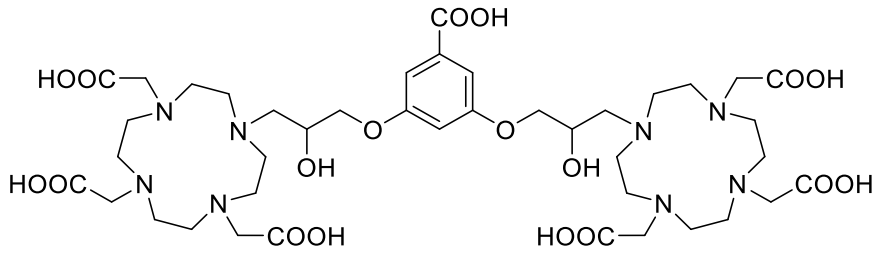
Si lascia in agitazione la reazione con ancoretta magnetica per tutta la giornata.

Si procede all'evaporazione del solvente con evaporatore rotante e successivamente con pompa ad alto vuoto.

Si ottiene una polvere fine giallo-chiara.

Il composto ottenuto viene analizzato con spettrometria di massa HRMS.

Caratterizzazione:



(15)

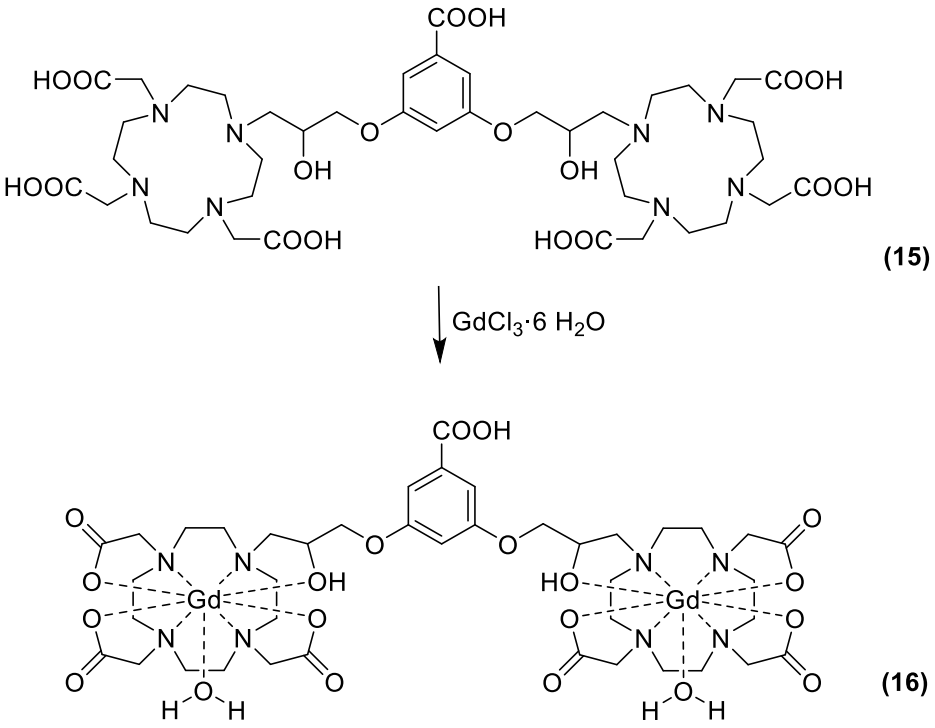
Formula molecolare: $C_{41}H_{66}N_8O_{18}$

PM: 958.45 g/mol

Resa: 70.5%

HRMS (ESI-): m/z = 957.44107 ([M-H]-). Calc. For $C_{41}H_{66}N_8O_{18}$-H^+: 957.44223

*Sintesi composto (**16**)*



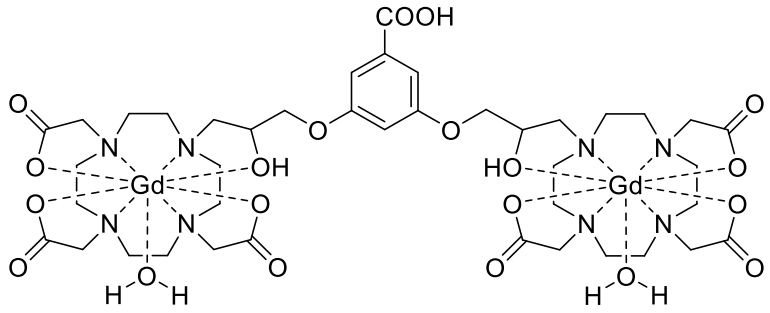
Procedimento:

In una provetta da centrifuga si addiziona al $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.195 g, eq. 4, $4.17 \cdot 10^{-4}$ mol) pochi mL di NaOH 2 M, si procede dunque alla centrifugazione. Il precipitato formato si raccoglie e si elimina il surnatante acquoso digerito. Si risciacqua con H_2O e si centrifuga più volte consecutivamente, controllando ad ogni ciclo, la parte acquosa con prova argentometrica mediante $AgNO_3$ fino ad una completa scomparsa dei cloruri.

Quando non è più presente precipitato, si raccoglie la polvere precipitata e la si unisce in un pallone da 50 mL a **(15)** (100.00 mg, $1.04 \cdot 10^{-4}$ mol) totalmente sbloccato. Si porta il pH a circa 7 con HCl e successivamente si scalda la reazione per 5 ore a 90°C in bagno ad olio.

Si procede con un controllo del composto ottenuto mediante spettrometria di massa HRMS.

Caratterizzazione:



(16)

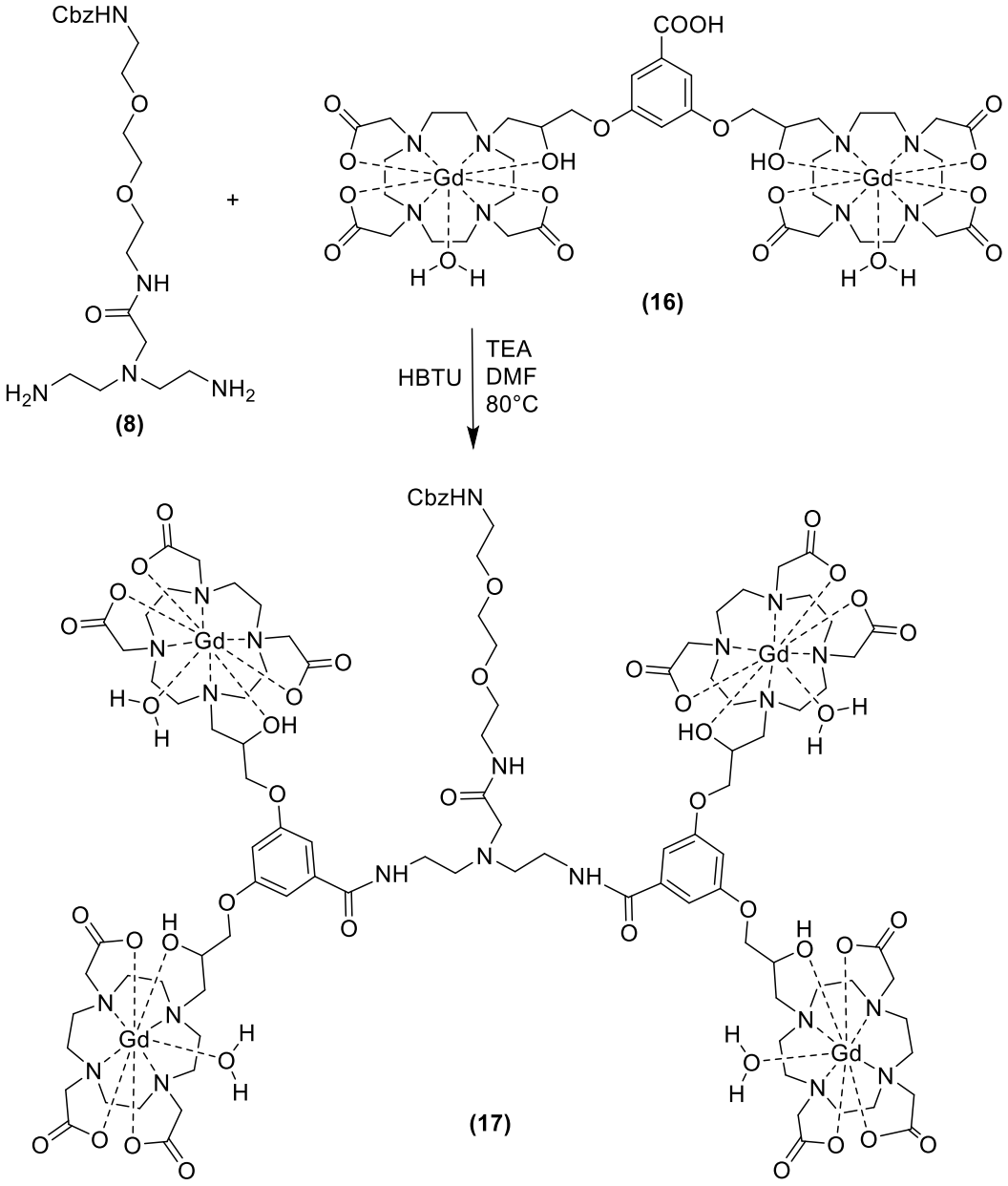
Formula molecolare: $[C_{41}H_{58}Gd_2N_8O_{18}]^{2-}$

PM: 1266.23 g/mol

Resa: 47.7%

HRMS (ESI$^-$): m/z = 632.12015 ($[M-2H]^{2-}$). Calc. For $C_{41}H_{60}Gd_2N_8O_{18}$-$2H^+$: 632.11711.

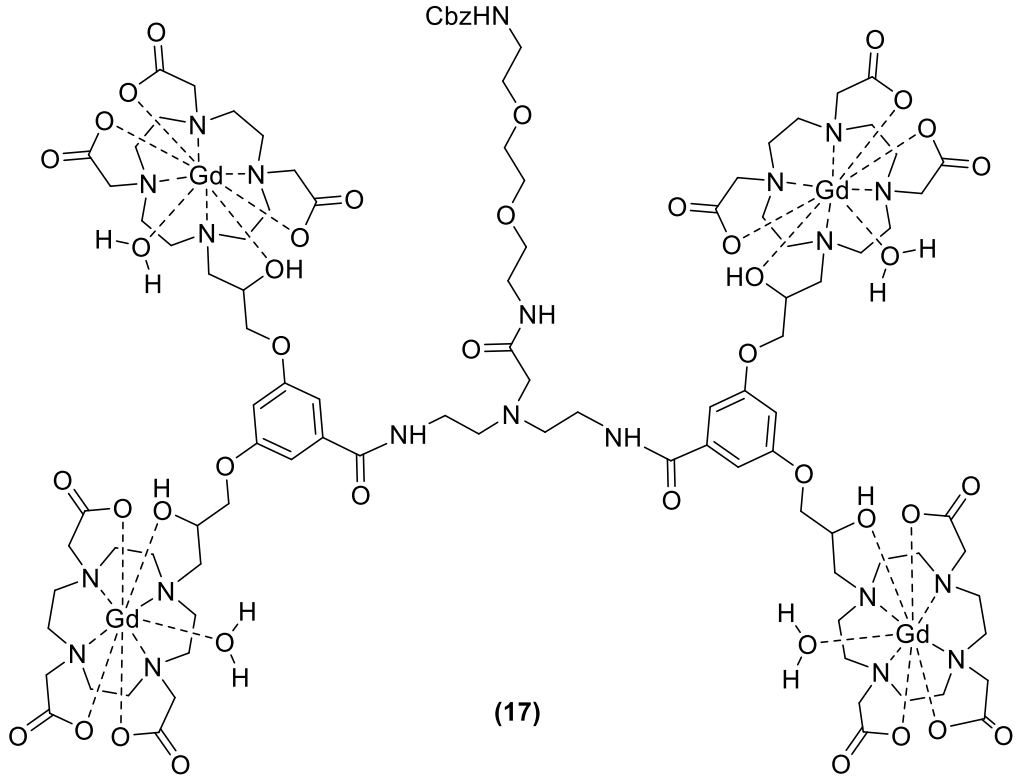
*Sintesi sonda tetramerica simmetrica (**17**)*



Procedimento:

In un pallone da 10 mL si sospende (**16)** (63.00 mg, eq. 2, $4.98 \cdot 10^{-5}$ mol) in DMF (2 mL). Si aggiunge successivamente **(8)** (10.50 mg, eq. 0.5, $2.49 \cdot 10^{-5}$ mol) e trietilammina (0.0104 mL, eq. 3, $2.49 \cdot 10^{-5}$ mol). Infine si addiziona in piccole porzioni l'HBTU (0.0283 g, eq. 3, $7.47 \cdot 10^{-5}$ mol) e si procede a scaldare la reazione a 80°C per 5 h. La miscela di reazione viene evaporata mediante pompa ad alto vuoto ottenendo una polvere grigio-gialla.
Il composto viene infine caratterizzato con spettrometria di massa HRMS.

Caratterizzazione:



(17)

Formula molecolare: $[C_{102}H_{147}Gd_4N_{21}O_{39}]^{4-}$

PM: 2921.72 g/mol

Resa: 26.9%

HRMS (ESI$^-$): m/z = 730.18188 ($[M-4H]^{4-}$). Calc. For $C_{102}H_{151}Gd_4N_{21}O_{39}$-$4H^+$: 730.17995 ($\Delta$ = 2.6 ppm).

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA

(1) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363.

(2) Brown, M. A.; Semelka, R. C. *MRI: Basic Principles and Applications*, Subsequent edizione.; Wiley-Liss: Hoboken, N.J, 2003.

(3) Hornak, J. *The Basics of MRI*; 1996.

(4) Günther, H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3rd edition.; Wiley-VCH: Newark, 2013.

(5) McRobbie, D. W.; Moore, E. A.; Graves, M. J.; Prince, M. R. *MRI from Picture to Proton*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2006. https://doi.org/10.1017/CBO9780511545405.

(6) Lauffer, R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **1987**, *87* (5), 901–927.

(7) Cotton, F. A.; Grimes, R. N. *Advanced Inorganic Chemistry*, Subsequent edizione.; Wiley-Interscience: New York Weinheim, 1999.

(8) Pan, D.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. Manganese-Based MRI Contrast Agents: Past, Present and Future. *Tetrahedron* **2011**, *67* (44), 8431–8444. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.076.

(9) Drahoš, B.; Lukeš, I.; Tóth, É. Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (12), 1975–1986. https://doi.org/10.1002/ejic.201101336.

(10) Botta, M.; Carniato, F.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tei, L. Mn(II) Compounds as an Alternative to Gd-Based MRI Probes. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (12), 1461–1483. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0608.

(11) Richardson, N.; Davies, J. A.; Radüchel, B. Iron(III)-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Polyhedron* **1999**, *18* (19), 2457–2482. https://doi.org/10.1016/S0277-5387(99)00151-5.

(12) Kuźnik, N.; Wyskocka, M. Iron(III) Contrast Agent Candidates for MRI: A Survey of the Structure–Effect Relationship in the Last 15 -Years of Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (4), 445–458. https://doi.org/10.1002/ejic.201501166.

(13) Chen, S.; An, L.; Yang, S. Low-Molecular-Weight Fe(III) Complexes for MRI Contrast Agents. *Molecules* **2022**, *27* (14), 4573. https://doi.org/10.3390/molecules27144573.

(14) Baranyai, Z.; Carniato, F.; Nucera, A.; Horváth, D.; Tei, L.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M. Defining the Conditions for the Development of the Emerging Class of FeIII-Based MRI Contrast Agents. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (33), 11138–11145. https://doi.org/10.1039/D1SC02200H.

(15) Mellor, D. P. Preface. In *Chelating Agents and Metal Chelates*; Dwyer, F. P., Mellor, D. P., Eds.; Academic Press, 1964; p ix. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395499-2.50005-0.
(16) Viola-Villegas, N.; Doyle, R. P. The Coordination Chemistry of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N′,N″,N‴-Tetraacetic Acid (H4DOTA): Structural Overview and Analyses on Structure–Stability Relationships. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (13), 1906–1925. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.013.
(17) Stasiuk, G. J.; Long, N. J. The Ubiquitous DOTA and Its Derivatives: The Impact of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid on Biomedical Imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (27), 2732–2746. https://doi.org/10.1039/C3CC38507H.
(18) Travagin, F.; Lattuada, L.; Giovenzana, G. B. AAZTA: The Rise of Mesocyclic Chelating Agents for Metal Coordination in Medicine. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *438*, 213908. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213908.
(19) Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. [Gd-AAZTA]-: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (24), 7588–7590. https://doi.org/10.1021/ic0489692.
(20) Minazzi, P.; Lattuada, L.; Menegotto, I. G.; Giovenzana, G. B. An Enzymatic Approach to Bifunctional Chelating Agents. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (35), 6915–6921. https://doi.org/10.1039/C4OB00810C.
(21) Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. B.; Tei, L. The Synthesis and Application of Polyamino Polycarboxylic Bifunctional Chelating Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 3019–3049. https://doi.org/10.1039/C0CS00199F.
(22) Giovenzana, G. B.; Lattuada, L.; Negri, R. Recent Advances in Bifunctional Paramagnetic Chelates for MRI. *Isr. J. Chem.* **2017**, *57* (9), 825–832. https://doi.org/10.1002/ijch.201700028.
(23) Ljubimova, J. Y.; Sun, T.; Mashouf, L.; Ljubimov, A. V.; Israel, L. L.; Ljubimov, V. A.; Falahatian, V.; Holler, E. Covalent Nano Delivery Systems for Selective Imaging and Treatment of Brain Tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *113*, 177–200. https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.002.
(24) Min, J.; Jung, H.; Shin, H.-H.; Cho, G.; Cho, H.; Kang, S. Implementation of P22 Viral Capsids As Intravascular Magnetic Resonance T1 Contrast Conjugates via Site-Selective Attachment of Gd(III)-Chelating Agents. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (7), 2332–2339. https://doi.org/10.1021/bm400461j.
(25) Sukerkar, P. A.; MacRenaris, K. W.; Townsend, T. R.; Ahmed, R. A.; Burdette, J. E.; Meade, T. J. Synthesis and Biological Evaluation of Water-Soluble Progesterone-Conjugated Probes for Magnetic Resonance Imaging of Hormone Related Cancers. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (11), 2304–2316. https://doi.org/10.1021/bc2003555.

(26) Kock, F. V. C.; Forgács, A.; Guidolin, N.; Stefania, R.; Vágner, A.; Gianolio, E.; Aime, S.; Baranyai, Z. [Gd(AAZTA)]− Derivatives with n-Alkyl Acid Side Chains Show Improved Properties for Their Application as MRI Contrast Agents. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27* (5), 1849–1859. https://doi.org/10.1002/chem.202004479.
(27) Weissleder, R.; Mahmood, U. Molecular Imaging. *Radiology* **2001**, *219* (2), 316–333. https://doi.org/10.1148/radiology.219.2.r01ma19316.
(28) Hennrich, U.; Benešová, M. [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (3), 38. https://doi.org/10.3390/ph13030038.
(29) Research, C. for D. E. and. FDA Approves Imaging Drug to Assist in Detection of Cancerous Tissue Following Lumpectomy. *FDA* **2024**.
(30) Capuana, F.; Phinikaridou, A.; Stefania, R.; Padovan, S.; Lavin, B.; Lacerda, S.; Almouazen, E.; Chevalier, Y.; Heinrich-Balard, L.; Botnar, R. M.; Aime, S.; Digilio, G. Imaging of Dysfunctional Elastogenesis in Atherosclerosis Using an Improved Gadolinium-Based Tetrameric MRI Probe Targeted to Tropoelastin. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (20), 15250–15261. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01286.
(31) Phinikaridou, A.; Lacerda, S.; Lavin, B.; Andia, M. E.; Smith, A.; Saha, P.; Botnar, R. M. Tropoelastin: A Novel Marker for Plaque Progression and Instability. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2018**, *11* (8), e007303. https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007303.
(32) Tripepi, M.; Capuana, F.; Gianolio, E.; Kock, F. V. C.; Pagoto, A.; Stefania, R.; Digilio, G.; Aime, S. Synthesis of High Relaxivity Gadolinium AAZTA Tetramers as Building Blocks for Bioconjugation. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (4), 1428–1437. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00120.
(33) Ladd, D. L.; Hollister, R.; Peng, X.; Wei, D.; Wu, G.; Delecki, D.; Snow, R. A.; Toner, J. L.; Kellar, K.; Eck, J.; Desai, V. C.; Raymond, G.; Kinter, L. B.; Desser, T. S.; Rubin, D. L. Polymeric Gadolinium Chelate Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents: Design, Synthesis, and Properties. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (3), 361–370. https://doi.org/10.1021/bc980086+.
(34) Geninatti Crich; Cabella, C.; Barge, A.; Belfiore, S.; Ghirelli, C.; Lattuada, L.; Lanzardo, S.; Mortillaro, A.; Tei, L.; Visigalli, M.; Forni, G.; Aime, S. In Vitro and in Vivo Magnetic Resonance Detection of Tumor Cells by Targeting Glutamine Transporters with Gd-Based Probes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (16), 4926–4936. https://doi.org/10.1021/jm0601093.
(35) Anelli, P. L.; Lunazzi, L.; Montanari, F.; Quici, S. Doubly and Triply Bridged Polyoxapolyazaheterophanes Derived from 2,4,6-Trichloro-s-Triazine. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (22), 4197–4203. https://doi.org/10.1021/jo00196a019.
(36) Zhu, H.; Xu, X.; Cui, W.; Zhang, Y.; Mo, H.; Shen, Y.-M. Synthesis and Characterization of Well-Defined Lactic Acid–PEG Cooligomers and Its Tricarbonyl Rhenium Conjugates. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2011**, *49* (8), 1745–1752. https://doi.org/10.1002/pola.24592.

(37) Kumar, K.; Tweedle, M.; Brittain, H. G. Gadoteridol. In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*; Brittain, H. G., Ed.; Academic Press, 1996; Vol. 24, pp 209–241. https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60694-2.
(38) Hirao, A.; Higashihara, T.; Nagura, M.; Sakurai, T. Successive Synthesis of Well-Defined Many Arm Star-Branched Polymers by an Iterative Methodology Using a Specially Designed 1,1-Diphenylethylene. *Macromolecules* **2006**, *39* (18), 6081–6091. https://doi.org/10.1021/ma061075b.
(39) Gadwal, I.; Khan, A. Multiply Functionalized Dendrimers: Protective-Group-Free Synthesis through Sequential Thiol-Epoxy 'Click' Chemistry and Esterification Reaction. *RSC Adv.* **2015**, *5* (55), 43961–43964. https://doi.org/10.1039/C5RA05820A.

RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo percorso, desidero esprimere la mia più profonda gratitudine a coloro che, in modi diversi, hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi e mi hanno accompagnato lungo il cammino.
Un grazie speciale al team di Cage Chemicals – Camilla, Paolo e Ivan – per i mesi trascorsi insieme, per il supporto, la collaborazione e per tutto ciò che ho imparato. Il vostro aiuto e la vostra compagnia hanno reso questa esperienza non solo formativa, ma anche piacevole e stimolante.
Un ringraziamento va a Fabio, soprattutto per le fasi finali della tesi. Grazie per la tua disponibilità, la tua gentilezza e per avermi aiutato quando più ne avevo bisogno.
Un pensiero speciale va alla mia famiglia. A mia mamma Stefania, che con amore e pazienza mi ha sostenuto in ogni fase di questo percorso. A mio papà Giorgio, per tutte le ore trascorse insieme tra interrogazioni, ripassi e studio: se sono arrivato fin qui, è anche grazie a te. E alla mia compagna Camilla, per il suo sostegno incondizionato, sia morale che pratico. Grazie per aver creduto in me anche nei momenti più difficili e per avermi dato la forza di andare avanti.
A voi dedico questi anni di studio. In particolare, questa tesi la dedico a mio papà, che in parte ha assorbito per osmosi tutto ciò che ho imparato in questi anni… un po' ti laurei anche tu con me!

A tutti voi, il mio più sincero grazie.