



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Università degli studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Anno Accademico 2023/2024

Studi di radiomarcatura di complessi di ioni metallici trivalenti con ^{18}F per applicazioni di medicina nucleare

Relatore: Prof. Lorenzo Tei

Co-relatore: Prof. Calogero D'Alessandria

Secondo co-relatore: Dott. Jacopo Ferro

Candidato:

Elena Bertora

20033692

INDICE:

Capitolo 1: introduzione

- 1.1 Radioattività e radionuclidi
- 1.2 Radiofarmaci
- 1.3 Tecniche di imaging PET e SPECT
- 1.4 Radionuclidi per diagnostica, terapia e teranostica
- 1.5 Agenti targeting

Capitolo 2: ^{18}F e radiotraccianti e radiotraccianti per PET

- 2.1 Proprietà del ^{18}F
- 2.2 Esempi sintetici di composti con il legame C- ^{18}F
- 2.3 Radiotraccianti inorganici
- 2.4 Chelanti bifunzionali per imaging PET

Capitolo 3: Obiettivo della tesi

Capitolo 4: Parte sperimentale, sintesi dei complessi DO2A2Ind e AAZ2A2Ind

- 4.1 Materiali e metodi
- 4.2 Sintesi di tert-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato Sintesi del legante DO2A2Ind
- 4.3 Sintesi del legante DO2A2Ind
- 4.4 Sintesi del legante AAZ2A2Ind
- 4.5 Preparazione dei complessi di DO2A2Ind

Capitolo 5: Parte sperimentale: radiosintesi ed esperimenti di stabilità

- 5.1 Materiali e metodi
- 5.2 Analisi preliminare della soluzione ^{18}F

- 5.3 Sintesi del complesso ternario [Sc(III) DO2A2Ind]₂-¹⁹F] e marcatura con ¹⁸F
- 5.4 Sintesi del complesso ternario [Y(III) DO2A2Ind]₂-¹⁹F] e marcatura con ¹⁸F
- 5.5 Sintesi del complesso ternario [Tb(III) DO2A2Ind]₂-¹⁹F] e marcatura con ¹⁸F
- 5.6 Sintesi del complesso ternario [Lu(III) DO2A2Ind]₂-¹⁹F] e marcatura con ¹⁸F

Capitolo 6: Risultati e discussione sui processi di sintesi

- 6.1 Sintesi di *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato
- 6.2 Sintesi del legante DO2A2Ind
- 6.3 Sintesi del legante AAZ2AInd

Capitolo 7: risultati e discussione: radiomarcatura ed esperimenti di stabilità

- 7.1 Sintesi dei complessi M(III)-DO2A2Ind-¹⁹F
- 7.2 Radiomarcatura ¹⁸F-Y(III)DO2A2Ind
- 7.3 Test di stabilità nel tempo ¹⁸F-Y(III) DO2A2Ind
- 7.4 Radiomarcatura ¹⁸F- Tb(III) DO2A2Ind
- 7.5 Test di stabilità nel tempo ¹⁸F-Tb(III) DO2A2Ind
- 7.6 Radiomarcatura ¹⁸F- Lu(III) DO2A2Ind
- 7.7 Test di stabilità nel tempo ¹⁸F-Lu(III) DO2A2Ind

Capitolo 8: Conclusioni e prospettive future

Capitolo 9: Bibliografia

Capitolo 1: INTRODUZIONE

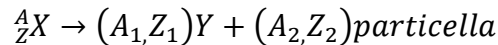
1.1 Radioattività e radionuclidi

Nel 1896 il fisico francese Henri Becquerel analizzando dei minerali contenenti uranio, scoprì che, essi anche se conservati in luoghi senza luce erano in grado di emettere una *radiazione* che poteva impressionare una lastra fotografica ^[1]. Tuttavia, egli non riuscì subito a trarre le giuste conclusioni ma si limitò a considerare tale fenomeno come un esempio di fluorescenza, ovvero l'emissione di luce visibile, a seguito di eccitazione, da parte di determinate sostanze. Successivamente, grazie alla collaborazione con i coniugi Marie e Pierre Curie, si notò un comportamento simile per altri minerali che contenevano, per esempio, torio. Investigando il fenomeno capirono ben presto che non si trattava di fluorescenza, come aveva ipotizzato Becquerel, bensì di un processo per il quale alcuni elementi erano in grado di emettere radiazioni direttamente proporzionali alla concentrazione dell'elemento contenuto nel minerale. I Curie nel 1898 definirono il comportamento di tali minerali con il termine *radioattività* e che questo non veniva influenzato da agenti esterni (temperatura, pressione o condizioni chimico fisiche) ma era intrinseco dell'elemento. Nel 1902 Rutherford e Soddy investigarono il fenomeno e effettuarono un'altra scoperta degna di nota: il decadimento del radio portava alla trasformazione in un altro elemento. A seguito di queste scoperte si riuscì a definire correttamente il termine radioattività come l'emissione di radiazione attraverso il decadimento spontaneo di un nuclide instabile, il quale si trasforma nel nuclide di un diverso elemento ^[2]. Elementi naturali subiscono decadimento radioattivo e l'emissione di radiazione è una conseguenza naturale del processo temporale di uno specifico elemento; soltanto negli ultimi cento anni sono stati sviluppati dei metodi per produrre artificialmente nuclidi instabili in grado di generare radiazione. L'effetto della radiazione, seppur in grandi casi negativa, può risultare efficace ad uso medico, in diagnostica e terapia.

Un nuclide è definito come un atomo caratterizzato dalla combinazione di uno specifico numero di protoni e neutroni. È possibile rappresentarlo attraverso la forma A_ZX dove Z rappresenta il numero atomico, ovvero il numero dei protoni (p^+) presenti nel nucleo di un atomo, ed A il numero di massa, nonché la somma dei protoni e dei neutroni (N). Un radionuclide è un nuclide dotato di caratteristiche radioattive: risulta instabile e decade, trasformandosi in un altro elemento, emettendo radiazioni. In natura, esistono degli atomi aventi lo stesso numero atomico ma differente numero di neutroni e quindi di massa, questi prendono il nome di radioisotopi che possono anche essere prodotti artificialmente. Lo sbilanciamento dei neutroni rispetto al numero di protoni trasferisce al nucleo un eccesso di energia che dovrà in qualche essere rilasciata attraverso il processo di decadimento,

emettendo radiazioni nella forma di particelle (particelle alfa (α) beta (β)) o radiazione elettromagnetica (raggi gamma (γ)).

Un nuclide “genitore” (X) nel processo di decadimento genera un nuclide “figlio” (Y), una particella e/o una radiazione relativa al determinato processo. Il fenomeno di decadimento è descritto dalla seguente formula:



In ogni trasformazione nucleare, devono essere conservate delle grandezze fisiche, quali: l'energia totale, il momento, la carica, il numero atomico ed il numero di massa atomica. L'energia totale delle particelle rilasciate nel processo di trasformazione corrisponde alla diminuzione dell'energia a riposo dell'atomo neutro, dal genitore X al figlio Y. L'energia di decadimento, denominata dal valore Q, è definibile come:

$$Q = [M(X) - M(Y) - m]c^2$$

Dove M(X), M(Y), m sono le masse nucleari a riposo dell'isotopo genitore, del figlio e delle particelle emesse.

Il processo è definibile come esoergonico, ovvero i reagenti sono dotati di energia superiore rispetto ai prodotti. Affinché il processo di decadimento sia possibile $Q > 0$. L'equivalente energetico del valore di Q viene condiviso come energia cinetica tra le particelle emesse nel processo di decadimento e il prodotto figlio. Poiché il prodotto figlio ha generalmente una massa minore rispetto alle altre particelle emesse, l'energia cinetica acquisita dal prodotto figlio è relativamente trascurabile [3].

Ciascun radionuclide ha una propria velocità di decadimento caratteristica che sarà indipendente dalla natura del campione in cui si trova. Fino a poco tempo fa il Sistema Internazionale usava, come unità di misura per la radioattività, il Curie (Ci) che corrisponde al numero di disintegrazioni al secondo di un grammo di radio che è pari a 3.7×10^{10} d/s. Tuttavia, il Ci è stato sostituito da un'altra unità misura nel SI (Sistema internazionale di misura), il Becquerel (Bq), il quale rappresenta una disintegrazione al secondo: $1\text{Bq} = 1\text{d/s}$. L'attività, o velocità di decadimento, di un elemento è il rapporto tra la variazione del numero di nuclei genitori (N) e il tempo (t).

$$\text{Velocità di decadimento (A)} = - \frac{\Delta N}{\Delta t}$$

Il numero di decadimenti per unità di tempo è proporzionale al numero di nuclei presenti:

$$A = k \times N$$

La costante di decadimento è rappresentata da k ed è caratteristica per ciascun nuclide. Combinando le equazioni otteniamo:

$$A = -\frac{\Delta N}{\Delta t} = k \times N$$

A valori elevati di k si troveranno alti valori di A , velocità di decadimento. Quindi il processo radioattivo è un processo del primo ordine rispetto al numero di nuclei.

Altra grandezza fondamentale è tempo di emivita ($t_{1/2}$), ovvero il tempo che impiega un determinato nuclide a dimezzare la sua attività radioattiva [1]. Il tempo di emivita segue un andamento esponenziale, in modo che in ogni emivita l'attività sia dimezzata, andando a zero matematicamente solo per tempi infiniti. (figura 1.1).

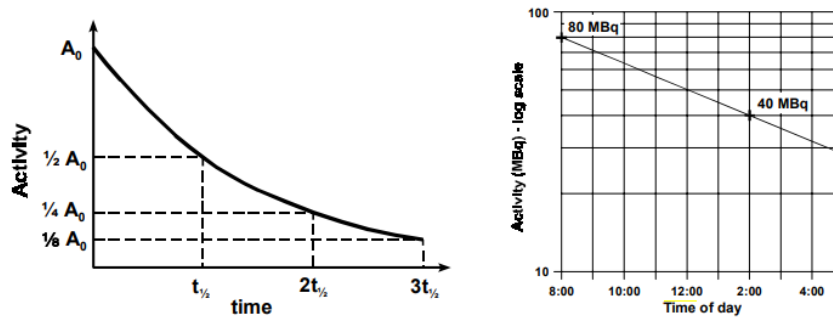


Figura 1.1: andamento esponenziale del tempo di emivita [1]

Il tempo di emivita è inversamente proporzionale alla costante di decadimento ma indipendente dal numero dei nuclei:

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

Attraverso metodi matematici si ottiene un'espressione che permette di calcolare i nuclei rimanenti dopo un certo tempo t :

$$\ln \frac{N_0}{N_t} = kt$$

Dove N_0 rappresenta il numero di nuclei al tempo $t = 0$; N_t il numero dei nuclei al tempo t .

La stabilità di un nuclide è determinata da alcuni fattori: il numero dei neutroni (N); il numero dei protoni (Z) ed il loro rapporto (N/Z). Attraverso l'utilizzo della tavola di Karlsruhe, riportata nella figura 1.2, è possibile analizzare la stabilità dei nuclidi in relazione al rapporto N/Z .

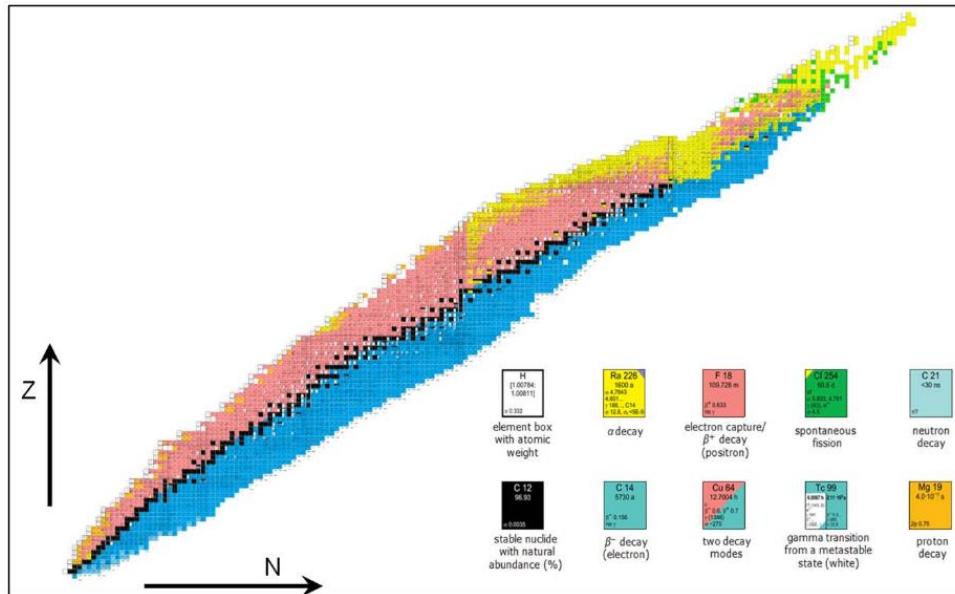


Figura 1.2: tavola dei nuclidi di Karlsruhe [4].

Attraverso questo grafico è possibile attuare delle considerazioni:

- Tutti i nuclidi con $Z > 83$ sono instabili perché hanno un numero troppo elevato di protoni
- Il nuclide stabile a più alto peso e numero atomico risulta ${}^{209}_{83}\text{Bi}$
- I nuclidi più leggeri sono stabili ed hanno $N=Z$, formeranno quindi una fascia di stabilità (o linea di stabilità) per $N/Z=1$;
- Il rapporto N/Z dei nuclidi stabili aumenta gradualmente all'aumentare di Z . Per nuclidi più pesanti $N > Z$ e perciò $N/Z > 1$;
- Gli unici nuclidi stabili con $N/Z < 1$ sono ${}^1_1\text{H}$ e ${}^3_2\text{He}$

Un modo per predire il meccanismo di decadimento è proprio il rapporto tra il numero di neutroni e protoni. Nella maggior parte dei casi un nuclide stabile contiene pari neutroni e protoni, per questo il loro rapporto risulta 1 e hanno la tendenza a posizionarsi sulla linea di stabilità. Tuttavia, l'aumento del numero dei neutroni influisce sulla stabilità e conferisce una preponderanza al carattere radioattivo dell'elemento che così risulta instabile. Inoltre, all'aumentare del peso molecolare la curva di stabilità si sposta a valori di $N/Z > 1$ i nuclei così risultano fuori dalla curva (sopra o sotto) generando instabilità e decadendo per poi rientrare sulla curva. Per mantenere il rapporto N/Z più stabile possibile, i nuclidi emettono particelle o fotoni in diverse circostanze. Esistono diversi tipi di emissioni radioattive naturali [5]:

- decadimento α : un nuclide genitore decade in nuclide figlio emettendo particelle α , ovvero particelle di elio ionizzate ${}^4_2\text{He}^{2+}$.

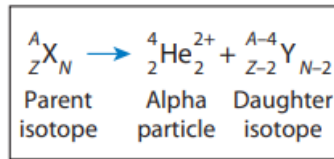
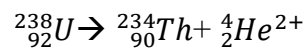


Figura 1.3: equazione nucleare per il decadimento α [5]

Attraverso il decadimento, il nuclide figlio che si genererà sarà dotato di un Z diminuito di 2 unità ed A di 4 unità rispetto a quello del genitore. Anche se le particelle α risultano poco penetranti, esse sono altamente cariche ($2+$) e pericolosamente dannose, vengono usate solo in alcuni casi a scopo terapeutico. Tutte gli elementi successivi al bismuto, ${}^{209}_{83}\text{Bi}$, presentano decadimento alfa, essendo il più comune quando si prendono in considerazione nuclei instabili pesanti. Per esempio, l'uranio decade con un processo alfa in torio:



- Decadimento β : in questo caso si possono avere due tipi di decadimento diversi: β^- e β^+ . Nel primo caso si ha la conversione di un neutrone in un protone e l'emissione di una particella β^- , un elettrone espulso dal nucleo ad altissima velocità, insieme ad un antineutrino ($\bar{\nu}$). Il risultato è che il numero atomico del nuclide figlio aumenta di 1 ($Z+1$) mentre il numero di massa rimarrà invariato rispetto a quello del nuclide genitore.

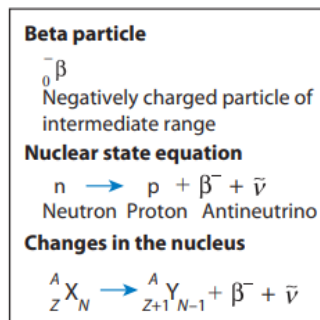
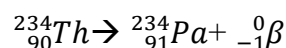


Figura 1.4: equazione nucleare per il decadimento β^- [5].

Il risultato del decadimento β^- è la formazione di un atomo dell'elemento con un numero atomico successivo. Un esempio può essere rappresentato dal torio-234 che decade nell'isotopo protattinio-234:



I nuclidi dotati di troppi neutroni, che si posizionano al di sotto della linea di stabilità, tenderanno a dare decadimento β^- .

Nel caso dell'emissione di particelle β^+ generalmente l'atomo è ricco di protoni, e uno di questi viene convertito in neutrone con la relativa espulsione di un positrone, β^+ o antiparticella dell'elettrone, e un neutrino (l'antiparticella dell'antineutrino). Nel nuclide figlio A rimane costante, mentre Z diminuisce di un'unità.

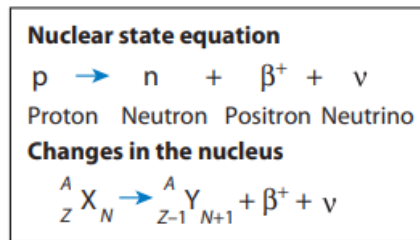
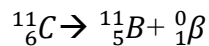


Figura 1.5: equazione nucleare per il decadimento β^+ [5].

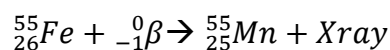
Durante questo processo si forma l'atomo dell'elemento con numero atomico precedente. Un esempio può essere il carbonio-11 che decade per formare l'isotopo stabile del boro:



In questo caso i nuclidi sono ricchi di protoni, si disporranno così al di sopra della linea di stabilità. Cercheranno di riposizionarsi su essa liberando una carica positiva attraverso decadimento β^+ .

Entrambe le particelle beta sono mono cariche e sono caratterizzate da una massa estremamente piccola e una velocità comparabile a quella della luce in modo da renderle ottimali per la diagnostica.

- **Cattura elettronica:** consiste in un'interazione tra il nucleo ed un elettrone in un basso livello energetico. La formazione di una vacanza dell'orbitale fa sì che si instauri un meccanismo a catena, nel quale un elettrone proveniente dal livello energetico superiore va ad occupare la vacanza che si è formata nel livello inferiore e così via. Quello che succede è la trasformazione di un protone in neutrone; ne consegue che A rimane invariato mentre Z diminuisce di un'unità (come nel caso dell'emissione di β^+). I prodotti rimangono piuttosto instabili e tendono perciò a decadere ulteriormente liberando fotoni gamma per via dell'effetto a cascata, che per ogni spostamento di elettrone da una vacanza all'altra genera emissione di radiazione. Per esempio, il ferro-55 forma l'isotopo stabile del manganese per cattura elettronica:



- Raggi γ : i raggi γ rappresentano la radiazione a più alta energia; di solito la loro emissione avviene in seguito alle altre forme di decadimento radioattivo. In generale, quando avviene un decadimento alfa o beta, il fenomeno produce un nuclide figlio in uno stato eccitato, il quale sarà spinto a tornare allo stato fondamentale emettendo energia sottoforma di fotoni. I fotoni γ non hanno carica ma hanno il range penetrativo più lungo di tutte le altre emissioni nucleari. Non si osserva nessuna variazione né nel numero atomico né nel numero di massa.

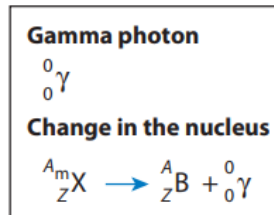
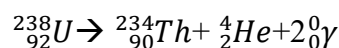


Figura 1.6: equazione nucleare per l'emissione di raggi γ ^[5]

Possiamo vedere un esempio già trattato con le particelle α :



I raggi γ hanno un alto potere penetrativo ma interagiscono con la materia soltanto per collisioni dirette con i nuclei. Essendo monoenergetici risultano piuttosto utili nei radiofarmaci per imaging.

1.2 Radiofarmaci

I radionuclidi (o radioisotopi) negli anni hanno creato sempre più interesse per differenti scopi: nell'industria e nella produzione energetica; ma specialmente in ambito medico per la produzione di radiofarmaci. Infatti, la medicina nucleare è in costante ricerca di nuovi farmaci in grado di agire in maniera terapeutica, diagnostica o addirittura teranostica. L'obiettivo principale delle tecniche di imaging è quello di ricavare informazioni sullo stato fisiologico degli organi e sulle possibili malattie o disfunzioni in determinati tessuti biologici. Per quanto riguarda la terapia, invece, l'obiettivo è quello di trattare in maniera mirata patologie. Quando invece si agisce attraverso un trattamento teranostico le funzioni diagnostiche e terapeutiche vengono inglobate in un unico farmaco che possa esplicare una duplice azione. Tali farmaci possono essere somministrati attraverso inalazione ($^{133}\text{xenon}$; $^{81\text{m}}\text{kripton}$) oppure per iniezione ($^{99\text{m}}\text{tecnezio}$; $^{123}\text{iodio}$).

In natura troviamo radionuclidi, come uranio e radio, dotati di elevata tossicità e un tempo di emivita lungo (anche oltre mille anni), risultando perciò impossibili da utilizzare in clinica. I nuclidi che

vengono usati a scopo medico sono infatti generati attraverso fissione nucleare usando un reattore per nuclidi ricchi di neutroni, oppure attraverso ciclotroni nel caso di radioisotopi poveri di neutroni [6]. Nel 1930, Ernest Lawrence e Milton Livingstone, attraverso lo sviluppo del primo ciclotrone diedero origine alla produzione di radionuclidi sintetici (e.g. iodio-131). Successivamente l'uso medico di questi isotopi si sviluppò perlopiù durante la Seconda guerra mondiale generando i primi radiofarmaci utilizzati in campo medico e spianando la strada per questa nuova frontiera.

I radiofarmaci sono macroscopicamente caratterizzati da due parti: la porzione radioattiva, che comprende un elemento in grado di emettere radioattività in seguito al suo decadimento (radionuclide o radioisotopo); ed una zona che agisce da carrier, responsabile del trasporto del farmaco in una specifica zona dell'organismo. Il loro scopo prevede quello di concentrarsi nell'organo d'interesse o comportarsi come tracciante di una funzione biologica. Si definisce così un radiofarmaco come una molecola radiomarcata in grado di agire in maniera benefica se utilizzata per scopi medici.

I radiofarmaci utilizzati per l'imaging non hanno alcun effetto farmacologico e la loro somministrazione non deve comportare effetti negativi, bensì dovrebbero essere espulsi facilmente in poche ore. Le tecniche di imaging PET (Tomografia a Emissione di Positroni) e SPECT (Tomografia a Emissione di Fotoni Singoli) sono metodi di imaging medico che forniscono informazioni funzionali sul metabolismo e l'attività biologica degli organi. La tecnica PET usa traccianti radioattivi che emettono positroni, permettendo di visualizzare processi metabolici, come il consumo di glucosio nei tumori; mentre la tecnica SPECT sfrutta traccianti che emettono fotoni gamma, fornendo informazioni funzionali su flusso sanguigno o attività cerebrale.

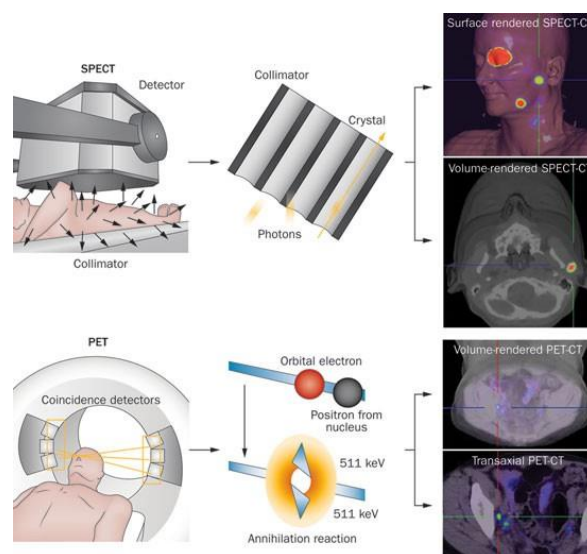


Figura 1.7: macchinari e funzionamenti SPECT e PET [7]

Spesso, questi esami vengono combinati con CT (Tomografia Computerizzata) o MR (Risonanza Magnetica) per integrare dati anatomici con quelli funzionali, migliorando la precisione diagnostica e la localizzazione delle anomalie. Inoltre, se associati alla diagnostica hanno la necessità di seguire delle caratteristiche precise:

- in base alla tecnica associata al radionuclide, questo deve avere un'energia di emissione specifica (511 keV per tomografia a emissione di positroni, PET);
- il tempo di emivita biologica deve essere piuttosto breve (un paio di ore al massimo) in modo tale da essere espulso il più rapidamente possibile, ma in alcuni casi si possono usare radioisotopi PET con lunga emivita (e.g. zirconium-89, $t/2=72\text{h}$);
- il radionuclide deve essere il più puro possibile, ogni contaminazione di altri radionuclidi derivanti dal processo di produzione potrebbe incidere sul risultato dell'analisi;
- non devono influenzare le funzioni fisiologiche del corpo del paziente;
- devono essere disponibili per un utilizzo immediato;
- il target dell'organo deve risultare preciso e rapido.

Per quanto riguarda i radiofarmaci utilizzati in terapia, invece, devono avere un effetto distruttivo su cellule per esempio del cancro, e il loro decadimento può risultare più lungo di due ore. Il radiofarmaco somministrato al paziente, concentrandosi nei tessuti patologici, è in grado di irradiarli e distruggerli emettendo radiazioni mirate. Queste radiazioni sono corpuscolari e esplicano la loro azione dissipando energia lungo una direzione di radiazione in un range compreso tra 0.1 mm e 2 mm a seconda del tipo di radiazione emessa, α o β , consentendo un'azione molto mirata.

I radiofarmaci si suddividono in due macrocategorie secondo la strategia di radiomarcatura dei nuclidi: di derivazione organica o a base di metalli [8]. Nella prima classe di radiofarmaci troviamo quelli contenenti radionuclidi non-metalli (^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{123}I), i quali si legano in maniera covalente alla molecola organica di supporto. Hanno un tempo di emivita molto breve, limitando le applicazioni alla diagnostica. Nella classe successiva troviamo i radiofarmaci *metal-based*, ovvero quelli che contengono radionuclidi metallici. Quest'ultimi presentano differenti schemi di decadimento, conferendo al radiofarmaco una vasta varietà di applicazioni, non solo in imaging ma anche in terapia. I radiofarmaci a base metallica si suddividono a loro volta in due categorie:

- ❖ *metal essential*: il radionuclide è fondamentale e selettivo verso un attacco biologico preciso. Il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ viene usato specificatamente per l'imaging cardiaco se coordinato ad un legante MIBI. Andando a variare il metallo la funzione non sarebbe più la stessa perché è proprio

grazie al ^{99m}Tc che il farmaco permette l'imaging del sito d'interesse. Risultano piuttosto facili da sintetizzare;

- ❖ *metal-nonessential*: la distribuzione non dipende dal tipo di metallo utilizzato, bensì dalle caratteristiche chimiche dei leganti (spesso bifunzionali) che interagiscono con esso.

Un radiofarmaco è caratterizzato da tre componenti: una molecola vettore; un radionuclide per diagnostica o terapia incapsulato in un chelante e un linker; come mostrato nella figura seguente.

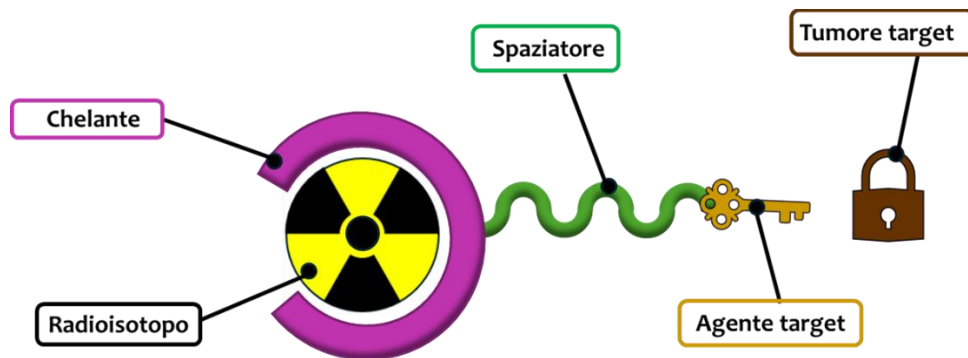


Figura 1.8: struttura standard radiofarmaci metallici .

Il radionuclide, come già precedentemente descritto, emette la radiazione indipendentemente dalla tecnica utilizzata; perciò, è necessario considerare il suo decadimento e la radiazione e correlarla alla tecnica diagnostica migliore. Il linker è, invece, una porzione stabile che agisce da ponte tra il vettore ed il radionuclide. Il vettore può essere di diverso tipo a seconda del target con cui interagisce, con il quale deve mantenere alta selettività e specificità anche in seguito alla coniugazione con il radionuclide [9]. Un'altra parte fondamentale della struttura del radiofarmaco consiste nel chelante: una molecola in grado di stabilizzare il legame del radiofarmaco con il nuclide e di non permettere il rilascio del radionuclide nell'organismo. Per i radiofarmaci *metal based* tendenzialmente si usa un chelante bifunzionale in modo da formare un legame covalente con il vettore e un complesso stabile con il radioisotopo. Principalmente le caratteristiche del radionuclide e del suo decadimento conferiscono al radiofarmaco l'azione diagnostica (attraverso l'emissione di raggi gamma o β^+) o terapeutica (emettendo particelle alfa o β^-).

1.3 Tecniche di imaging PET e SPECT

La PET è una tecnica in grado di fornire immagini delle componenti fisiologiche e dei processi biologici in seguito all'emissione di radiazioni da parte di radiofarmaci. I radioisotopi utilizzati sono generati attraverso ciclotroni o generatori ed hanno la peculiarità di essere neutrone-deficienti, cioè in grado di emettere particelle β^+ ed hanno un tempo di emivita piuttosto limitato. I radioisotopi più comuni sono: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{68}Ga e ^{18}F . Un radiofarmaco ideale dovrà avere un tempo di emivita breve, in modo da permettere di limitare l'esposizione totale alle radiazioni del paziente in molti contesti clinici, migliorando la sicurezza e l'efficacia delle procedure diagnostiche e terapeutiche. Il radiofarmaco dovrà anche avere una emivita biologica breve, ovvero una metabolizzazione ed un'espulsione dal corpo altrettanto veloce. La tecnica funziona nel seguente modo [10]: innanzitutto viene generato l'isotopo radioattivo attraverso ciclotrone, che accelera particelle cariche per creare l'isotopo con breve tempo di emivita che possa emettere positroni, oppure attraverso un generatore automatizzato. Successivamente l'isotopo verrà complessato con il chelante e la molecola target per creare il radiofarmaco chiamato anche sonda di imaging. La molecola verrà iniettata nel paziente ed inizierà a localizzarsi nel sito di interesse. Sul sito target il radiofarmaco emetterà la particella β^+ , attraverso decadimento radioattivo. La particella interagirà con un elettrone generando un fenomeno che prende il nome di annichilazione. Il risultato di questo processo è l'emissione di due raggi gamma a 180° l'uno dall'altro, aventi energia caratteristica di 511 keV. Lo strumento è dotato di un detector, o scanner, che rileva i raggi gamma emessi e riesce a risalire al luogo di annichilazione, ovvero la zona dove è situato il radiofarmaco. Nella figura seguente è riportato schematicamente come funziona la tecnica.

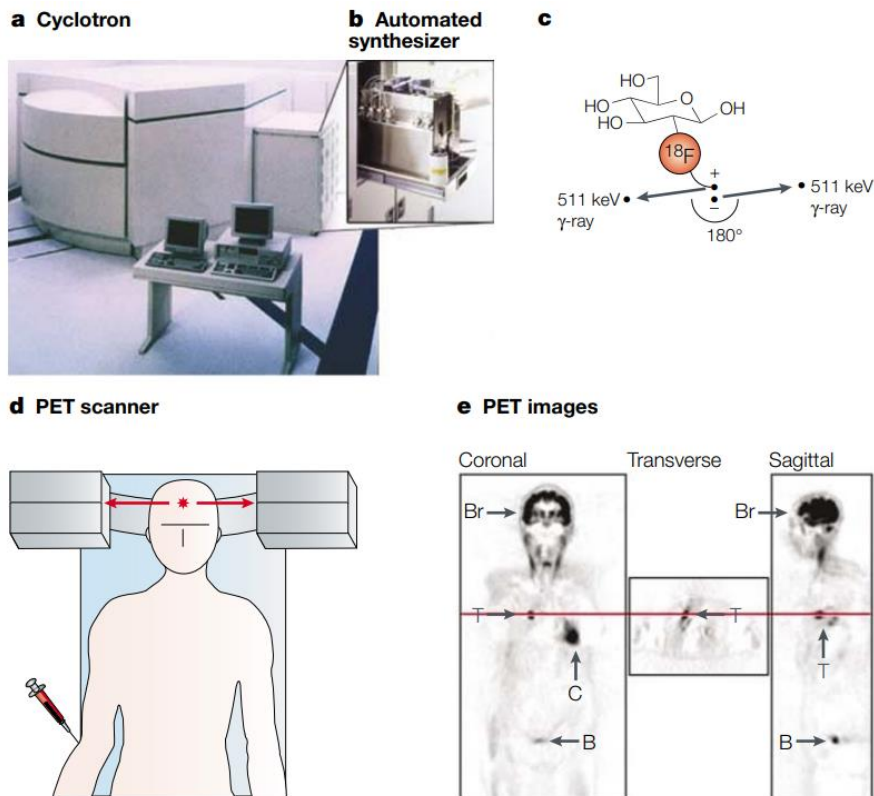


Figura 1.10: principi della PET.[10]

La risoluzione spaziale della PET risulta piuttosto bassa, sicuramente non a livello di altre tecniche tipo la Risonanza Magnetica per Immagini (MRI); infatti, piccole lesioni come quelle ai linfonodi sono difficili da visualizzare con accuratezza. Il vantaggio della PET risiede nel suo grande contrasto e nella sua alta sensibilità che tutt'oggi sono senza rivali e permettono di osservare la sonda accumulata su recettori cellulari. Inoltre, è possibile ottenere informazioni sulla capacità funzionale della struttura anatomica anche in assenza di malattia.

Uno dei concetti base della PET è che il collimatore permette solo di rilevare i raggi gamma che incidono perpendicolarmente alle pareti del rivelatore stesso e in modo tale da essere situati lungo una retta detta *line of response* o *LOR*. Sarà possibile ricostruire interamente l'immagine combinando tutte le possibili rette e identificando così il punto preciso dove è avvenuto l'annichilazione. Oltre al fenomeno appena descritto, detto di *pura coincidenza*, si possono avere altri fenomeni che diminuiscono la risoluzione dell'immagine; questi sono: *coincidenza per scattering*, *casuale* o *multipla* [11]. Una coincidenza casuale si genera quando i fotoni emessi per annichilazione vengono rilevati nella finestra temporale di coincidenza; tuttavia, essi provengono da eventi spazialmente non correlati e la LOR sarà errata. Nel caso di una coincidenza per scattering, uno o entrambi i fotoni subiscono scattering di Compton prima di essere rilevati, così da subire una deviazione di un

determinato raggio rispetto alla direzione originale. La coincidenza risulterà errata, non coinciderà con LOR e perciò con l'evento di annichilazione. Nell'ultimo caso, coincidenza multipla, si rilevano tre fotoni provenienti da diversi eventi di annichilazione nella finestra di coincidenza. La LOR risulterà ambigua e risulterà ottimale scartare queste coincidenze.

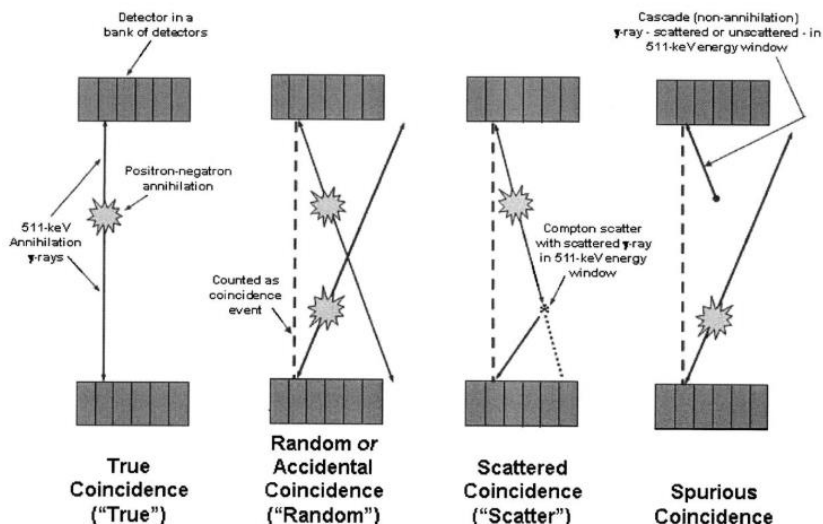


Figura 1.11: raffigurazione dei processi di coincidenza dei fotoni.[11]

Come precedentemente anticipato, tutti i radionuclidi utilizzati per la PET sono emettitori di positroni con un tempo di emivita piuttosto breve e la loro disponibilità deve essere immediata, per questo vengono generati in loco in modo da essere disponibili qualora ci fosse necessità. Sono inglobati in una molecola molto stabile, in modo da non rilasciare la componente radioattiva nell'organismo, ed essa non deve interagire biologicamente con l'organismo. L'espulsione deve essere veloce e funzionale, tendenzialmente attuata dall'apparato biliare o renale.

Sicuramente il radiotracciante più utilizzato attualmente in clinica per l'imaging metabolico e/o tumorale, è il [^{18}F]FDG, ovvero il ^{18}F fluorodeossiglucosio. Il 2-Deossi-D- ^{14}C glucosio (DG) era stato già sintetizzato a partire dagli anni 50' per bloccare l'accelerazione della glicolisi nelle cellule tumorali.

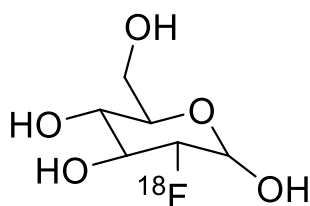


Figura 1.12: struttura del ^{18}F FDG.

Secondo l'effetto Warburg le cellule tumorali hanno la peculiarità di produrre grandi quantità di energia attraverso la glicolisi aerobica, consumando grandi quantità di glucosio in presenza di ossigeno. Quando il radiofarmaco FDG viene iniettato nel paziente, viene trasportato dallo spazio vascolare allo spazio interstiziale. A questo punto i recettori del glucosio lo riconoscono e lo distribuiscono alle cellule. Quindi il tracciante radioattivo emette, per decadimento, particelle β^+ , le quali perderanno progressivamente energia per l'interazione con gli atomi circostanti. A questo punto, come succede durante una qualsiasi analisi PET, il positrone viene continuamente deviato prima di subire annichilazione. L'incertezza spaziale è dovuta all'energia iniziale del positrone, se è piuttosto energetico lo spazio percorso prima dell'annichilazione sarà maggiore e quindi ci sarà più incertezza. Il farmaco FDG viene espulso tramite il sistema renale ed il processo di assorbimento, intrappolamento e depurazione ha un intervallo tra i 30-60 minuti.

1.4 Radionuclidi per diagnostica, terapia e teranostica

L'imaging nucleare è una branca della medicina che prevede di poter valutare in maniera semplice le alterazioni fisiologiche dovute da cambiamenti biochimici in seguito ad una patologia. I medici hanno la possibilità di eseguire una diagnosi rapida ed accurata seguendo le informazioni servite dall'immagine diagnostica [12]. L'immagine viene ricavata dall'azione di un radiotracciante, avente una struttura molecolare contenente il vettore, il linker e il complesso di un metallo radioattivo. La componente radioattiva avrà caratteristiche diverse in base al tipo di decadimento che potrà compiere: attraverso particelle alfa, beta o raggi gamma. L'ampia varietà di radionuclidi permette di poter applicare il *best matching* per un'applicazione specifica. Infatti, come descritto precedentemente, nel caso delle tecniche diagnostiche, queste usano isotopi radioattivi con un tempo di emivita piuttosto breve, nel caso della tecnica SPECT si usano direttamente raggi gamma per generare il segnale, mentre nella PET si sfrutta il fenomeno di emissione di particelle β^+ che andranno a generare raggi gamma a seguito di annichilazione, usati per generare il segnale e quindi l'immagine.

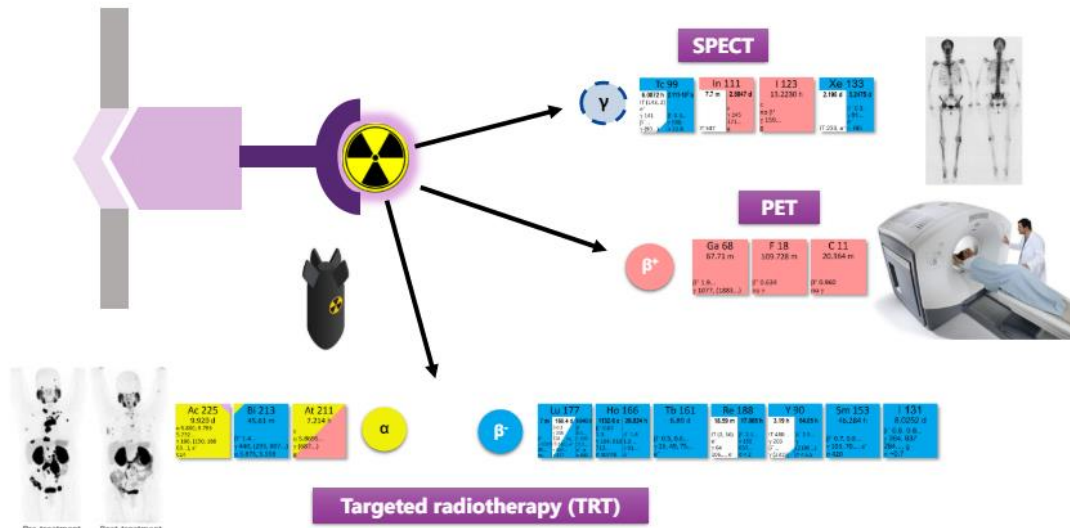


Figura 1.13: suddivisione delle tecniche diagnostiche e terapeutiche con le relative emissioni e radionuclidi- PRISMAP School on Radionuclide Production – May 2024

Per la tecnica PET ci sono tre macro-applicazioni: oncologia, cardiologia e neurologia. Come già menzionato prima, il radiotracciante più utilizzato a livello oncologico è il ^{18}F -FDG, ma è possibile usare a livello cardiovascolare il $^{[11}\text{C}]$ Acetato. Tra i radioisotopi più utilizzati troviamo: ^{68}Ga , ^{18}F e ^{11}C , ^{64}Cu , ^{89}Zr .

Nella SPECT il radioisotopo più utilizzato risulta essere il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6$ ore), esso viene generato attraverso un generatore che sfrutta il decadimento del molibdeno. Questo radioisotopo può essere incorporato in differenti vettori molecolari attraverso una semplice complessazione chimica. Viene usato specialmente per valutare il funzionamento cardiovascolare e le relative patologie associate; inoltre, se inserito in una sonda specifica, riesce a riprodurre un'immagine anche dei reni e di alcune forme tumorali. Altri radioisotopi utilizzati sono: ^{111}In ; ^{123}I e ^{133}Xe .

In terapia vengono sfruttati radionuclidi che decadono emettendo particelle β^- e α per distruggere cellule tumorali. Alcuni esempi sono il ^{60}Co utilizzato per i trattamenti dei tumori cerebrali, il ^{32}P sviluppato per le patologie ossee e il ^{131}I sviluppato per il cancro alla tiroide. Attraverso la composizione del radiofarmaco, gli isotopi riescono a posizionarsi nel sito di azione, che può essere un tumore, per esempio, ed emettere particelle in grado di lesionare il sito d'interesse. L'azione citotossica che colpisce le cellule del DNA del tumore causandone la morte dipende dal trasferimento energetico lineare (LET, *Linear energy transfer*) il quale misura l'energia trasferita da una radiazione ionizzante ad un materiale, per unità di distanza [8]. Particelle con un LET elevato, sono altamente ionizzate e tendono a posizionare la loro energia su distanze piuttosto brevi, colpendo maggiormente

piccoli tumori o micrometastasi; mentre, quelle con un basso LET sono particelle più funzionali all'uso clinico in quanto riescono ad attaccare il sito e causarne un danneggiamento chimico o biologico. Per le particelle β^- l'azione distruttiva dipende sia dal LET (0.2 keV/ μm) che dall'energia cinetica delle particelle; per particelle β^- essa può variare da 0.1 a 2.2 MeV. I radionuclidi che emettono particelle β^- sono i più utilizzati in ambito terapeutico; avranno perciò un basso LET e quindi un ampio range spaziale d'azione (0.5-10 mm); il più utilizzato attualmente è il ^{177}Lu . Al contrario, le particelle α hanno energie piuttosto elevate, 5-8 MeV, e un alto LET (80 keV/ μm) e un basso range di azione (40-100 μm). Dal momento che hanno una natura altamente ionizzante ed un breve intervallo di azione vengono sfruttate per terapie mirate, per esempio nella *targeted alpha therapy* attraverso l'utilizzo del ^{225}Ac ($t_{1/2}$ =10 giorni). Infine, in terapia possiamo trovare anche gli elettroni Auger dotati di bassa energia (1-10 KeV) e alto LET (4-26 keV/ μm) in modo che possano penetrare nei tessuti solo a livello superficiale. In questo caso si forma una vacanza nell'orbitale più interno che sarà compensata da un elettrone che decade da un livello energetico superiore. A questo decadimento è associato il rilascio di energia a un terzo fotone, di un guscio più esterno, che viene così espulso (*elettrone Auger*). Vengono sfruttati per trattare le metastasi di una singola cellula, ma l'utilizzo è limitato in quanto il farmaco deve avere alta specificità verso il target delle cellule tumorali o del nucleo stesso.

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

*EC, electron capture; IT, internal conversion.

Figura 1.14: radionuclidi più frequenti con la relativa emissione usati in terapia [9].

Negli ultimi anni la medicina nucleare ha focalizzato il suo sviluppo sull'azione teranostica: combinazione tra la diagnostica e la terapia in modo da agire simultaneamente attraverso la duplice azione. Alcuni radionuclidi sono intrinsecamente teranostici: riescono ad avere un'azione terapeutica

in combinazione con l'emissione di una radiazione gamma visualizzabile (^{47}Sc , ^{177}Lu). Tuttavia, in generale, è meglio utilizzare coppie di radioisotopi chimicamente identici con emivite simili ed emissioni complementari. In questo modo permettono di poter effettuare sia la diagnosi che la terapia ma avendo un comportamento biologico identico. Si possono però avere anche coppie di isotopi non chimicamente identici, ma in questo secondo caso le informazioni saranno meno rappresentative (^{111}In per imaging associato a ^{90}Y per la terapia o ^{68}Ga per imaging e ^{177}Lu per la terapia). Entrambi i radionuclidi dovranno essere disponibili immediatamente su richiesta e quindi la loro produzione dovrà essere eseguita in loco, limitando la distribuzione su larga scala.

1.5 Targeting agents

Per sintetizzare un radiofarmaco è necessario il processo di *bioconiugazione*, ovvero coniugare molecole organiche di sintesi (il legante) a molecole più complesse tendenzialmente di origine naturale, come le proteine. Il focus starà nel collegare una certa molecola, come ad esempio il radionuclide inglobato nel legante (il complesso), con una proteina che sia specifica verso determinati recettori, in modo che possa funzionare da vettore e portare il farmaco nel sito d'interesse. Le proteine sono altamente utilizzate nella bioconiugazione perché sono molto eterogenee per via della varietà di amminoacidi disponibili, e quindi utilizzate come sonde in diagnostica o per il drug delivery.

Una sonda molecolare ci permette di visualizzare, caratterizzare e quantificare i processi biologici nei sistemi viventi, ed è schematizzabile nel seguente modo: imaging reporter e un vettore in grado di riconoscere il target (un recettore cellulare, un enzima, un metabolita ecc).

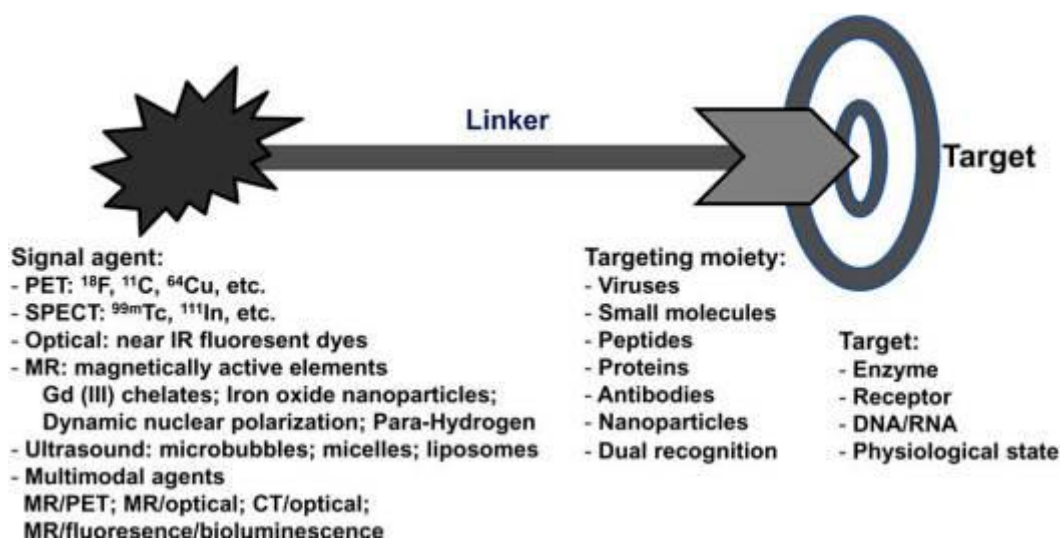


Figura 1.15: schema di una sonda molecolare per imaging [13]

L'imaging reporter è la molecola in grado di generare il segnale relativo alla tecnica di analisi, nel caso della medicina nucleare consisterà nell'isotopo radioattivo, in altri casi come nell'imaging ottico consisterà in molecole fluorescenti o bioluminescenti. Lo spaziatore, o linker, lega l'imaging reporter con il vettore e può essere caratterizzato da diversa lunghezza, flessibilità, idrofilicità e carica, in modo che si possa riuscire a manipolare la farmacocinetica della sonda. Per quanto riguarda il vettore, invece, sarà una molecola in grado di riconoscere la zona target. Tra i più utilizzati ci sono i peptidi, le proteine o le piccole molecole organiche. Il sito target può essere di vario tipo: un enzima, un recettore, il DNA/RNA. Le sonde sono progettate per rilevare le malattie in modo non invasivo conferendo delle immagini a definizione ottimale. Esse dovranno perciò presentare delle caratteristiche specifiche [13]:

- ❖ Per ottenere un accumulo ideale della sonda e perciò un'immagine ottimale è necessaria un'alta affinità di legame con il bersaglio.
- ❖ Il funzionamento migliore si ha quando le sonde sono target-specifiche, ovvero, hanno specificità verso un determinato target. In questo modo risultano utili per comprendere la biologia di malattie specifiche che coinvolgono vari processi biologici.
- ❖ Un elevato rapporto target-sfondo e segnale-rumore garantiscono un contrasto elevato dell'immagine e quindi un'interpretazione adeguata. In generale, una sonda con elevato assorbimento e lenta escrezione o clearance nel tessuto bersaglio, ma contemporaneamente un basso assorbimento e una rapida escrezione dai tessuti non malati è ideale per avere un'immagine migliore.
- ❖ Per essere una sonda ottimale deve avere bassa immunogenicità e tossicità. Le sonde vengono somministrate a basse dosi e anche per questo i loro effetti sono trascurabili.
- ❖ Alta sensibilità, in modo che anche una piccola quantità di sonda possa conferire un'immagine accurata dei tessuti.
- ❖ Alta stabilità in vivo, data da una struttura che rimane salda in vivo e non reagisca con altri processi se non quelli desiderati.
- ❖ Il basso costo e la disponibilità sono vantaggiosi per la distribuzione in ambito clinico delle sonde.

La progettazione di sonde molecolari richiede diversi studi e una conoscenza forte dei sistemi biologici. La scelta dell'approccio progettuale dipende da diversi fattori, tra cui il target specifico e la modalità di imaging. Tra i possibili approcci quello più comune è quello precedentemente descritto: una porzione targeting accoppiata con un agente di segnale tramite un linker. Si può avere anche un accoppiamento di due agenti segnale attraverso una porzione target, in questo caso si parla di sonde

attivabili o intelligenti. La porzione target è tendenzialmente un substrato enzimatico. Nel terzo caso un agente segnale viene usato come nucleo e varie porzioni target sono coniugate ad esso.

Risulta molto comune, per diverse sonde molecolari, che il loro segnale *in vitro* sia migliore rispetto a quello *in vivo*; ciò però è normale perché nell'organismo la sonda dovrà affrontare diversi stadi e sistemi di difesa che impediscono ai sistemi esogeni di svolgere la funzione prevista. Ci sono per l'appunto delle barriere biologiche da varcare per ottenere una sonda molecolare ottimale, così da avere un target specifico ad una concentrazione sufficiente. In base allo scopo per cui la sonda viene progettata potrà avere diverse caratteristiche, per esempio: una sonda che ha lo scopo di attaccare i tessuti tumorali dovrà riuscire a raggiungere il sito e ad accumularsi nelle cellule quindi superare la membrana cellulare; quindi, lo scopo è riuscire a superare le barriere biologiche.

I fattori fondamentali per la farmacocinetica, assorbimento, distribuzione ed escrezione di una sonda sono le sue proprietà chimico-fisiche come le costanti di dissociazione acida (pK_a), la lipofilia (LogP) e la stabilità. La pK_a è strettamente correlata alla permeabilità della membrana: molecole con gruppi ionizzabili hanno cariche differenti in determinati range di pH, cosa che influisce sulla solubilità e sulla permeabilità delle membrane. La lipofilia è un parametro che descrive la capacità di distribuirsi tra la fase idrofila e lipidica: quanto la molecola riesce a penetrare nel doppio strato lipidico. Infine, la sonda dovrà risultare stabile entro un periodo di tempo per ottenere immagini di buona qualità.

Capitolo 2: ^{18}F E RADIOTRACCIANTI PER PET

2.1 Proprietà del ^{18}F

La tomografia a emissione di positroni (PET) è una tecnica non invasiva che riesce a fornire delle informazioni quantitative sulla funzione e sul metabolismo nei processi biologici in vivo attraverso immagini ad alto contrasto. Grazie all'ampio range di applicazioni (scansioni tumorali, valutazioni metaboliche e flusso sanguigno), la tecnica è sempre più utilizzata a livello clinico ed in via di ulteriore sviluppo. La comunità scientifica, infatti, è in costante ricerca di sonde più efficienti in ambito diagnostico e perciò, nuovi metodi radiochimici per sintetizzare molecole specifiche contenenti radionuclidi emettitori di positroni. I radioisotopi più utilizzati in questo ambito sono sia metallici che non metallici: ^{11}C , ^{13}N , ^{64}Cu , ^{68}Ga e ^{18}F . Quest'ultimo fin dai primi sviluppi della tecnica ha stimolato maggior interesse principalmente per la sua facile produzione e le sue proprietà radiochimiche ottimali.

La curiosità sul fluoro è nata all'incirca nel 1948^[1], quando vennero pubblicati una serie di articoli sull'ipofluorito sintetizzato per la fluorurazione catalitica del metanolo; da quel momento il fluoro ha attirato sempre maggiore interesse. Il fluoro appartiene al gruppo degli alogeni ed è l'elemento più elettronegativo della tavola periodica. Questa caratteristica è fondamentale quando si vogliono sintetizzare prodotti farmaceutici perché, essendo il legame covalente C-F polarizzato, risulta molto stabile grazie all'attrazione elettrostatica (parziale carattere ionico di legame) tra i due atomi, definendo così dei legami forti. Il legame C-F nei prodotti farmaceutici migliora aspetti come la stabilità, la solubilità o la biodisponibilità metabolica ed il fluoro agisce come bioisostere dell'atomo di idrogeno, ovvero rappresenta un sostituto ottimale dell'idrogeno riuscendo a modificare le proprietà farmacologiche e farmacocinetiche dei composti, mantenendo l'attività biologica desiderata. Il fluoro ha diversi isotopi: ^{19}F , ^{18}F , ^{17}F , ^{20}F e ^{21}F ; eccetto il ^{19}F , tutti gli altri sono instabili e con un tempo di emivita fin troppo breve per essere usati in ambito clinico; tuttavia, tra questi isotopi fa eccezione il ^{18}F , il quale rappresenta il radionuclide più utilizzato in diagnostica. Rispetto agli altri radioalogeni emettitori di positroni, come il ^{76}Br (emivita: 16,1 h), lo ^{124}I (emivita: 4,18 giorni), il ^{18}F presenta un'emivita più breve (109,8 minuti) e un'energia dei positroni inferiore rispetto agli isotopi citati precedentemente. Viene utilizzato specialmente a livello di imaging molecolare per valutare la risposta a trattamenti terapeutici, processi biologici e malattie, tra cui tumori. La tecnica che considera maggiormente l'utilizzo del ^{18}F è proprio la tomografia a emissione di positroni. In essa, infatti, il radioisotopo emette particelle β^+ che, per il fenomeno di annichilazione, generano raggi gamma disposti a 180° . Il rivelatore posto attorno al paziente acquisisce le coppie di raggi gamma emessi e ne produce un'immagine tridimensionale della zona d'interesse.

L'isotopo radioattivo del fluoro, ^{18}F , può decadere attraverso processo di cattura elettronica (3%) oppure, più probabilmente, attraverso emissione di positroni (97%). Attraverso quest'ultimo processo vengono emesse particelle β^+ ed un neutrino in modo tale che un protone del nucleo di ^{18}F possa essere convertito in neutrone. Perciò il fluoro verrà convertito nel nuclide figlio ^{18}O al termine di ogni decadimento.

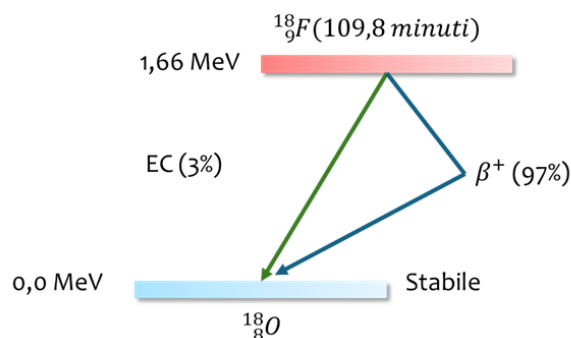


Figura 2.1: processo di decadimento del ^{18}F

Il Fluoro-18, avendo un tempo di emivita breve, dovrà essere prodotto in loco ed utilizzato nel minor tempo possibile, per garantire le proprietà radioattive al farmaco. Per questo motivo, per la sua produzione viene utilizzato una macchina acceleratrice di particelle pesanti chiamata "ciclotrone" che è in grado di generare l'isotopo instabile del fluoro.

Il ciclotrone, attraverso l'utilizzo di una tensione alternata ad alta frequenza, accelera particelle cariche come protoni o ioni, a velocità elevate lungo una traiettoria circolare. In esso è poi presente un campo magnetico perpendicolare rispetto alla direzione di spostamento delle particelle, di grandezza e direzione costanti, in modo da ottenere un movimento spirale delle particelle stesse. Il ciclotrone è costituito da "dee's" ovvero elettrodi a forma di D racchiusi in una camera a vuoto, posizionata tra i poli di una grande magnete. Al centro di queste dee's sarà presente un flusso di particelle cariche che passeranno per la camera dove ci sarà una tensione alternata ad alta frequenza sugli elettrodi.

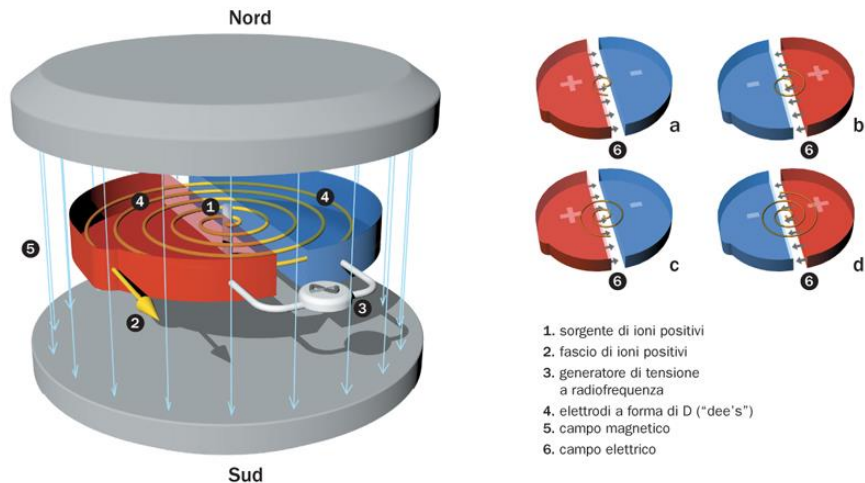


Figura 2.2: rappresentazione schematica del ciclotrone[14]

I protoni vengono accelerati lungo una traiettoria a spirale grazie all'applicazione alternata di un campo elettrico tra le dee's, mentre il campo magnetico li mantiene su una traiettoria curva. Perpendicolarmente agli elettrodi è presente un campo magnetico (\vec{B}), per cui la particella carica (q), in moto con una velocità (\vec{v}), avvertirà la forza di Lorentz ($\vec{F}l$):

$$\vec{F}l = qv\vec{B}$$

L'azione della forza di Lorentz curverà le particelle, in questo istante la polarità dei due elettrodi cambia in modo che la carica venga espulsa dal primo per entrare nel secondo dee's. Affinché la traiettoria rimanga circolare, la forza centripeta e quella di Lorentz dovranno uguagliarsi:

$$qvB = \frac{mv^2}{R} \rightarrow R = \frac{mv}{qB}$$

Dove m equivale alla massa dell'oggetto in movimento ed R il raggio della traiettoria circolare.

Man mano che ottengono più energia dalla tensione di accelerazione, le particelle si muoveranno a spirale verso l'esterno e una volta raggiunto il bordo vengono estratte dal ciclotrone e inviate contro il bersaglio.

Il ^{18}F viene prodotto accelerando protoni verso ^{18}O , un isotopo stabile dell'ossigeno. Un generatore di idrogeno attua l'elettrolisi dell'acqua che scinde quest'ultima in idrogeno e in ossigeno molecolare. L'idrogeno viene mandato nel centro del ciclotrone dove la sorgente di ioni effettua la rottura eterolitica del legame. Gli ioni vengono accelerati dal ciclotrone, passano attraverso una lamina di carbonio che li converte in protoni e una volta che questi raggiungono la velocità desiderata vengono diretti verso un bersaglio di ossigeno-18 (^{18}O). Il bersaglio di solito è acqua arricchita in ^{18}O (H_2^{18}O).

Quando i protoni ad alta velocità colpiscono i nuclei di ^{18}O , avviene la reazione nucleare nella quale un protone reagisce con il nucleo di ossigeno e un neutrone è emesso. La reazione può essere scritta come: $^{18}\text{O} + p \rightarrow ^{18}\text{F} + n$. Questo trasforma il nucleo di ^{18}O in ^{18}F . Il fluoro prodotto si presenta sotto forma di una soluzione acquosa di $[^{18}\text{F}]\text{fluoruro}$, che viene poi estratto attraverso processi chimici, purificato e separato per la sintesi chimica di vari radiofarmaci. Il ciclotrone permette di ottenere l'isotopo radioattivo ad alta purezza e di quantità sufficienti per applicazioni sanitarie ed inoltre può essere installato in loco, riducendo i tempi di trasporto. In seguito alla produzione mediante ciclotrone, il ^{18}F viene estratto e purificato, spesso mediante cartuccia a scambio ionico in modo che possa essere utilizzato in maniera rapida e funzionale nelle successive applicazioni di radiosintesi. La purificazione del prodotto radiomarcato con ^{18}F può essere eseguita attraverso tecniche cromatografiche, come HPLC, rimuovendo le impurezze o le sostanze non reagite. Il prodotto finale viene formulato in una soluzione sterile per l'iniezione nei pazienti.

Il fluoro forma legami covalenti o ionici molto forti con la maggior parte degli elementi. La forza del legame C-F e la piccola dimensione dell'atomo di fluoro conferiscono alle molecole organiche fluorurate proprietà chimiche, fisiche e biologiche interessanti. Tuttavia, la reattività e i pericoli del fluoro elementare e del fluoruro di idrogeno hanno reso difficile l'introduzione del fluoro nelle molecole organiche, portando allo sviluppo di tecnologie e reagenti specializzati per la fluorurazione.

In generale possono esserci principalmente due tipi di fluorurazione covalente di una molecola: elettrofila (fluoro molecolare $[^{18}\text{F}_2]$) e nucleofila (anione fluoruro $[^{18}\text{F}]^-$); entrambi i metodi di fluorurazione sono cruciali per la sintesi di radiotraccianti utilizzati nella tomografia a emissione di positroni (PET). Questi due metodi prevedono l'utilizzo di solventi organici e spesso vengono svolti anche diversi passaggi sintetici, apportando così uno svantaggio cruciale nella tecnica sintetica.

Nella fluorurazione elettrofila [15] il fluoro-18 viene prodotto mediante irradiazione protonica del gas $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ e quindi mediante reazione nucleare $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$. Il ^{18}F prodotto viene adsorbito sulle pareti del bersaglio e attraverso l'aggiunta di fluoro non radioattivo si recupera il fluoro-18 tramite scambio isotopico, generando $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Questo fluoro molecolare è altamente reattivo e comunemente viene convertito in agenti fluoruranti come fluoruri di xenon e ammine N-fluorurate, che consentono fluorurazioni selettive in condizioni blande. Questo tipo di fluorurazione era ampiamente applicata in passato. La prima sintesi del ^{18}F -FDG è stata effettuata proprio con questo metodo. Tuttavia, l'aggiunta di agenti non radioattivi determina una perdita di attività specifica. Ad esempio, l'uracile è stato radiofluorurato con ^{18}F - F_2 per sintetizzare il 5- ^{18}F -FU (5- $[^{18}\text{F}]\text{fluorouracile}$) per l'imaging PET. La sintesi del 5- ^{18}F -FU comporta una sostituzione nucleofila dell'atomo di fluoro del 5-FU con l'isotopo radioattivo.

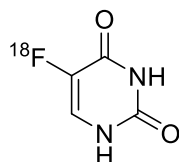


Figura 2.3: struttura del 5-¹⁸F-FU

In generale, queste molecole, inizialmente non radioattive, subiscono un attacco da parte del ¹⁸F, il quale avrà il compito di sostituire un atomo di idrogeno all'interno della molecola bersaglio. Le reazioni di fluorurazione elettrofila sono rapide e utili per produrre radiofarmaci, ma risultano anche carenti in regioselettività e sono spesso connotate da una bassa resa.

I fluoruri inorganici e ionici agiscono come agenti fluoruranti nucleofili: nonostante il fluoro sia il meno nucleofilo tra gli alogenuri, in solventi aprotici dipolari come DMF e MeCN si ottengono buoni risultati. Come già detto in precedenza, la reazione più comune per la produzione di fluoro radioattivo (¹⁸F) si ottiene bombardando [¹⁸O]H₂O tramite la reazione nucleare ¹⁸O(p,n)¹⁸F. Il ¹⁸F ottenuto all'interno di cartages (cartucce di purificazione, cioè dispositivi utilizzati per la purificazione e l'isolamento di specifici composti chimici da una miscela) verrà eluito attraverso solventi che possano renderlo il più nucleofilo possibile, come sali alcalini chelati da criptandi. Ad esempio, dopo l'eluizione con carbonato di potassio che produce [¹⁸F]KF, il catione di potassio può essere complessato dal Kryptofix 222 (figura 2.4). Solitamente le condizioni ideali per una fluorurazione nucleofila prevedono una temperatura compresa tra i 50-100°C. Il ¹⁸F-fluoruro viene poi isolato e utilizzato per la fluorurazione nucleofila di vari composti, sia aromatici che alifatici. Si tratta principalmente di reazioni di sostituzione nucleofila tipo SN₂ che prevedono alogenuri o esteri solfonici come gruppi uscenti.

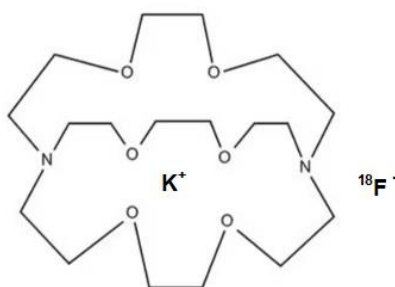


Figura 2.4: struttura del Kryptofix 222 (K¹⁸F)[16]

I radiotraccianti possono essere suddivisi in traccianti organici e traccianti inorganici a base di radiometalli. Tra le due classi la differenza sostanziale risiede nell'incorporazione del radionuclide; infatti, per i radiotraccianti organici si usano dei radionuclidi non metallici, tendenzialmente il ¹⁸F,

instaurando un legame C-¹⁸F. Le emivite brevi e le limitate caratteristiche di decadimento dei radionuclidi non metallici ne limitano le applicazioni. Al contrario, i traccianti inorganici a base di radiometalli si basano sulla chimica di coordinazione, dove viene scelto un metallo, complessato da un chelante e tipicamente coniugato a un vettore di targeting.

Essendo il ¹⁸F il radioisotopo più utilizzato in ambito clinico, risulta utile combinare le sue ottime proprietà con la più facile incorporazione dei radiometalli nelle biomolecole. Il processo si concentra sulla formazione di un legame stabile tra il fluoro ed elementi metallici.

Sono stati investigati degli elementi in grado di legarsi con il fluoro con un'entalpia di legame elevata e una bassa energia di attivazione in condizioni moderate, formando prodotti altamente stabili cineticamente [17]. Il primo utilizzo ha previsto la formazione del legame Si-¹⁸F (~576 kJ mol⁻¹) che, nonostante la bassa stabilità cinetica all'idrolisi, ha previsto un notevole sviluppo di strategie sintetiche alternative al C-¹⁸F grazie alla facilità di formazione di legami anche in condizioni acquose. È noto che la stabilità dei legami Si-F è influenzata dai gruppi funzionali piuttosto ingombrati, presenti nelle vicinanze dell'atomo di silicio. Un altro radiotracciante inorganico prevede la formazione del legame Al-¹⁸F (675 kJ mol⁻¹) che può essere formato in ambienti a bassa concentrazione di fluoro e in condizioni acquose. L'unità Al-¹⁸F può essere coordinata con il chelante NOTA attraverso tutti gli atomi di N e da due bracci carbossilati per dare un complesso a sei coordinate, lasciando il terzo braccio pendente libero per la bioconiugazione. Ultimamente grande interesse ha suscitato l'utilizzo del boro nella formazione B-¹⁸F (732 kJ mol⁻¹). Grazie alla fluorurazione [¹⁸F] altamente stabile dei derivati arilboronici attivati con donatori di elettroni, che consentono una migliore stabilizzazione della struttura contro la solvolisi, l'approccio della radiofluorurazione BF₃ sembra essere una delle strategie più interessanti che supera alcuni degli svantaggi del C-¹⁸F.

2.2 Esempi sintetici di composti con il legame C-¹⁸F

Dal suo sviluppo nel 1999, la tecnica di imaging basata sulla tomografia a emissione di positroni (PET) è diventata lo standard di diagnostica principale in oncologia, cardiologia e neurologia. Il suo successo sicuramente è dovuto alla sua sensibilità, alla elevata risoluzione, alla possibilità di integrazione con la tomografia computerizzata (CT) o la risonanza magnetica (MRI) in modo da combinare informazioni funzionali e anatomiche, migliorando l'interpretazione delle immagini e la ed alla capacità di non essere invasiva, richiedendo solo l'iniezione endovenosa del tracciante radioattivo in tessuti biologici in quantità bassissime (pmol) e senza alterarne la funzionalità. Con il

notevole sviluppo e l'alta richiesta di questa tecnica innovativa, si è sempre alla ricerca di nuovi radiofarmaci in grado di aumentare l'efficienza. In precedenza, è già stato citato l'isotopo ^{18}F come radionuclide più utilizzato a causa delle ottime proprietà; di seguito verranno analizzati brevemente alcuni radiofarmaci attualmente in commercio marcati da ^{18}F .

❖ **Fluorodeossiglucosio (^{18}F -FDG)** è senza ombra di dubbio il radiotracciante più utilizzato in clinica, consiste in un analogo del glucosio marcato dal ^{18}F . Come anticipato nel capitolo precedente, le cellule tumorali sono caratterizzate da una glicolisi accelerata che risulta un importante marcatore biochimico della trasformazione cellulare. Infatti, le cellule tumorali riescono ad assorbire quantità notevolmente maggiori di glucosio alterando i sistemi biologici e metabolici. Il ^{18}F FDG è un analogo radiomarcato del glucosio, in cui il gruppo idrossilico sul secondo carbonio di una molecola di glucosio è sostituito da un atomo di fluoro. Compete con il glucosio per il trasporto attivo dal sangue alle cellule tramite vari tipi di proteine specifiche di trasporto del glucosio (GLUT). A livello intracellulare il FDG viene fosforilato trasformandosi in FDG-6-fosfato che non può essere ulteriormente metabolizzato per via della mancanza di un atomo di ossigeno. Così il FDG-6-fosfato rimane bloccato nella cellula.

La sintesi del ^{18}F -FDG ha inizio con la produzione del radionuclide attraverso un ciclotrone, successivamente in base alla produzione di fluoro elettrofilico ($^{18}\text{F}_2$) oppure, fluoro nucleofilico ($^{18}\text{F}^-$) si potranno apportare diverse strategie sintetiche.

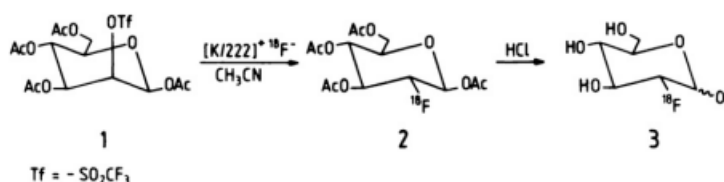


Figura 2.5: reazione di sintesi del ^{18}F -FDG tramite reazione $\text{S}_{\text{N}}2$ [18]

Il metodo più utilizzato, descritto nella figura 2.4, prevede una fluorurazione nucleofila in acetonitrile di un precursore derivato del glucosio, comunemente il trifluorometansolfonato di mannosio (mannosio triflato, 1), il quale subisce una reazione di sostituzione in presenza di ^{18}F [Kryptofix 2.2.2]che permettere di avere a disposizione il fluoruro in una forma nucleofila attiva (2). Questa reazione sostituisce il gruppo trifluorometansolfonato con il ^{18}F fluoruro. Infine, al fine di ottenere il prodotto finale, il prodotto deve essere deproteetto tramite idrolisi (3). La miscela di reazione viene purificata attraverso cromatografia su colonna o su strato sottile per rimuovere i reagenti non reagiti e i sottoprodotti. Il prodotto

purificato, [^{18}F]FDG, viene formulato in una soluzione sterile, adatta per l'iniezione in pazienti. Prima dell'uso clinico, il [^{18}F]FDG viene sottoposto a rigorosi test di controllo di qualità per garantirne la purezza, la sterilità, l'attività specifica e l'assenza di contaminanti radioattivi o chimici.

La sintesi del [^{18}F]FDG richiede competenze specializzate in radiochimica e deve essere eseguita in ambienti adeguatamente schermati e controllati per garantire la sicurezza degli operatori e dei pazienti. L'applicazione del FDG è molteplice: si va dall'applicazione in clinica per valutare il giusto funzionamento metabolico del glucosio in cuore, polmoni e cervello, all'imaging di tumori al seno, colorettales e polmoni.[18]

- ❖ **La 3-deossi-3-fluorotiminina (^{18}F -FLT)** è stata sintetizzata per la prima volta nel 1998 e risulta un analogo della timidina marcata con il ^{18}F usato come tracciante PET per la proliferazione cellulare.

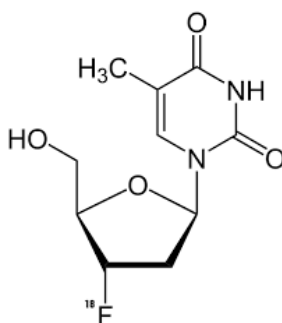


Figura 2.6: struttura ^{18}F -FLT

Il meccanismo è piuttosto complesso (Figura 2.6), ma in generale viene inglobata all'interno delle cellule attraverso i trasportatori di nucleosidi per la via di recupero della pirimidina, parallela alla timidina. Successivamente viene fosforilata dalla timidina chinasi 1 (TK1), rimanendo inglobata all'interno delle cellule (e non viene incorporata nel DNA). Essendo la TK1 specialmente espressa durante la fase del ciclo cellulare, l'accumulo del ^{18}F -FLT è indicativo della proliferazione cellulare [19].

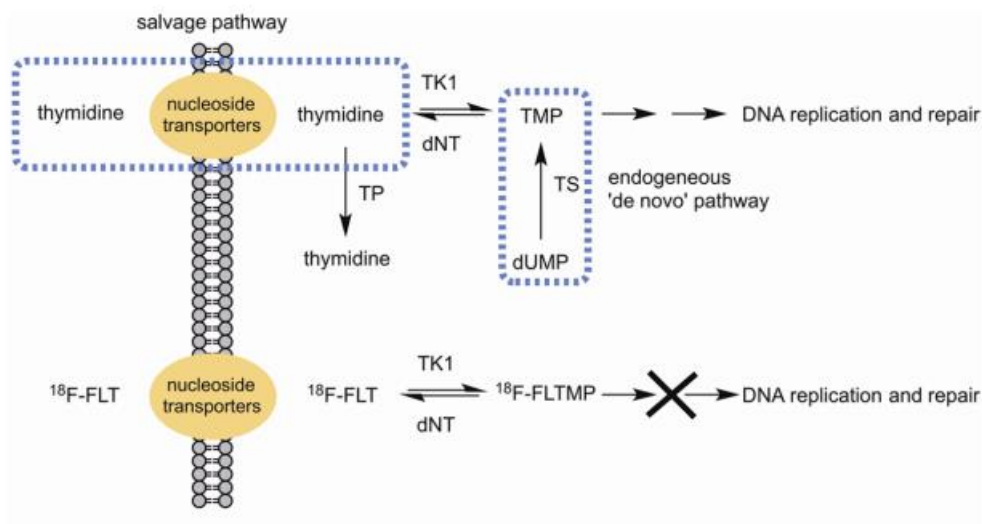


Figura 2.7: meccanismo di assorbimento del ^{18}F -FLT[19]

In generale questo marcatore per la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare riesce a rivelare tumori, distinguerli da maligni a benigni e misurarne l'aggressività. Ha un'attività ottimale soprattutto per l'imaging di tumori ai polmoni, di tumori nel tratto gastrico, neuroendocrini e dei linfomi. [20]

- ❖ **Fluorodopa (^{18}F -FDOPA):** È un analogo della L-DOPA, un precursore della dopamina, nonché neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale, che viene radiomarcato con ^{18}F .

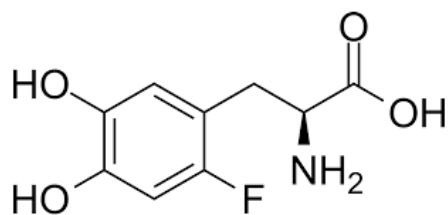


Figura 2.8: struttura ^{18}F -FDOPA

Questo radiofarmaco viene utilizzato principalmente per la diagnosi di malattie neurologiche, come il morbo di Parkinson, ma anche oncologiche, specialmente tumori neuroendocrini. Tali tumori hanno la capacità di concentrare aminoacidi all'interno dello spazio citoplasmatico per un meccanismo metabolico, in queste situazioni il ^{18}F -FDOPA agisce come tracciante mirato, migliorando la sensibilità e la specificità rispetto ad altri radiofarmaci utilizzati nell'imaging convenzionale. La dopamina risulta incapace di attraversare la barriera ematoencefalica, tuttavia la L-DOPA viene trasportata nel cervello dal sistema di trasporto degli aminoacidi e convertita in dopamina dall'azione di decarbossilazione degli

amminoacidi aromatici e successivamente immagazzinata in vescicole intraneuronali e rilasciata quando la cellula nervosa si attiva. Essendo il ^{18}F -FDOPA analogo alla L-DOPA seguirà lo stesso processo metabolico agendo come marcatori *in vivo* della degenerazione dopaminergica in seguito ad una malattia neuronale. Invece, a livello oncologico, si osserva una concentrazione a livello tumorale di amminoacidi, permettendo al ^{18}F -DOPA di essere un tracciante con alta sensibilità e specificità [20].

- ❖ **Fluoromisonidazolo (^{18}F -FMISO):** è un radiotracciante utilizzato nella PET per la visualizzazione dell'ipossia tumorale. Questo agente riesce a quantificare l'espansione della zona ipossica risultando fondamentale nella diagnostica tumorale. Per ipossia si intende la condizione in cui si risulta carenti di ossigeno a livello tissutale, il meccanismo che alimenta la crescita delle cellule tumorali e le spinge a creare metastasi. Il meccanismo di uptake del ^{18}F -FMISO si basa su enzimi che sono sovraregolati in stato di ipossia e dipendono dall'ossigeno disponibile, generando così un contrasto ben marcato nelle regioni carenti di ossigeno. [21]

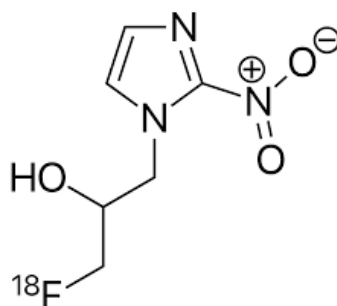


Figura 2.9: struttura ^{18}F -FMISO

Attualmente le strategie sintetiche di questo marker tumorale sono due: sostituzione nucleofila su un precursore protetto con successiva deprotezione; oppure l'apertura dell'anello epossidico e la produzione di un intermedio marcato con ^{18}F (epifluoridrina) con successivo accoppiamento alla porzione nitroimidazolica in condizioni basiche. Il primo metodo risulta comunque il più utilizzato (Figura 2.9): viene sfruttato il precursore 1-(2'-nitro-1'-imidazolil)-2-O-tetraidropiranil-3-O-toluensulfonilpropanediolo (NITTP) e attraverso sostituzione nucleofila si ottiene un labeling diretto per via dell'uscita di un gruppo tosilato, seguita dall'idrolisi del gruppo protettore [22].

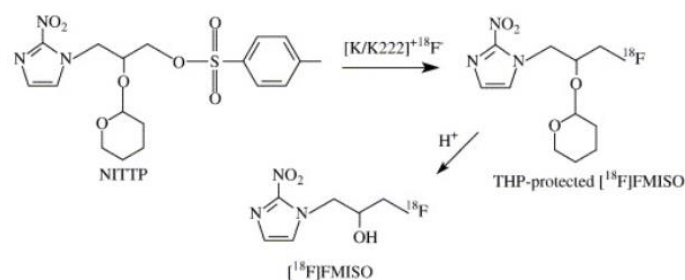


Figura 2.10: reazione di sostituzione nucleofila per la sintesi del ^{18}F -FMISO.

2.3 Radiotraccianti inorganici

Ultimamente tra questi elementi sono stati presi in considerazione il boro, il silicio e l'alluminio. La prima procedura di formazione del $\text{Al-}^{18}\text{F}$, [21] attuata nel 2013 riportava una marcatura in due fasi: formazione del complesso alluminio fluoruro e successivamente la reazione con il chelante scelto per lo sviluppo del radiofarmaco. Negli anni però la procedura di marcatura ha subito delle modifiche specialmente nell'utilizzo di nuovi chelanti.

Come viene riportato nell'articolo di Russelli et al. [23] per effettuare la marcatura a temperatura ambiente attraverso la formazione del complesso di $\text{Al-}^{18}\text{F}$ sono stati sviluppati tre chelanti pentadentati semirigidi con braccia flessibili (Figura 2.16) portando allo sviluppo di nuovi complessi $\text{Al-}^{18}\text{F}$ compatibili con biomolecole termosensibili.

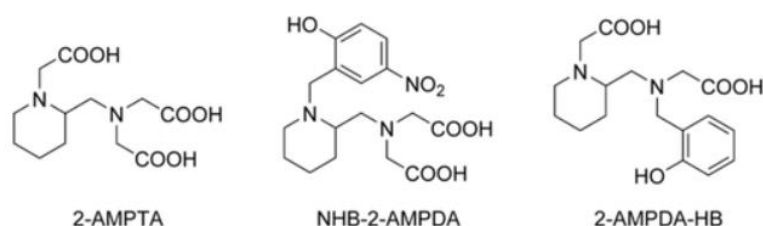


Figura 2.11: leganti utilizzati nell'articolo [23].

La reazione di marcatura è stata effettuata a pH 4 e pH 5 a diverse temperature (37°C e 80°C) per dodici minuti. Si è dimostrato che a pH 5 tutti i chelanti (2-AMPDA-HB, NHB-2-AMPDA e 2-AMPTA) riportavano un'ottima Radiochemical Yield (resa radiochimica, RCY) che si riferisce alla quantità di prodotto radiomarcato ottenuto rispetto alla quantità teoricamente possibile, espressa in

percentuale, a temperatura ambiente. Gli studi hanno poi proseguito con applicazioni *in vitro*, utilizzando siero umano (HS), PBS (soluzione salina tamponata con fosfato in grado di imitare le condizioni biologiche), EDTA e NaCl, ed infine *in vivo*. Gli esperimenti attuati su cavie hanno determinato un'ottima stabilità del complesso $[Al^{18}F(2-AMPDA-HB)]$, con un basso accumulo di ^{18}F nelle ossa ed in altri organi in seguito al trattamento.

Studi [24] hanno riportato ottimi risultati utilizzando $Al-^{18}F$ complessato con chelanti quali NOTA, NODA e NODAGA. In essi viene studiata anche la stabilità con il NO₂A. La marcatura è stata effettuata in maniera analogamente all'esempio precedente [23], formando $Al-^{18}F$ utilizzando $AlCl_3$ e NaF; il complesso è stato poi coordinato con il chelante NO₂A in condizioni acide (pH4.5) e a temperatura al di sopra dei 70°C.

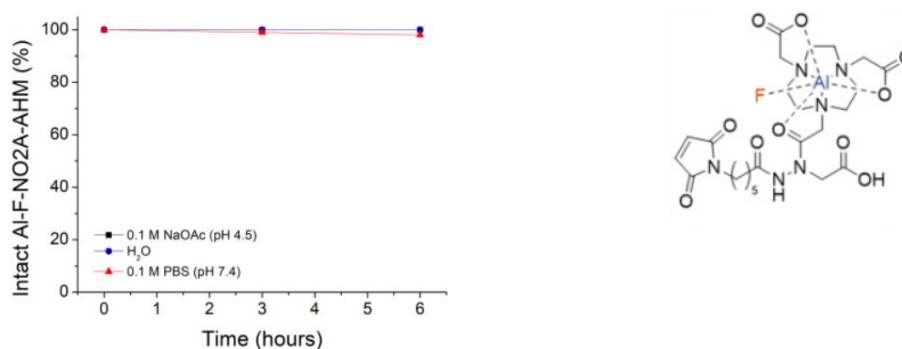


Figura 2.12: stabilità nel tempo in diverse condizioni (NaOAc, H₂O, PBS) del complesso AlF-NO₂A-AHM.[24]

La stabilità del complesso è stata studiata lungo un periodo di sei ore in presenza di 0.1 M PBS (pH 7.4); H₂O e NaOAc (pH 4.5) mostrando ottimi risultati nel tempo: non si è osservata né decomplessazione né defluorurazione.

Al contrario, la marcatura del fluoro attraverso la formazione di Si-¹⁸F e B-¹⁸F viene effettuata attraverso lo scambio ionico del ¹⁹F con il suo isotopo radioattivo. In entrambi i casi la procedura può essere eseguita in condizioni blande: i solventi utilizzati possono variare dall'acetonitrile all'acqua e non sono richieste alte temperature per la marcatura. Gli organotrifluoroborati risultano stabili, facilmente isolabili e caratterizzabili tramite spettroscopia NMR del ¹⁹F. Questo approccio ha permesso di marcare con successo peptidi complessi, come Tyr3-octreotate (TATE), bradichinina, bombesina e un dimero fluorescente di RGD. Il problema significativo con i primi composti a base di SiFA (silicio-fluoro-accettore) risultava la lipofilia elevata, per via della presenza di gruppi ingombranti, come terzbutile, situati sul Si. Ciò portava un accumulo del radio tracciante in organi quale il fegato, riducendo la disponibilità del tracciante per l'imaging delle aree target come i tumori.

Tale problema è stato però superato aggiungendo al composto dei gruppi idrofili come zuccheri amminici acetilati caratterizzati da un'ulteriore catena laterale di asparagina. Anche i composti SiFA vengono usati per marcare peptidi come il TATE che riescono ad agire in funzione della diagnostica tumorale essendo dei recettori della somatostatina.

Anche il legame Ga-F è stato esplorato per la radiofluorinazione diretta, ma i complessi risultanti non hanno riscontrato sufficiente stabilità contro la defluorinazione. In confronto, lo Scandio (Sc(III)) ha mostrato una maggiore caratteristica hard, rendendolo una valida alternativa per la formazione di complessi ternari $[^{18}\text{F}][\text{Sc}(\text{L})\text{F}]$ stabili. Alcuni studi [25] dimostrano la formazione rapida e in situ del complesso di coordinazione Sc- ^{18}F : $[^{18}\text{F}][\text{ScF}(\text{mpatcn})]^-$, rappresentato in Figura 2.18, ottenendo un procedimento di radiomarcatura ad alta efficienza.

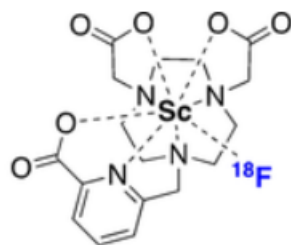


Figura 2.13: rappresentazione del complesso $[^{18}\text{F}][\text{ScF}(\text{mpatcn})]^-$. [25]

Si è dimostrato che il legame Sc-F è eccezionalmente robusto e compatibile in vivo, mostrando prestazioni ideali per l'imaging dell'antigene di membrana specifico della prostata senza defluorinazione in vivo. Per la formazione dei corrispondenti complessi radiofluorurati, sono stati utilizzati solventi organici a temperature superiore a 60°C. Il complesso target è stato studiato attraverso radio HPLC e successivamente formulato per l'iniezione in soluzione di PBS. Il risultato non ha dimostrato decomplezione rilevabile dopo 4 ore. Attraverso degli studi in vivo, si è notata la completa assenza di ^{18}F nelle ossa, un'ottima visibilità del tumore, i complessi $[^{18}\text{F}][\text{ScF}(\text{mpatcn})]^-$ possono essere considerati completamente compatibili in vivo e inerti alla defluorinazione. Nell'articolo viene poi presentato un confronto diretto con i dati di biodistribuzione di $[^{47}\text{Sc}]\text{Sc}(\text{picaga})\text{-DUPA}$, garantendo un ottimo accordo riguardo l'assorbimento nei tessuti target e non target, dimostrando che il complesso ternario del tipo $[^{18}\text{F}][\text{ScF}(\text{mpatcn})]^-$ è un partner diagnostico adeguato per l'isotopo terapeutico ^{47}Sc .

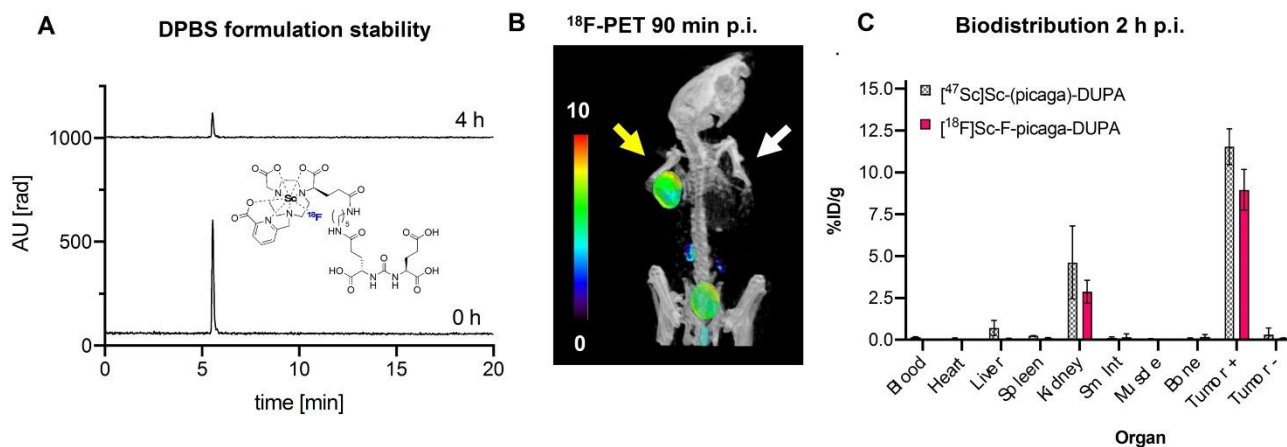


Figura 2.14: A) Radio HPLC del $[^{18}\text{F}]\text{Sc}-\text{F}(\text{picaga})\text{-DUPA}$. B) Rappresentazione della PET in topi portatori di tumori (freccia gialla) e assenza di accumulo nei tessuti non target (freccia bianca). C) Confronto tra $[^{18}\text{F}]\text{Sc}-\text{F}(\text{picaga})\text{-DUPA}$ e $^{47}\text{Sc}-(\text{picaga})\text{-DUPA}$. [25]

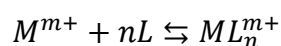
2.4 Chelanti bifunzionali per imaging PET

Come anticipato nel capitolo precedente, la bioconiugazione per la sintesi di radiofarmaci si riferisce al processo chimico mediante il quale una molecola biologica viene legata a un isotopo radioattivo, il quale è inglobato in una struttura stabile in forma di complesso. La sintesi di una sonda per imaging o terapia prevede diverse fasi: scelta del bersaglio, sintesi del chelante, coniugazione ad una molecola biologica, radiomarcatura e, infine, purificazione e analisi vera e propria. Tendenzialmente vengono utilizzati i chelanti bifunzionali (BFC, *Bifunctional Chelators*), composti cruciali nella chimica di coordinazione e delle sonde di imaging. I BFC vengono progettati per avere una duplice funzione: la prima consiste nel complessare in maniera stabile (termodinamicamente e cineticamente) degli ioni metallici attraverso siti di coordinazione specifici, in modo che il radiometallo non possa dissociarsi nell'organismo ed evitando perciò il rilascio e conseguentemente tossicità per il paziente. La seconda funzione consiste nella coniugazione a biomolecole, anticorpi o peptidi in modo da poter essere trasportato fino al sito target per poter agire con la sua relativa azione da radiofarmaco. Tendenzialmente qualsiasi chelante bifunzionale è dotato di una porzione di molecola che offre un'ambiente coordinativo altamente stabile per i radiometalli: la scelta del chelante, perciò, dipende anche a che radionuclide si intende utilizzare e per quale tecnica. Quando un chelante bifunzionale

coordina un nuclide radioattivo con funzione di agente diagnostico o terapeutico, si ha la necessità di tener conto di alcune caratteristiche relative al complesso[26]:

- ❖ La cinetica di chelazione deve essere più rapida rispetto all'emivita del radionuclide;
- ❖ Si devono tener conto delle diverse condizioni di marcatura per il radioisotopo in considerazione. Bisognerà agire in maniera ottimale sulla temperatura e sul pH in maniera da trovare le condizioni più efficienti di radiomarcatura. Tendenzialmente, però, le alte temperature di reazione possono danneggiare l'attività biologica dei targeting-agent: risulta perciò spesso necessario lavorare a temperatura ambiente;
- ❖ La resa della complessazione deve essere quantitativa o quasi quantitativa con elevate attività specifiche ovvero la quantità di radioattività per unità di massa di un composto o elemento;
- ❖ Deve esserci un'elevata inerzia cinetica e stabilità termodinamica del radiofarmaco per evitare la decomplessazione e quindi il rilascio del radiometallo in vivo.

La stabilità dei complessi è fondamentale per garantire che il metallo rimanga associato al chelante durante il trasporto nel corpo minimizzando la tossicità e migliorando l'efficacia del trattamento. La stabilità è governata dai valori delle costanti di stabilità (K_{LM}): maggiore è la costante, il complesso risulterà termodinamicamente stabile.



$$K_{ML} = \frac{[ML_n]^{m+}}{[M^{m+}] * [L]^n}$$

Per aumentare la stabilità dei complessi ci si basa anche sulla teoria HSAB sviluppata da Pearson nel 1968, la quale suddivide gli elementi in due macrocategorie, *hard* e *soft*. Questa classificazione permette di prevedere la stabilità dei complessi in relazione alla natura del metallo che complessano. A livello generico, un composto di coordinazione è formato da un acido di Lewis (elettrofilo): uno ione metallico che accetta doppietti elettronici; ed una base di Lewis (nucleofilo): un gruppo funzionale che complessa il metallo e dona doppietti elettronici (Figura 2.15). Gli ioni metallici definiti come acidi hard sono acidi di Lewis, con bassa polarizzabilità, alte cariche positive e piccole dimensioni, ed inoltre gli elettroni del guscio esterno non risultano facilmente eccitabili. Tendenzialmente questi ioni prediligono dei gruppi donatori anionici con carattere hard (basi hard), come ad esempio gli acidi carbossilici. Le basi hard sono basi di Lewis con un centro donatore a bassa

polarizzabilità, alta elettronegatività, piccole dimensioni, con orbitali ad alta energia difficili da ossidare. Gli ioni acidi soft sono invece acidi di Lewis che hanno un centro ad alta polarizzabilità, sono ioni a bassa carica positiva e grandi dimensioni con elettroni del guscio esterno di valenza facilmente eccitabili. Gli elementi della categoria soft prediligono legami che si ottengono con altri gruppi donatori soft. Le basi soft sono infatti basi di Lewis con un centro donatore ad alta polarizzabilità, bassa elettronegatività, grandi dimensioni, orbitali vuoti a bassa energia e facilmente ossidabili.

Hard Lewis acids	Borderline Lewis acids	Soft Lewis acids
H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Sr ²⁺ Sc ³⁺ , Fe ³⁺ , Ln ³⁺	Fe ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ Cd ²⁺ , Pd ²⁺ , Pt ²⁺ Tl ³⁺
Hard Lewis bases	Borderline Lewis bases	Soft Lewis bases
H ₂ O, NH ₃ , R ₂ O Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ ,	Br ⁻	RSH, R ₂ S I ⁻ , CN ⁻

Figura 2.15: classificazione degli elementi secondo la teoria HSAB[27]

In generale il principio HSAB afferma che una specie hard avrà più tendenza a formare legami stabili con un'altra specie hard, viceversa una soft con un'altra specie soft.

I chelanti bifunzionali, e più in generale i chelanti, possono essere suddivisi in due categorie[28]: acilici e macrociclici. I primi generalmente non richiedono condizioni estreme per la complessazione ma sono più inclini a rilasciare il metallo in *vivo* o alla transchelazione da parte di leganti endogeni, cioè, formano complessi cineticamente labili. I leganti macrociclici sono dotati di migliori proprietà di complessazione dei metalli per via dell'effetto macrociclo; esso, infatti, implica un aumento della stabilità a causa della rigidità dei chelanti che riescono ad "racchiudere" il metallo in maniera più efficace essendo già preorganizzati; un'estensione dell'effetto chelante, dove la presenza di più gruppi donatori del chelante potenziano il legame con il metallo. La rigidità del macrociclo inoltre rende i complessi meno facilmente dissociabili sia per effetto dell'acidità che per transmetallazione o transchelazione, cioè li rende cineticamente inerti. Di seguito vengono riportati degli esempi di chelanti acilici e macrociclici attualmente utilizzati in ambito (pre)clinico.

- ❖ DTPA (acido dietilentriamminopentacetico): è un chelante aciclico ottadentato formato da cinque atomi di ossigeno derivati da gruppi carbossilici e tre atomi di azoto dei gruppi amminici.

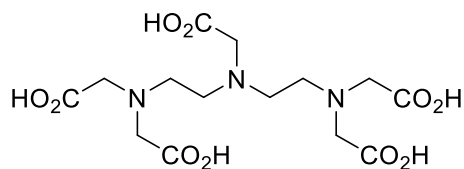


Figura 2.16: struttura del DTPA

Svolge un ruolo piuttosto fondamentale in ambito medico, specialmente nella risonanza magnetica e nella medicina nucleare per coordinare radionuclidi quali ^{111}In , ^{212}Bi , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga . La radiomarcatura con DTPA può essere eseguita in condizioni relativamente blande, il che rende questo chelante adatto per una vasta gamma di applicazioni, inclusi i composti sensibili al calore. Partendo dalla struttura di base del DTPA si possono ricavare chelanti derivati variando la natura delle funzionalizzazioni laterali o con il fine di renderlo bifunzionale oppure per migliorare la stabilità e la sicurezza dei complessi. Il DTPA è utilizzato nel trattamento dell'avvelenamento da metalli pesanti, come il piombo, il mercurio e il plutonio, legandosi a questi metalli e facilitandone l'escrezione dal corpo.

- ❖ EDTA (acido etilendiamminotetraacetico): è uno dei leganti poliammino-policarbossilici più usati e conosciuti. È un legante esadentato con struttura basata sull'etilendiammina e quattro braccia laterali acetiche.

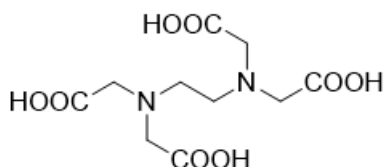


Figura 2.17: struttura dell'EDTA

La coniugazione dell'EDTA può essere sfruttata in tre modi differenti: usando i gruppi carbossilici, legando un residuo a una delle posizioni α rispetto ai gruppi carbossilici oppure inserendo un gruppo specifico nello scheletro etilendiamminico. La modifica dell'EDTA consente di avere nuove molecole in grado aumentare il potere operativo in numerose

applicazioni chimiche e biologiche. Viene associato alla terapia chelante per rimuovere gli eccessi di metalli pesanti dall'organismo.

- ❖ DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico): è il chelante macrociclico derivante dal *cyclen* (1,4,7,10-tetraazaciclododecano) (Figura 2.18) che viene funzionalizzato in base allo ione metallico e/o al linker scelto. Il DOTA, in base allo ione metallico considerato, può essere un chelante ottadentato avente altissima stabilità termodinamica e inerzia cinetica. Rappresenta uno dei principali chelanti utilizzati in radiochimica ed è uno degli standard di riferimento per moltissimi isotopi quali ^{177}Lu , $^{80/90}\text{Y}$, $^{44/47}\text{Sc}$, ^{68}Ga , ^{64}Cu generando dei complessi altamente stabili.

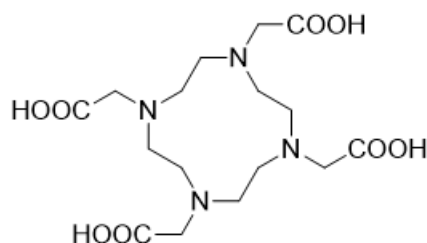


Figura 2.18: struttura del DOTA

La sua struttura gli permette di coordinare ioni metallici attraverso i quattro gruppi amminici terziari e i quattro acidi carbossilici. Generalmente lo svantaggio delle marcature con il chelante DOTA risulta l'utilizzo di temperature elevate (fino a 95 °C) e tempi prolungati per garantire una chelazione completa. Il DOTA è ampiamente utilizzato nella radioimmunoterapia, dove è coniugato con anticorpi monoclonali per trasportare isotopi terapeutici direttamente alle cellule tumorali. È anche utilizzato nell'imaging diagnostico, sia PET che SPECT, per tracciare specifici target biologici. Esempi di applicazioni includono DOTA-TATE (usato per il targeting dei recettori della somatostatina nei tumori neuroendocrini) e DOTA-TOC (utilizzato principalmente per il targeting di recettori specifici nei trattamenti del cancro). Diversi derivati dal DOTA con vari tipi di funzionalizzazioni sono utilizzati in (pre)clinica, seppure alcuni abbiano una costante di stabilità inferiore rispetto al DOTA; non risultano però pericolosi quando applicati *in vivo*.

- ❖ NOTA (1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico) fa parte dei chelanti policiclici poliammino policarbossilici ed è composto da un anello 1,4,7-triazaciclononano con tre braccia acetiche sugli atomi di azoto. È un chelante esadentato che lega un metallo attraverso sei siti di

coordinazione: tre azoti e tre ossigeni. La chelazione di ioni piccoli tripositivi quali il Fe^{3+} o il Ga^{3+} porta a formare complessi piuttosto stabili ed evita il rilascio del metallo nell'organismo.

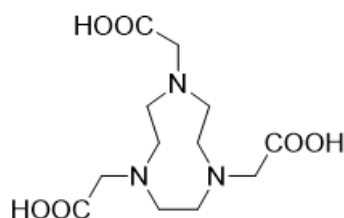


Figura 2.19: struttura del NOTA

Avendo una gabbia di coordinazione più piccola rispetto a quella del DOTA, si presta meglio a cationi metallici piccoli come Cu^{2+} e Ga^{3+} , in particolare in ambito diagnostico viene spesso utilizzato con il ^{68}Ga perché dona grande stabilità in vivo, oltre a presentare una rapida cinetica di formazione a temperatura ambiente. Il NOTA ha mostrato con il ^{64}Cu buone proprietà di marcatura e stabilità rispetto ad altri chelanti come DOTA, EDTA e DTPA. La marcatura può essere effettuata a temperatura ambiente in un tempo compreso tra i 30 ed i 60 minuti. Anch'esso può essere modificato attraverso procedure sintetiche per renderlo più adatto alle diverse situazioni/applicazioni.

- ❖ AAZTA(1,4-bis-(carbossimetilene)-6,9-diaza-3,12-dioxo-5,8,11-triaza-tridecanoico): è il chelante utilizzato per complessare ioni metallici come Ga^{3+} , In^{3+} , Sc^{3+} .

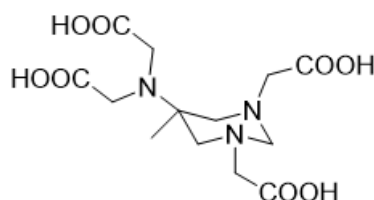


Figura 2.20: struttura dell'AAZTA

AAZTA è un chelante polidentato che lega il metallo attraverso più atomi donatori (azoto e ossigeno), formando complessi molto stabili a secondo del metallo utilizzato. La stabilità viene influenzata dalle dimensioni e geometrie del metallo, che si devono adattare ai siti di legame dell'AAZTA; ed inoltre metalli con alta carica e raggio ionico compatibile, come le terre rare e alcuni metalli di transizione, formano legami più forti con i siti donatori (azoto e ossigeno) dell'AAZTA. È usato nella preclinica per la radiomarcatura di molecole per imaging PET, in modelli murini per la diagnosi di patologie come il cancro, specialmente con ^{68}Ga , ^{64}Cu e ^{111}In . La marcatura può essere effettuata a temperature moderate (anche ambiente) ed in tempi brevi, aggiungendo un vantaggio rispetto ad altri chelanti quali DOTA. Per questo chelante il pH è un fattore importante e varia a seconda del metallo che si utilizza; generalmente si opera in un intervallo di pH vicino al fisiologico.

I chelanti bifunzionali sono strumenti cruciali nella diagnostica e nella ricerca medica, consentendo la tracciabilità precisa di biomolecole nel corpo tramite imaging PET. La loro capacità di formare complessi stabili con radionuclidi e di connettersi specificamente a biomolecole li rende indispensabili per migliorare l'accuratezza e l'efficienza delle tecniche di imaging.

Capitolo 3: OBIETTIVO DELLA TESI

Il progetto si pone come obiettivo primario la sintesi di leganti per la complessazione degli ioni metallici trivalenti scandio(III), ittrio(III), terbio(III) e lutezio(III) e sullo studio dei relativi complessi ternari con $[^{18}\text{F}]$ fluoruro. I leganti presi in esame sono stati pensati in modo da favorire l'interazione dello ione fluoruro con il metallo anche tramite interazioni con gruppi aromatici. Una volta ottenuti i complessi metallici, verranno svolti studi preliminari in diverse condizioni sperimentali (temperatura, pH e rapporti stechiometrici) utilizzando l'isotopo non radioattivo ^{19}F per poi passare agli studi di radiomarcatura con ^{18}F . L'obiettivo atteso di tale ricerca è lo sviluppo di una procedura semplice e rapida per la marcatura con $[^{18}\text{F}]$ di sonde di imaging molecolare, con il potenziale di introdurre nuovi strumenti diagnostici nel campo della medicina nucleare.

I dati riportati in letteratura relativamente all'approccio $[\text{Al}^{18}\text{F}]^{2+}$, prevedono la sintesi indiretta dell'addotto ternario, partendo dalla chelazione del metallo-fluorurato ^[22]. Questo processo, sebbene efficace, risulta dispendioso in termini di tempo. Un altro punto chiave di questo lavoro è quindi quello di investigare un possibile metodo innovativo per marcare in modo diretto i complessi con ^{18}F .

Studi di luminescenza per la quantificazione di ioni fluoruro sono stati svolti su ioni lantanoidei (Eu, Tb e Yb)[29] ed hanno dimostrato la possibilità di formare un dimero supramolecolare contenente il fluoruro a ponte. La struttura cristallina di uno di questi complessi fluorurati ha rivelato che il fluoruro risulta racchiuso tra due unità di $[\text{EuL}]$, (dove L rappresenta il legante) stabilizzato da interazioni π - π tra gli anelli aromatici e legami idrogeno C-H \cdots F.

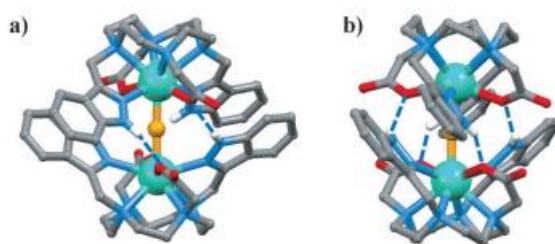


Figura 3.1: struttura cristallina del dimero $[\text{F}\subset(\text{EuL})_2]^+$: a) visuale perpendicolare; b) visuale per il lungo[29]

Anche altri lantanidi come Tb e Yb, hanno mostrato un comportamento simile. Le analisi hanno determinato delle costanti di stabilità molto alte: $\log \beta_{\text{Eu}} = 13.0$; $\log \beta_{\text{Tb}} = 12.5$; $\log \beta_{\text{Yb}} = 12.6$.

Questi risultati sono stati il punto iniziale per la seguente tesi, aprendo nuove prospettive per l'uso di tali complessi in applicazioni come la tomografia a emissione di positroni con ^{18}F .

Il progetto prevede il design e la sintesi di chelanti otta/eptadentati derivati dal DOTA (acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico) e dall'AAZTA (acido 6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina tetraacetico), modificati per ottenere complessi M(III)-L con carica positiva, aumentando così l'affinità per gli anioni F⁻ e favorendo le interazioni di legame idrogeno C-H...F.

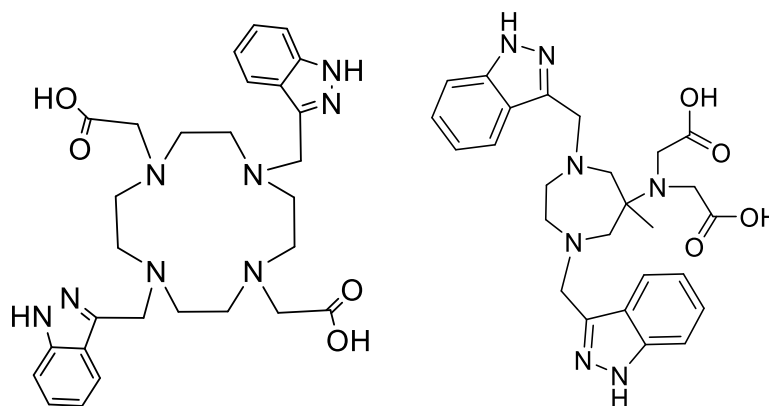


Figura 3.2: Struttura di DO2A2Ind e AAZ2AInd.

La formazione dei complessi ternari con ^{19/18}F proseguirà attraverso due strategie principali:

- I. l'aggiunta diretta di anioni fluoruro al complesso [ML(H₂O)]⁺ per valutare l'affinità del fluoro rispetto al complesso metallico;
- II. la reazione tra il chelante e il complesso M-F in ambiente acquoso, a diverse temperature, apporto stechiometrico e pH, al fine di ottimizzare le condizioni di reazione.
- III. Le metodologie ottimizzate in condizioni non radioattive saranno poi tradotte in procedure efficienti per la produzione di traccianti innovativi a base di ¹⁸F.

Le conoscenze acquisite riguardo agli addotti ternari ML-F rappresenteranno un significativo avanzamento nella chimica di coordinazione, con possibili applicazioni in medicina nucleare, particolarmente in ambito radiologico, consentendo di utilizzare i complessi Sc-F, Y-F, Tb-F e Lu-F come nuovi vettori promettenti per il trasporto del fluoro-18 su biomolecole. Questi metalli sono stati presi in considerazione per il loro contributo terapeutico, specialmente lo Sc(III) il quale nei più recenti studi ha dimostrato eccellenti qualità diagnostiche [30]. L'obiettivo futuro di questa ricerca sarà quello di combinare l'utilizzo della sonda diagnostica contenente ¹⁸F con una sonda terapeutica esattamente identica ma contenente un isotopo degli ioni metallici presi in esame che emetta particelle terapeutiche α o β⁻ (⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁷⁷Lu e ¹⁴⁹Tb) aprendo il campo a possibili applicazioni teranostiche.

CAPITOLO 4: Parte sperimentale, sintesi dei complessi DO2A2Ind e AAZ2A2Ind.

4.1 Materiali e metodi

In questo capitolo vengono descritti i materiali, le tecniche e i metodi sperimentali impiegati per la sintesi dei composti oggetto di studio. I reagenti chimici e i solventi utilizzati in queste procedure sperimentali sono stati acquistati da fornitori commerciali, e sono stati impiegati senza ulteriori trattamenti di purificazione. Le analisi TLC (cromatografia su strato sottile) sono state eseguite usando lastre di silice Merck 60 F254, e le macchie sono state rivelate sia tramite esposizione a luce UV a 254 nm, sia tramite l'uso di reattivi come permanganato di potassio, che permettono di visualizzare i composti separati. Per la cromatografia su colonna, è stata utilizzata silice Merck 70-230 come fase stazionaria, con i dettagli riguardanti le composizioni degli eluenti riportati nelle procedure. Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando un sistema HPLC-MS a fase inversa, equipaggiato con pompe Waters 1525, un rivelatore UV/Vis Waters 2487 e un detector di massa Waters SQD 3100 in modalità ESI, che consente la ionizzazione degli analiti per la rilevazione. Gli spettri NMR per i nuclei ^1H e ^{13}C sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Advance III a 500 MHz, dotato di una sonda PABBO da 5 mm e controllo della temperatura BVT-3000. Il tetrametilsilano (TMS) è stato usato come standard di riferimento per i chemical shifts (δ), mentre le molteplicità dei segnali sono state indicate come singoletto (s), doppietto (d), tripletto (t) o multipletto (m).

Il processo sintetico dei leganti è stato intrapreso presso i laboratori dell'Università del Piemonte Orientale ad Alessandria. Per quanto riguarda la marcatura dei complessi con ^{18}F , essa è stata [30]sviluppata nei laboratori specializzati del dipartimento di medicina nucleare dell'ospedale di ricerca "Klinikum rechts der isar" dell'Università Tecnica di Monaco di Baviera.

La caratterizzazione HPLC - MS ha previsto l'utilizzo di due metodi HPLC (A e B) riportati a seguire:

Metodo A:

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

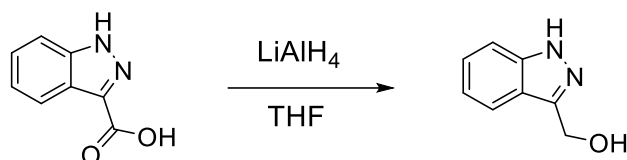
Metodo B:

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

4.2. Sintesi di *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato

I processi di sintesi iniziali hanno previsto una prima ottimizzazione sintetica del braccio derivato dall'acido indazolo-3-carbossilico, utilizzato per l'alchilazione del DO2A e dell'AAZ2A.

4.2.1 Sintesi del 3-idrossimetilindazolo

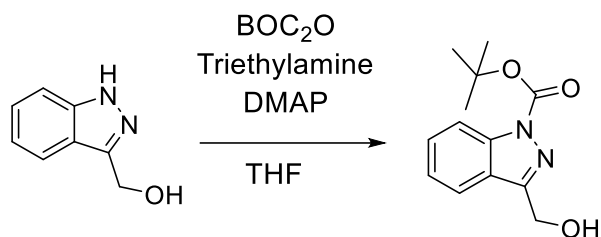


La procedura ha previsto l'utilizzo di 0.6 g (3.7 mmol) di acido indazolo-3-carbossilico sciolti in 30 mL di THF anidro. Si è disposta la soluzione all'interno di un bagno di ghiaccio e posta in agitazione; si è aggiunto lentamente, facendo gocciolare, 9.3 mL di LiAlH₄ (9.24 mmol, 2.5 eq) e si è lasciato reagire sotto flusso di N₂ per tutta la notte. È stata eseguita un'analisi in HPLC-MS (metodo A) per verificare la formazione del prodotto desiderato.

Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 4 mL di HCl (1M), lasciando in agitazione per 10 minuti. Successivamente, la soluzione è stata centrifugata per tre volte, in ciascuna delle quali si è prelevato il surnatante e lavato il precipitato con una soluzione di THF/HCl (4 mL ciascuno). La soluzione ottenuta risultava di un colore arancione. Il surnatante è stato estratto con 10 mL di H₂O e 20 mL di acetato di etile e la parte organica è stata tirata a secco. Il prodotto grezzo (0.62 g) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione per lo step successivo.

MS ESI⁺ m/z: 148.1 (C₈H₈N₂O), 149,3 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (500 MHz, MeOD, 25°C) δ 8.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.53 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.38 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 3.39 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (500 MHz, MeOD, 25°C): δ = 145.5 (-C-CH₂-OH), 140.9 (NH-C), 125.8 (ArC), 121.4 (ArC), 120.6 (ArC), 119.6 (ArC), 109.9 (ArC), 56.7 (-CH₂-).

4.2.2 Sintesi di *tert*-butil 3-(idrossimetil)-1H-indazolo-1-carbossilato

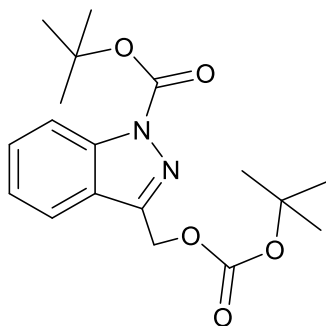


Il prodotto della reazione precedente (0.63 g, 4.2 mmol) è stato disciolto in 30 mL di THF anidro e 0.92 mL di Trietilammina (6.8 mmol) sono stati aggiunti al pallone di reazione. Sono stati aggiunti 0.12 g (0.94 mmol) di DMAP (4-dimetilamminopiridina) fino a completo scioglimento e successivamente sono stati aggiunti 0.64 g (0.75 eq) di Boc₂O per completare la protezione. La miscela di reazione è stata lasciata reagire fino al giorno successivo nel quale è stata tirata a secco ed estratta con 30 mL DCM e lavata per tre volte con 15 mL H₂O, tenendo la fase organica. Il peso del prodotto grezzo ottenuto risultava 0.84 g.

Il prodotto grezzo è stato purificato tramite colonna cromatografica utilizzando come fase stazionaria la silice e come miscela eluente iniziale DCM per poi passare a DCM/MeOH in rapporti 98:2 (RF= 0.85). Le frazioni sono state controllate in HPLC-MS (metodo A). Le frazioni contenenti il prodotto purificato sono state raccolte in un pallone e le componenti volatili eliminate sotto vuoto. Si è ottenuto un prodotto del peso di 0.508 g con una resa del 48.5%.

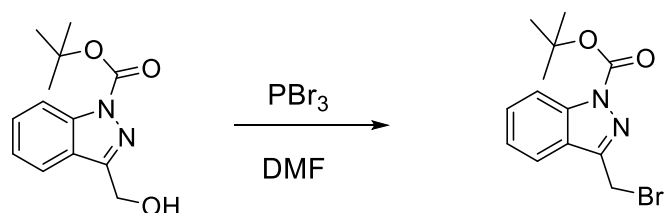
MS ESI⁺ m/z: 248.12 (C₁₃H₁₆N₂O₃), 249.13 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm)= 8.02 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, ArH), 7.83 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, ArH), 7.47 (t, 1H, ³J = 8.3 Hz, ArH), 7.25 (t, 1H, ³J = 8.3 Hz, ArH), 5.02 (s, 2H, -CH₂), 1.67 (s, 9H, C-(CH₃)₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm)= 149.1 (-N-COO), 144.4 (ArC-N), 137.9 (N-C-CH₂), 129.0 (ArC), 122.4 (ArC), 120.7 (ArC), 120.0 (ArC), 115.0 (ArC), 84.2 (O-C(CH₃)₃), 56.6 (CH₂-OH), 28.0 ((CH₃)₃).

È stato caratterizzato anche il principale sottoprodotto, caratterizzato da una doppia protezione: una sull'ammina e la seconda sul OH dell'alcol primario.[31]



MS ESI⁺ m/z: 348.2 (C₁₈H₂₄N₂O₅) 349.06 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C) δ 8.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.43 (t, *J* = 8.5, Hz, 1H, ArH), 5.58 (s, 2H, CH₂-O), 1.81 (s, 9H, N-OCO-(CH₃)₃), 1.58 (s, 9H, CH₂-OCOO-(CH₃)₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm)= 155.4 (CH₂-OCOO-), 148.7 (-N-COO-), 143.9 (ArC-N), 137.0 (N-C-CH₂), 129.4 (Ar-C-N-), 123.5 (ArC), 121.6 (ArC), 120.7 (ArC), 120.3 (ArC), 114.0 (ArC), 84.5 (-OCOO-C-(CH₃)₃), 84.2 (-N-COO-C-(CH₃)₃), 63.0 (CH₂), 28.0 ((-CH₃)₉).

4.2.3 Sintesi del *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato



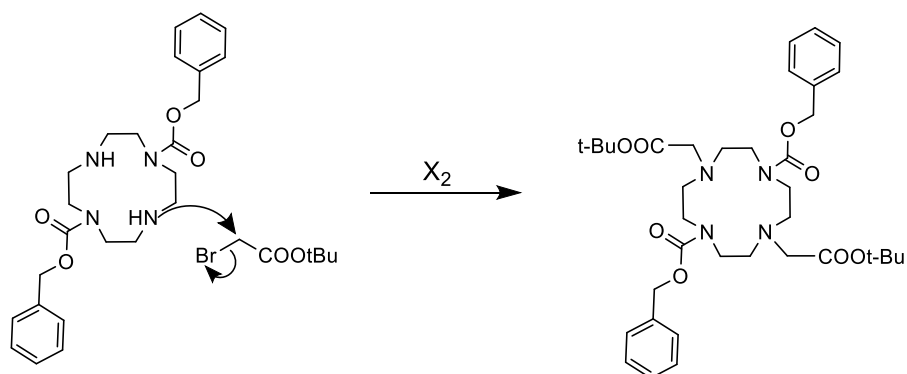
Il prodotto ottenuto dallo step precedente (0.508 g e 2.04 mmol) è stato sciolto in 23 mL di DMF e alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 2 eq di PBr₃ (0,45 mL), per poi lasciarlo in agitazione a reagire per un'ora sotto N₂ a temperatura ambiente. Successivamente è stata eseguita un'analisi in HPLC-MS per valutare la formazione del prodotto desiderato. Alla reazione sono stati aggiunti 25 mL di H₂O e successivamente la miscela è stata estratta con 30 mL di acetato di etile e la soluzione organica lavata con 15 mL H₂O per tre volte. Il prodotto grezzo ottenuto risultava di 0.45 g.

Successivamente è stata eseguita una purificazione attraverso colonna cromatografica; le prime frazioni sono state eluite con DCM, passando poi a 99:1 DCM/MeOH (Le frazioni contenenti il prodotto sono state caratterizzate tramite HPLC-MS, metodo A). Peso del prodotto finale 0.22 g (0.70 mmol). Resa = 34,4 %.

MS ESI⁺ m/z: 310.1 (C₁₃H₁₅BrN₂O₂), 311.1 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C): δ (ppm) = 8.10 (d, 1H, ³J=8.5 Hz, ArH), 7.97 (d, 1H, ³J=8.0 Hz, ArH), 7.66 (t, 1H, ArH), 7.46 (t, 1H, ArH), 5.05 (s, 2H, -CH₂), 1.66 (s, 9H, C-(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C): δ (ppm)= 148.3 (-N-COO-), 147.4 (ArC-N-), 139.9 (-CH₂-C-N-), 129.6 (ArC-), 123.9 (ArC-), 123.5 (ArC-), 121.0 (ArC-), 114.3 (ArC-), 84.9 (-C-(CH₃)₃), 27.6 (-C-(CH₃)₃), 23.6 (-C-CH₂-Br).

4.3 Sintesi del legante DO2A2Ind

4.3.1 Alchilazione del 1,7-bis-benzilossicarbammato-cyclen.2HCl (Cbz₂Cyclen)



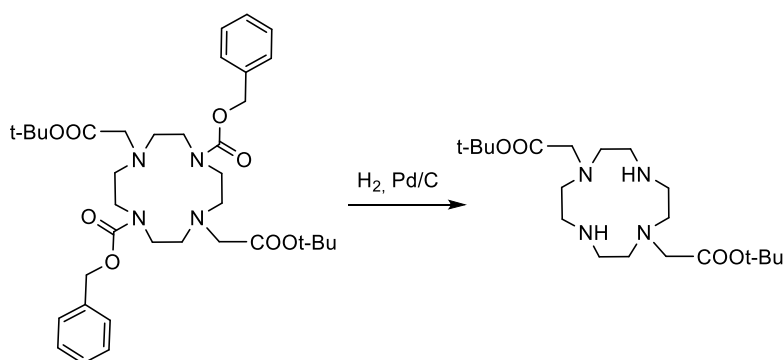
La sintesi del legante è partita da 1 g del composto Cbz₂Cyclen (1,96 mmol), al quale è stato aggiunto a 50 mL di acetonitrile e 1,34 g (5 eq; 9,7 mmol) di K₂CO₃. Il pallone è stato posto all'interno di un bagno di ghiaccio e successivamente si è fatto gocciolare 600 μL (2,1 eq; 4,08 mmol) di terz-butil bromoacetato sciolto in 10 mL di ACN. La soluzione è stata poi scaldata con un bagno d'olio alla temperatura di 60°C, e lasciata in agitazione tutta la notte.

Successivamente la miscela di reazione è stata portata a secco ridisciolta in 50 mL di DCM e lavata tre volte con 20 mL di H₂O. La fase organica è stata portata a secco. Il peso del prodotto ottenuto risultava 1,09 g.

Il prodotto grezzo è stato purificato su colonna cromatografica di silice, usando come miscela eluente DCM/MeOH 98:2. Durante il corso della purificazione, si è cambiata la fase eluente prima in 95:5 DCM/MeOH e poi in 9:1 DCM/MeOH. Le frazioni contenenti il prodotto sono state raccolte (caratterizzate in HPLC-MS utilizzando il metodo A) e tirate a secco. Il peso del prodotto purificato risultava di 0,383 g. Si è calcolata una resa di 28.0%.

MS ESI⁺ m/z: 668.4 (C₃₈H₅₆N₄O₈), 669.20 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm): 1.42 (s, 18H, -C(CH₃)₃), 2.87 (m, 8H, -CH₂N-, CH₂COOt-Bu), 3.2-3.4 (m, 12H, -CH₂N-, -CH₂CH₂-), 5.11 (s, 4H, -CH₂-Ph), 7.33 (m, 10H, -CH-Ph). ¹³C (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm): 28.2 (CH₃), 46.7-54.5 (-NCH₂CH₂N-), 56.1 (-NCH₂COOt-Bu), 67.0 (-O-CH₂-Ph), 81.0 (-C(CH₃)₃), 127.9-128.5 (-CH-Ph), 136.9 (-CPh), 156.5 (-COO-CH₂Ph), 170.6 (-COOt-Bu).

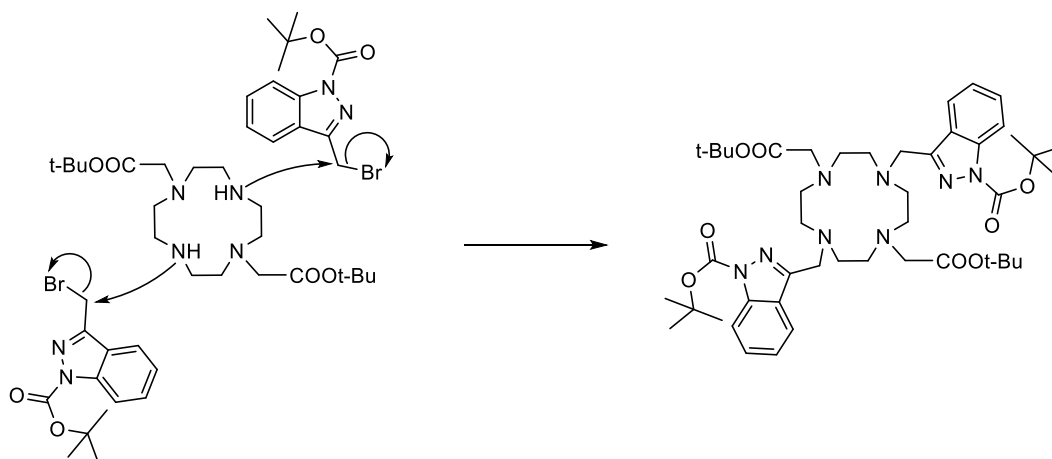
4.3.2 Sintesi di 1,7-Bis(terz-butossicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano



Il prodotto della reazione precedente (0.383 g) è stato utilizzato in una reazione di idrogenazione per la deprotezione dal gruppo protettore Cbz. 50 mg di palladio su carbone al 10% sono stati dispersi in una soluzione di MeOH (5 mL) contenente il prodotto della reazione precedente. La soluzione è stata posta in un pallone a due colli per facilitare il collegamento con due palloncini di H₂. Il pallone è stato collegato alla pompa da vuoto e ai palloncini contenenti idrogeno. Dopo cinque cicli di vuoto/H₂ la miscela viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di H₂ fino al giorno successivo. La reazione è stata controllata il giorno seguente attraverso un'analisi HPLC-MS (metodo B). Il prodotto è stato filtrato su celite, portato a secco e pesato: 0.0874 g.

MS ESI⁺ m/z: 400.3 (C₂₀H₄₀N₄O₄), 401.21 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm): 1.32 (s, 18H, -C(CH₃)₃), 2.60-2.77 (m, 16H, -NCH₂CH₂N), 3.24-3.27 (s, 4H, -NCH₂COOt-Bu). ¹³C (CDCl₃, 500 MHz, 25°C) δ (ppm): 28.1 (-C(CH₃)₃), 46.5 (-NHCH₂-), 51.7 (-NHCH₂CH₂-), 57.0 (-NCH₂COOt-Bu), 81.0 (-OC(CH₃)₃), 17.0 (CH₂COOt-Bu).

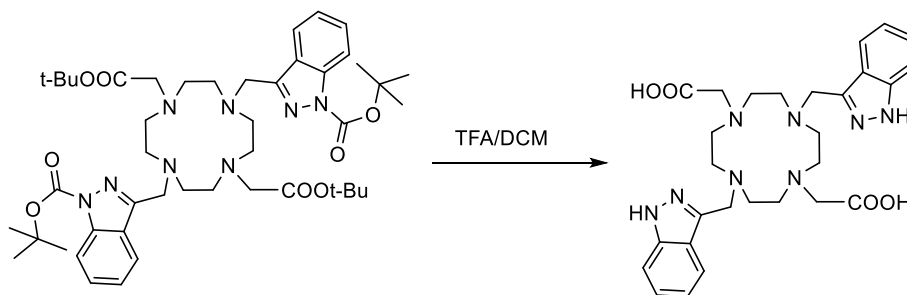
4.3.3 Alchilazione di 1,7-Bis(terz-butossicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano



0.08 g di DO2A (0.2 mmol) sono stati disciolti in 8 mL di acetonitrile e successivamente è stato aggiunto K_2CO_3 (0,190 g, 1,38 mmol). 0.22 g (0.7 mmol) di *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato sono stati sciolti in acetonitrile (4 mL) e gocciolati nel pallone di reazione. La soluzione è stata portata alla temperatura di 50°C e lasciata reagire per 48h controllandola attraverso HPLC-MS (metodo A). Il prodotto di reazione è stato estratto con DCM (3 x 15 mL) e poi lavato con H_2O (3 x 7 mL). Il prodotto ottenuto (0.137 g) è stato purificato attraverso una colonna cromatografica di silice (DCM/MeOH 9:1). Sono stati ottenuti 51.5 mg di prodotto, con una resa del 30%.

MS ESI⁺ m/z: 860.5 ($C_{46}H_{68}N_8O_8$), 861.39 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (MeOD, 500 MHz, 25°C): δ (ppm)= 7.93 (d, 2H, ³J = 8.5, ArH), 7.63 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, ArH), 7.49 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, ArH), 7.29 (t, 2H, ³J = 8.5 Hz, ArH), 4.98 (s, 4H, -N-CH₂-), 3.64 (s, 8H, -N-CH₂-COO-), 3.67 (m, 4H, CH₂-ring), 3.41 (m, 4H, CH₂-ring), 3.21 (m, 8H, CH₂-ring), 1.63 (s, 9H, -N-CH₂-COO-C(CH₃)₃), 1.42 (s, 9H, ring-CH₂-C(CH₃)₃). ¹³C NMR (MeOD, 500 MHz, 25°C): δ (ppm)= 175.3 (ring-COO-C-(CH₃)₃), 150.1 (N-COO-C-(CH₃)₃), 141 (C quaternario), 133 (C quaternario), 126 (ArC), 122.6 (C quaternario), 121.3 (ArC), 118 (ArC), 110 (ArC), 53.1 (N-CH₂-COOH), 50.82 (C-ring), 50.3 (C-ring), 49.97 (N-CH₂-C), 49.5 (C-ring), 28.7 (CH₃).

4.3.4 Deprotezione e formazione del DO2A2Ind



Il prodotto della reazione precedente (51.5 mg) è stato sciolto in 4 mL di DMC/TFA 1:1 e lasciato reagire per 4 ore. Successivamente il pallone di reazione è stato portato a secco e pesato: 52 mg (resa quantitativa).

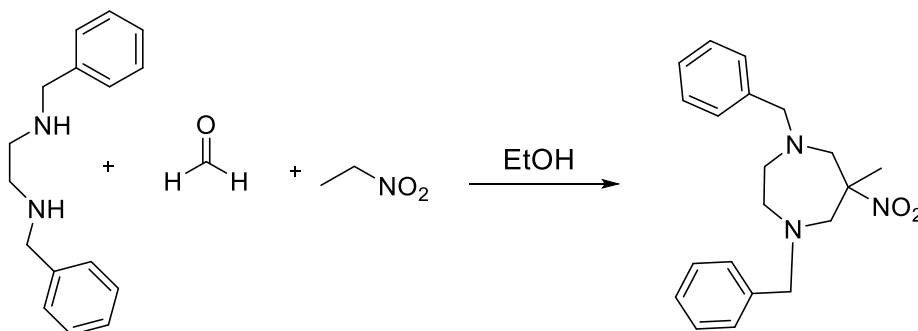
È stata effettuata sia l'analisi in spettroscopia di massa che NMR per valutare la completezza della sintesi.

MS ESI⁺ m/z: 548.3 ($C_{28}H_{36}N_8O_4$), 549.20 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (MeOD, 500 MHz, 25°C): δ (ppm)= 7.93 (d, 2H, ³J = 8.5, ArH), 7.63 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz, ArH), 7.49 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, ArH), 7.29 (t, 2H, ³J = 8.5 Hz, ArH), 4.98 (s, 4H, -N-CH₂-COOH), 3.64 (8H, -N-CH₂-C), 3.67 (m, 4H, CH₂-ring), 3.41 (m, 4H, CH₂-ring), 3.21 (m, 8H, CH₂-ring). ¹³C NMR (MeOD, 500 MHz, 25°C): δ (ppm)=

175.3 (COOH), 141 (C quaternario), 133 (C quaternario), 126 (ArC), 122.6 (C quaternario), 121.3 (ArC), 118 (ArC), 110 (ArC), 53.1 (N-CH₂-COOH), 50.82 (C-ring), 50.3 (C-ring), 49.97 (N-CH₂-N), 49.5 (C-ring).

4.4 Sintesi del legante AAZ2A2Ind

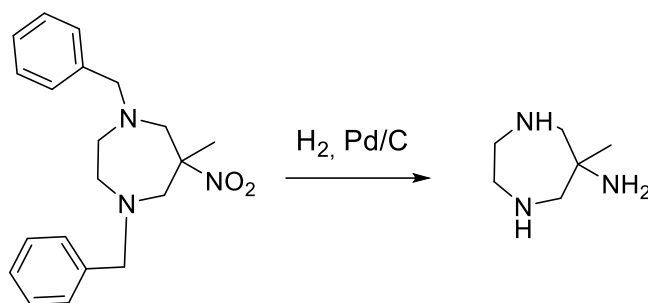
4.4.1 Sintesi del 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitro-1,4-diazepane



Per la sintesi del secondo legante si è partiti da 1 g (2.7 mmol) di N,N-dibenziletildiammina diacetato sciolti in 30 mL di etanolo, al quale è stato prima aggiunto paraformaldeide (0.28 g, 9,3 mmol) e successivamente nitroetano (0.2 mL, 2.8 mmol). Si è lasciata la reazione a riflusso per 3 ore, durante le quali il colore ha virato da trasparente a nero. La reazione è stata portata a secco ed estratta con DCM (26 mL) e lavata con una soluzione 1M di Na₂CO₃ (3 x 15 mL). È stata recuperata e tirata a secco la fase organica, riportando un peso di 0.862 g (2.54 mmol), ed una resa del 90.8%. Il prodotto è stato successivamente purificato con una colonna cromatografica di silice avente come fase eluente DCM (caratterizzazione HPLC-MS tramite metodo A). Il prodotto finale pesava 0.78, con una resa del 82.8%.

MS ESI⁺ m/z: 338.2 (C₂₀H₂₅N₃O₂), 339.4 [M+H]⁺ osservata. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ(ppm): 7.32 (m, 10H, ArH), 3.678 (s, 4H, J=13.2 Hz, Ar-CH₂-N), 3.01 (dd, 4H, J=13.2 Hz, N-CH₂-C ring) 2.48 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-N ring), 1.35 (s, 3H, -CH₃). ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) δ(ppm): 139.0 (s, C quaternario), 128.1 (s, ArCCH), 128.1 (s, ArCHCH), 127.1 (d, ArCH), 82.3 (s, C-NO₂), 63 (s, Ar-CH₂-N-), 59.1 (s, N-CH₂-C-), 58.6 (s, N-CH₂-CH₂-N-), 24.2 (s, -CH₃).

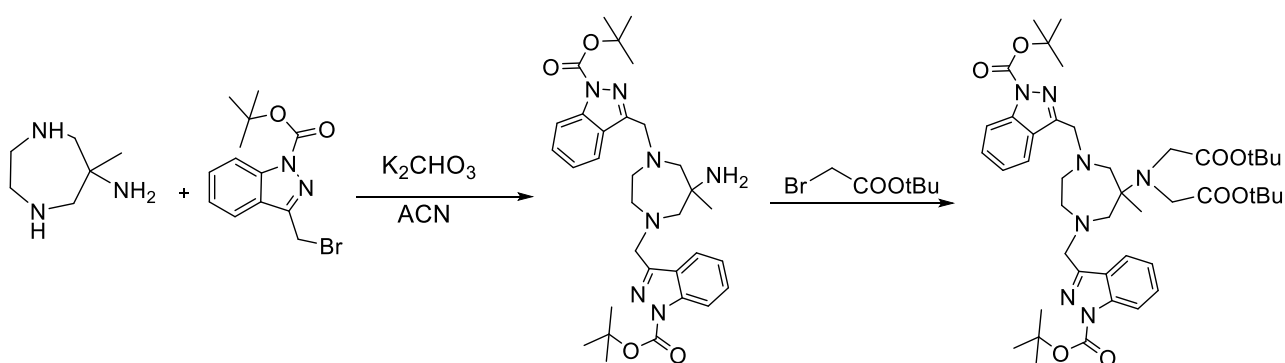
4.4.2 Sintesi del 6-amino-1,4-peridrodiazepina (amped)



Il prodotto della reazione precedente (0,300 g, 88 mmol) è stato sciolto in 2.5 mL di MeOH ed a tale soluzione è stata aggiunta lentamente una sospensione composta da palladio su carbone al 10% (50 mg) in MeOH (2 mL). Alla soluzione di reazione sono state aggiunte due gocce di AcOH. La soluzione è stata posta in un pallone a due colli per facilitare il collegamento con due palloncini di H₂. Il pallone è stato collegato alla pompa da vuoto e ai palloncini contenenti idrogeno. Dopo cinque cicli di vuoto/H₂ la miscela viene lasciata sotto agitazione in atmosfera di H₂ fino al giorno successivo. La reazione è stata controllata il giorno seguente attraverso spettroscopia NMR. Il prodotto è stato filtrato su celite, portato a secco e pesato: 0.097 g. Resa = 85%.

MS ESI⁺ m/z: 129.0 (C₆H₁₅N₃), 130,3 [M+H]⁺ osservata. ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ(ppm): 2.81-2.56 (m, 4H, C-CH₂-NH-), 2.69-2.65 (m, 4H, -NH-CH₂-CH₂-NH, 1.44 (s, 3H, -CH₃). ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) δ(ppm): 172.6 (s), 170.8 (s), 80.6 (s), 80.1 (s), 66.1 (t), 62.3 (t), 60.6 (s), 59.1 (t), 51.5 (t), 28.1 (q), 24.1 (s, CH₃).

4.4.3 Sintesi di AAZ2A(*t*Bu)₂Ind(*t*Bu)₂

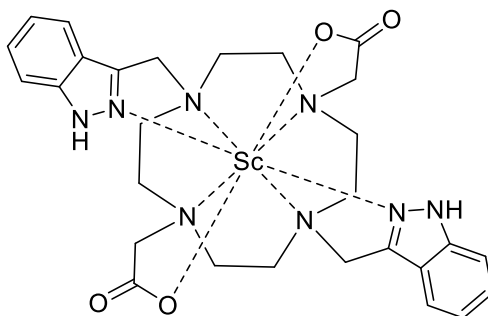


30 mg di amped (0.23 mmol) sono stati sciolti in 4 mL di acetonitrile. Alla soluzione in agitazione sono stati aggiunti 0.115 g di K₂CO₃ (0.83 mmol) e 0.13 g (0.41 mmol, 1.8 eq) di *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato sciolti in 1.2 mL di ACN. Questa reazione è stata eseguita one pot con lo step successivo; è stato perciò aggiunto direttamente il secondo braccio

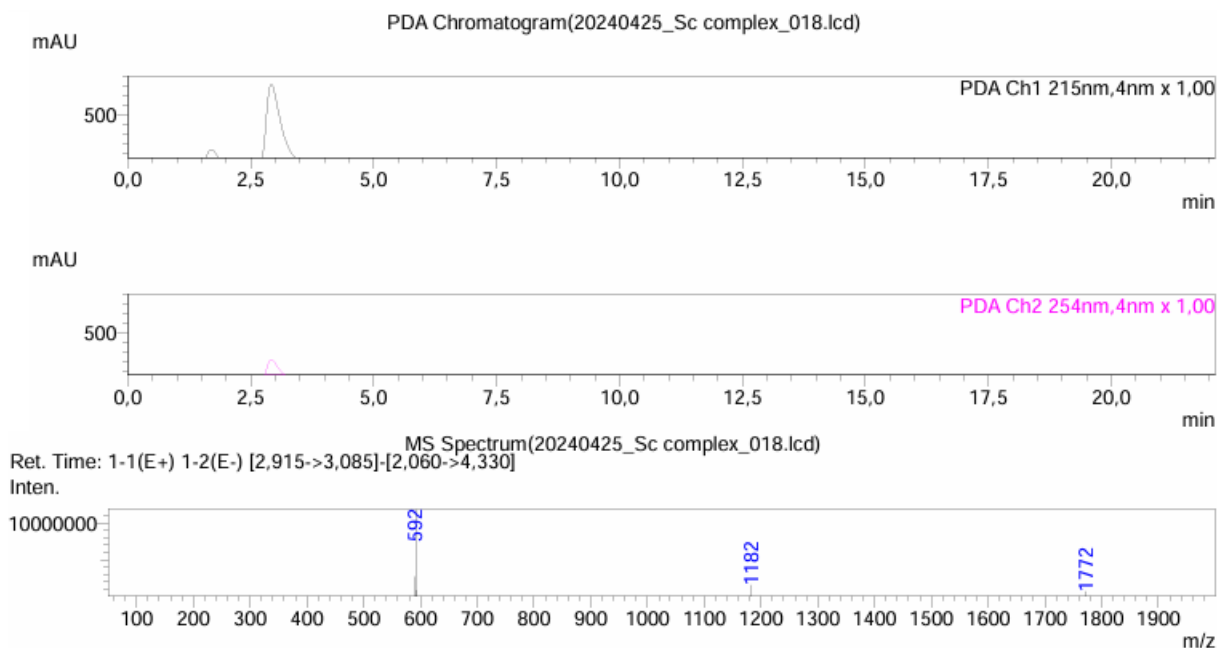
BrCH₂COOtBu (0.0612 mL, 1.8 eq, 41 mmol) in modo da alchilare l'azoto esociclico. Tuttavia la reazione non è stata portata a termine a causa della partenza per Monaco di Baviera; il prodotto necessita ancora di purificazione.

4.5 Preparazione dei complessi di DO2A2Ind

4.5.1 Preparazione di Sc(III)-DO2A2Ind

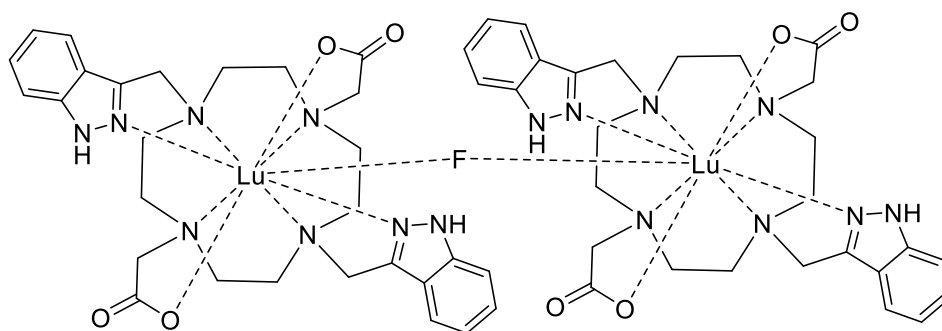


Per la complessazione di DO2A2Ind con lo ione trivalente Sc(III) sono stati prelevati 5 mg (9.1 μ mol) di legante e sciolti in 2 mL di una miscela H₂O/MeOH (1:1). Successivamente la soluzione è stata portata a un pH di circa 6 (aggiungendo NaOH). Mantenendo la soluzione in agitazione, sono stati aggiunti 1.7 mg (6.5 μ mol) di ScCl₃·6H₂O, regolando poi il pH intorno a 5 (aggiungendo NaOH). La miscela è stata lasciata a reagire fino al giorno successivo. Dopo una prima analisi in HPLC-MS è emerso che una grande quantità del legante di partenza era ancora presente in forma libera. Per completare la complessazione, sono stati aggiunti ulteriori 0.8 mg (3.08 μ mol) di ScCl₃·6H₂O. A questo punto, il legante risultava completamente complessato ed è stato liofilizzato per ottenere una polvere, utilizzata successivamente per le analisi di radiomarcatura.



MS ESI⁺ m/z: 591,23 (C₂₃H₃₄N₈O₄Sc), 592.3 [M]⁺ osservata (tempo di ritenzione pari a 2.91 minuti).

4.5.2 Preparazione del complesso Y(III)-di DO2A2Ind



Per la complessazione di DO2A2Ind con lo ione trivalente Y(III) sono stati prelevati 5mg (9.1 μmol) di legante, sciolti in 2 mL di una miscela H₂O/MeOH (1:1) e successivamente la soluzione è stata portata ad un pH di 6 circa (aggiungendo NaOH). Alla soluzione in agitazione sono stati aggiunti 2.7 mg (8.2 μmol) di YCl₃, per poi regolare il pH intorno a 5 (aggiungendo NaOH). La soluzione è stata lasciata reagire fino al giorno successivo. Con una prima analisi spettrometrica si è notato che era ancora presente in grande quantità il legante di partenza, così sono stati aggiunti altri 0.45 mg di YCl₃ (1.5 μmol). Il legante, a questo punto, risultava completamente complessato; è stato liofilizzato in modo da poter ottenere una polvere utilizzata per le analisi di radiomarcatura.

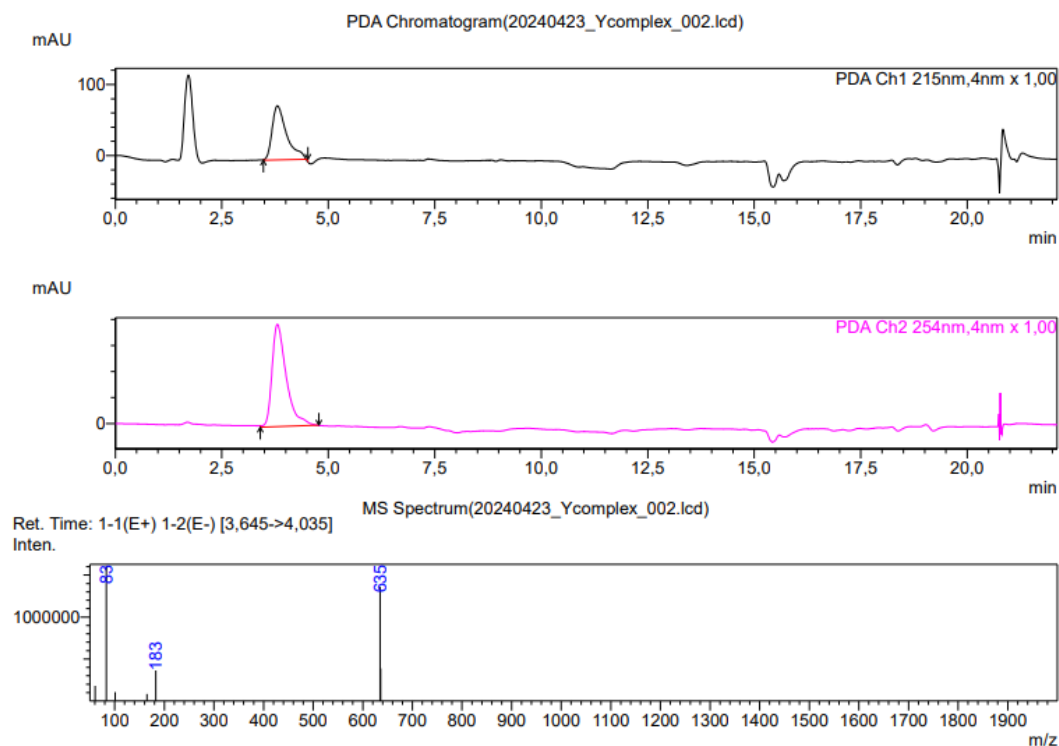
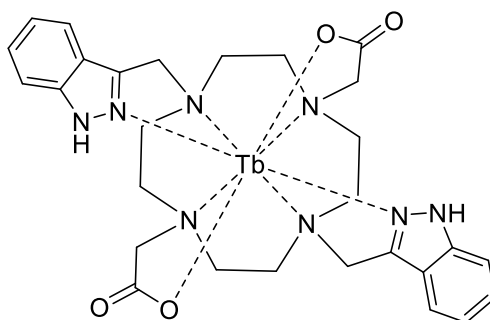


Figura 1: Cromatogrammi HPLC-MS di Y(III)-DO2A2Ind misurati a 215 e 254 nm.

MS ESI⁺ m/z: 635.5 [C₂₈H₃₄N₈O₄Y], 635.9 [M]⁺ osservata (tempo di ritenzione pari a 3.64 minuti).

4.5.3 preparazione del complesso Tb(III)- di DO2A2Ind



Per la complessazione di DO2A2Ind con lo ione trivalente Tb(III) sono stati prelevati 5 mg (9,1 μmol) del legante, disciolti in 2 mL di una miscela H₂O/MeOH (1:1), e il pH della soluzione è stato regolato intorno a 6 (aggiungendo NaOH). Alla miscela sotto agitazione sono stati aggiunti 3.8 mg (8.37 μmol) di TbNO₃·5H₂O, aggiustando successivamente il pH a circa 5 (aggiungendo NaOH). La soluzione è stata lasciata reagire fino al giorno successivo.

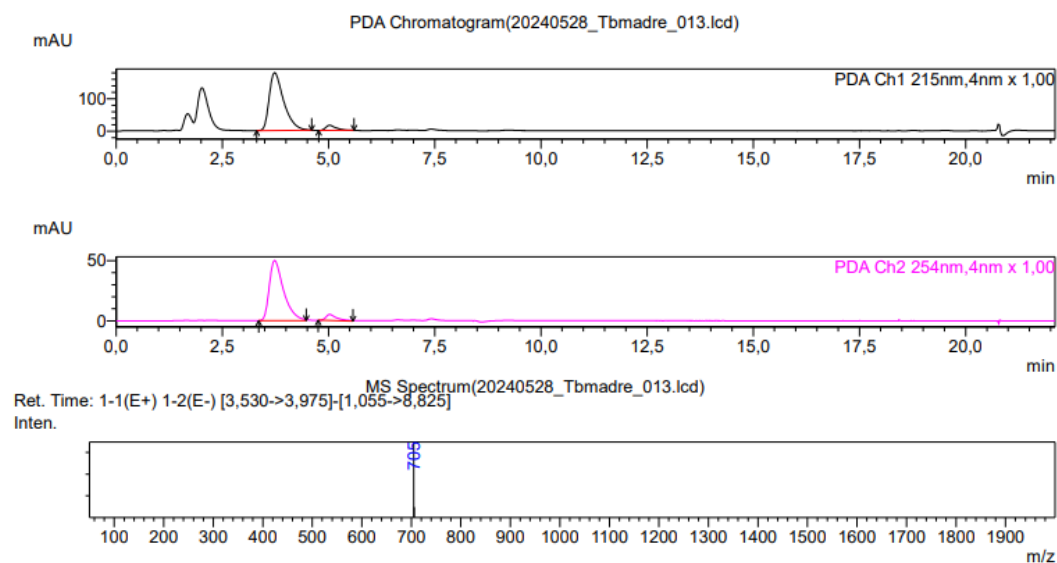
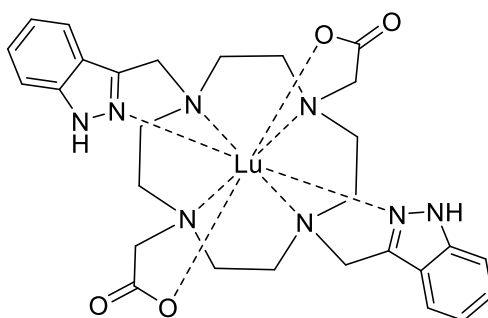


Figura 2: Cromatogrammi HPLC-MS di Tb(III)-DO2A2Ind misurati a 215 e 254 nm.

Dal cromatogramma è possibile osservare la piccola presenza del picco del legante libero con un tempo di ritenzione pari a 5.7 minuti.

MS ESI⁺ m/z: 705.0 [C₂₈H₃₄N₈O₄Tb], 705.6 [M]⁺ osservata (tempo di ritenzione pari a 3.5 minuti).

4.5.4 preparazione del complesso Lu(III)- di DO2A2Ind



Per la complessazione di DO2A2Ind con lo ione trivalente Lu(III) sono stati prelevati 12.5 mg (34.5 μmol) del legante, disciolti in 2 mL di una miscela MeOH/H₂O (1:1), la soluzione è stata portata a un pH di circa 6 (aggiungendo NaOH). La reazione è stata lasciata a reagire fino al giorno successivo.

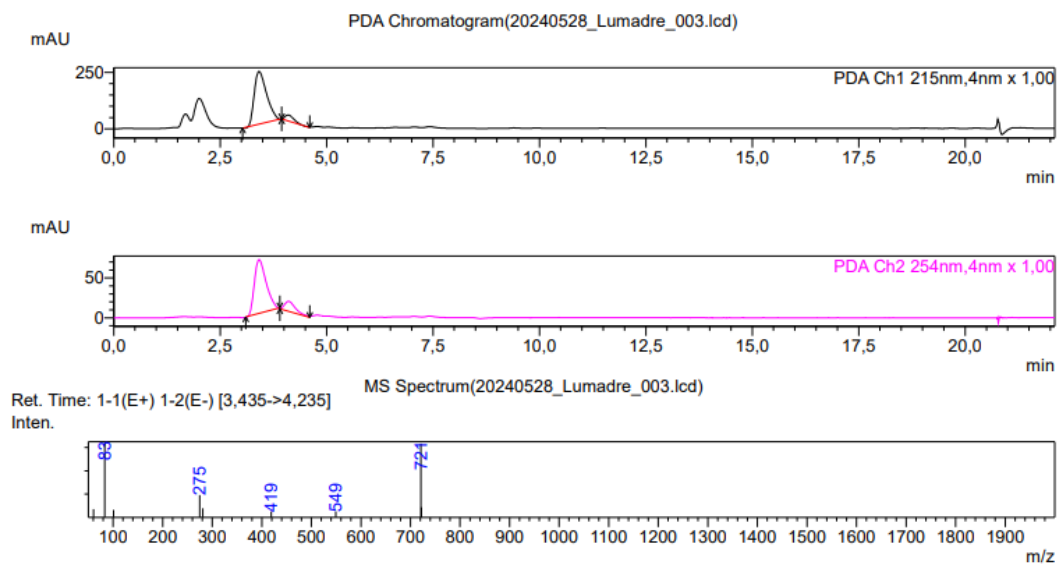


Figura 3: Cromatogrammi HPLC-MS di Lu(III)-DO2A2Ind misurati a 215 e 254 nm.

MS ESI⁺ m/z: 721.2 [C₂₈H₃₄N₈O₄Lu], 721.7 [M]⁺ osservata (tempo di ritenzione pari a 3.4 minuti).

CAPITOLO 5 - PARTE SPERIMENTALE: RADIOSINTESI ED ESPERIMENTI DI STABILITÀ

5.1 Materiali e metodi

La radiomarcatura dei complessi con ^{18}F è stata effettuata manualmente. L'isotopo ^{18}F usato per la radiosintesi è stato ottenuto tramite il ciclotrone situato all'interno dell'ospedale "Klinikum Rechts der Isar" a Monaco di Baviera. I prodotti radiomarcati con ^{18}F durante la sintesi manuale, sono stati purificati con cartuccia Waters Sep-Pak light plus C18, attivata con citrato, attraverso la quale è stata fatta passare la soluzione radiomarcata, con il prodotto recuperato in una eppendorf contrassegnata come "waste". La cartuccia è stata ulteriormente lavata con 2 mL di NaCl e poi con 2 mL di una soluzione di acqua e acetonitrile (60:40) per recuperare il prodotto purificato, separato dall'eccesso di ^{18}F .

Sono stati eseguiti degli esperimenti preliminari utilizzando l'isotopo non radioattivo: ^{19}F . Tali esperimenti hanno valutato le condizioni sperimentali in termini di rapporto stechiometrico, temperatura e pH. I controlli relativi alla formazione dei prodotti di reazione desiderati sono stati effettuati tramite HPLC-MS (Shimatzu LCMS2020, colonna XTerra C18). Di seguito è riportato il Metodo C:

Time [min]	Flow [mL/min]	% H ₂ O [FA 0.1%]	% CH ₃ CN [FA 0.1%]
0.10	1.0	90	10
2.00	1.0	90	10
12.00	1.0	90→45	10→55
17.00	1.0	45→1	55→99
19.10	1.0	1	99
19.20	1.0	1→90	99→10
20.0	1.0	90	10
20.10	off	/	/

L'attività delle soluzioni marcate con ^{18}F è stata quantificata utilizzando un sistema di calibrazione Capintec CRC[®] 15R, (prodotto dalla Capintec, Inc., con sede a Florham Park, New Jersey, USA). Per caratterizzare i complessi radiomarcati, sono state impiegate due tecniche analitiche: la cromatografia su strato sottile (radio-TLC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Per la radio-TLC, è stato utilizzato uno scanner della BIOSCAN, strumento specifico per l'analisi delle tracce

radioattive sui supporti cromatografici. Nella procedura HPLC, è stato impiegato uno strumento Shimadzu, equipaggiato con un rivelatore a serie di fotodiodi (PDA) della stessa marca, che consente una precisa rilevazione delle assorbanze a diverse lunghezze d'onda. La rivelazione della radioattività emessa è stata poi effettuata utilizzando un detector GABI Star γ , un rivelatore di radiazioni gamma di alta sensibilità, che permette di monitorare la radioattività dei campioni analizzati. Per la separazione cromatografica è stata impiegata una colonna cromatografica C18 XTerra. Il metodo HPLC utilizzato (Metodo D) è mostrato nella seguente tabella:

Time [min]	Flow [mL/min]	% H ₂ O [FA 0.1%]	% CH ₃ CN [FA 0.1%]
0.00	1.0	99→95	1→5
4.00	1.0	95	5
10.00	1.0	95→50	5→50
11.00	1.0	50→5	50→95
14.00	1.0	5	95
14.100	1.0	5→95	95→5
15.4	1.0	95	5
15.5	off	/	/

5.2 Analisi preliminare della soluzione ¹⁸F

Preliminarmente è stata eseguita un'analisi HPLC con rivelatore γ e UV della soluzione di ¹⁸F da sola, in modo da poter determinare il suo tempo di ritenzione nel cromatogramma. Il ¹⁸F è stato prodotto attraverso un ciclotrone e recuperato all'interno di una cartuccia cromatografica. All'interno della cartuccia viene fatta passare una soluzione salina (NaCl 0.1M) in modo da eluire il Fluoro radioattivo e raccoglierlo all'interno di un'ependorf. A questo punto si misura l'attività iniziale, tramite un sistema Capintec CRC® 15R, per poi eseguire dei calcoli in modo da quantificare quanta soluzione prelevare per avere una determinata attività da aggiungere alla soluzione del complesso. Al fine di eseguire tale analisi è stato utilizzato un sistema HPLC (Shimadzu) con rivelatore a serie di fotodiodi (Shimadzu) e un detector GABI Star γ (RayTest, Straubenhardt, Germany) per la rilevazione dell'attività emessa (metodo D), utilizzando una colonna C18 XTerra.

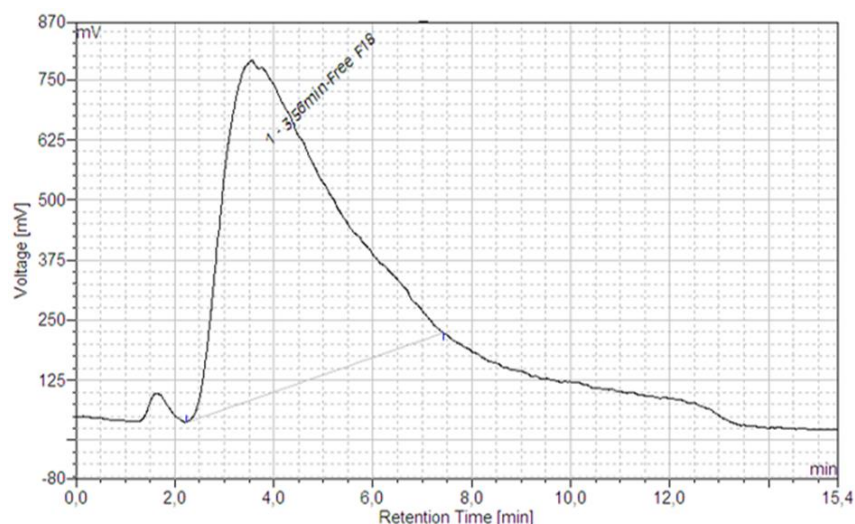


Figura 5.1: cromatogramma della soluzione di ^{18}F libero

Come è visibile dal cromatogramma (Figura 5.1), il tempo di ritenzione del Fluoro libero risulta 3.58 minuti. È possibile vedere anche un piccolo picco iniziale (prima dei 2 min), probabilmente a causa di un lavaggio della colonna non ottimale. Tale picco in seguito verrà caratterizzato come interazione ^{18}F – Metallo libero (specialmente per Tb(III) e Lu(III)). Sono state eseguite delle prove con YCl_3 , TbCl_3 , LuCl_3 , marcati con ^{18}F ; in modo da poter determinare con certezza che il picco iniziale, con un tempo di ritenzione compreso tra 1 e 2 minuti, rappresentasse l'interazione ^{18}F -Metallo libero.

5.3 Sintesi del complesso ternario $[\text{Sc(III) DO2A2Ind}]_2\text{-}^{19}\text{F}$

Il primo esperimento ha previsto la marcatura dei complessi con il ^{19}F , valutando i rapporti stechiometrici di reazione, la temperatura ideale e il pH ottimale. Questa procedura è stata eseguita per i complessi di Sc(III), Y(III), Lu(III) e Tb(III).

Ratio Sc:19F	mol 19F [mol]	Volume da prelevare di KF [μL]	Volume totale prove [μL]
1:0,6	1,920E-08	19,20	419,20
1:1	3,200E-08	32,00	432,00
1:1,6	5,120E-08	51,20	451,20
1:2	6,400E-08	64,00	464,00
1:2,5	8,000E-08	80,00	480,00
1:3	9,600E-08	96,00	496,00
1:4	1,280E-07	128,00	528,00

Sono stati prelevati 1 mg (1,6 μmol) di complesso di Sc(III)DO2A2Ind (MM: 593.24 g/mol) e disciolti in 1 mL di acqua deionizzata, ottenendo la soluzione madre del complesso di Sc(III),

utilizzata in tutte le analisi (1.68 mM). Per gli esperimenti a freddo, la soluzione madre è stata diluita prelevandone 18.9 μL e aggiungendo 381 μL di acqua, ottenendo 7 soluzioni alla concentrazione di 8 μM . Successivamente, è stata preparata una soluzione di KF (MW: 58,1 g/mol) sciogliendo 1 mg di quest'ultimo (17 μmol) in 19 mL di acqua. Questa soluzione è stata aggiunta in quantità diverse alle soluzioni di test del complesso di Sc(III) in funzione del rapporto stechiometrico di reazione desiderato.

Attraverso analisi HPLC-MS (metodo C) si è notata l'assenza dell'addotto fluorurato, seppur aggiungendo quantità sempre maggiori di ^{19}F . La soluzione di reazione contenente un rapporto complesso - fluoro 1:4 è stata studiata anche modificando temperatura e pH. Le analisi a diversa temperatura sono state condotte a 37°C e 60°C, lasciando reagire le soluzioni per un'ora. Per quanto riguarda le analisi a diverso pH, sono stati testati i valori di pH 4, 4.5 e 5, a 37°C e 60°C. Sfortunatamente, in nessuna delle condizioni investigate è stata osservata la formazione dell'addotto ternario fra il complesso di Sc(III) e il ^{19}F .

Dal momento in cui non si osserva la fluorurazione del complesso di Sc^{3+} , su di esso non sono stati effettuati i relativi esperimenti di radiomarcatura.

5.4 Sintesi del complesso ternario [(Y(III) DO2A2Ind)₂- ^{19}F]

Sono stati prelevati 1 mg (1.5 μmol) di complesso di Y(III) DO2A2Ind (MW: 637.19 g/mol) e disciolti in 1 mL di acqua deionizzata. Questa soluzione prenderà il nome di “soluzione madre” e verrà utilizzata durante il corso di tutte le analisi (1.56 mM). Per gli esperimenti con ^{19}F si è diluita la soluzione madre, prelevandone 20 μL e diluendo con 380 μL di acqua; in modo da avere circa 7 soluzioni “test” (8 μM). A questo punto, è stata preparata una soluzione di KF (MW: 58.1 g/mol) prelevandone 1 mg (17 μmol) e sciogliendolo in 19 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata aggiunta in diverse aliquote alle soluzioni test del complesso di Y(III) in modo da ottenere diversi rapporti stechiometrici ^{19}F – complesso.

Ratio Y: ^{19}F	mol ^{19}F [mol]	Volume da prelevare di KF [μL]	Volume totale prove [μL]
1:0,6	1,920E-08	21,33	421,33
1:1	3,200E-08	35,56	435,56
1:1,6	5,120E-08	56,89	456,89
1:2	6,400E-08	71,11	471,11
1:2,5	8,000E-08	88,89	488,89
1:3	9,600E-08	106,67	506,67
1:4	1,280E-07	142,22	542,22

Dopo le relative analisi, si è osservato che l'aggiunta di ^{19}F al complesso porta a una progressiva formazione del dimero, come determinato tramite HPLC-MS (metodo C). Il rapporto stechiometrico $\text{Y(III)}:^{19}\text{F}$ di 1:4 ha mostrato i risultati migliori (86% di incorporazione), con una quasi totale presenza del dimero rispetto al complesso iniziale non fluorurato.

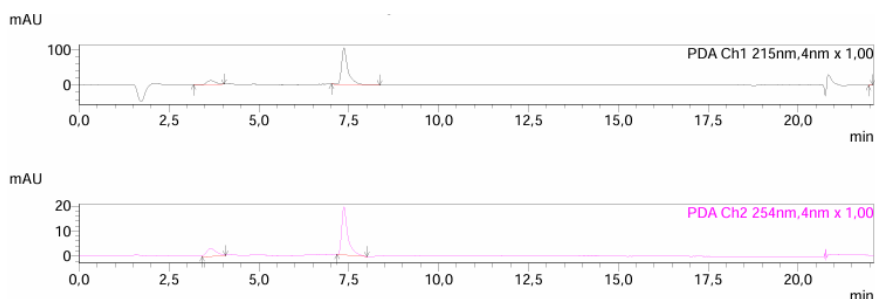
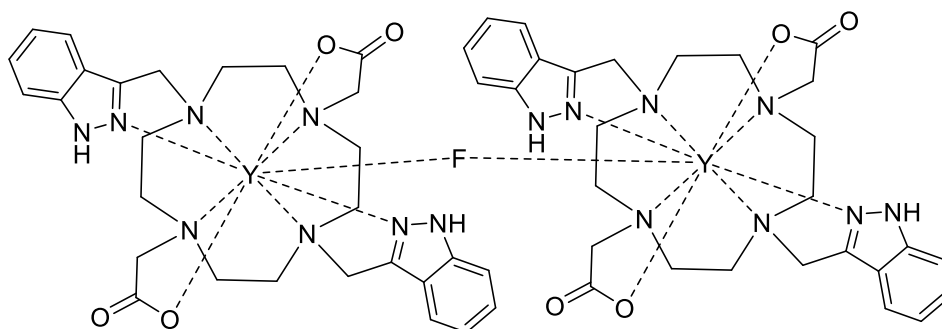


Figura 5.2: cromatogramma $\text{Y(III)}-^{19}\text{F}$ di 1:4. Il primo picco ha un tempo di ritenzione pari a 3.6 minuti ed è relativo al complesso non fluorurato; mentre il secondo picco rappresenta il dimero con un tempo di ritenzione di 7.3 minuti.

Questa soluzione è stata quindi scelta per i successivi studi al variare di temperatura e pH.



Le analisi a differenti temperature sono state condotte a 37°C e 60°C lasciando la soluzione 1:4 del complesso $\text{Y(III)}-^{19}\text{F}$ per un'ora in quelle condizioni. Per quanto riguarda le analisi del pH, sono stati testati i valori di pH 4, 4,5 e 5, a 37°C e 60°C .

5.4.1 Marcatura con ^{18}F del complesso $\text{Y(III)} \text{ DO2A2Ind}$

Per gli esperimenti che seguono si è preferito utilizzare la soluzione madre più concentrata (1.56 mM) di complesso. La marcatura è stata effettuata considerando un volume totale di 500 μl ; prelevando perciò una quantità pari a 30 μl di soluzione madre di complesso $\text{Y(III)} \text{ DO2A2Ind}$ (47 nmol), per ottenere una concentrazione di 94 μM dopo diluizione. Nella soluzione, per raggiungere il volume totale si è aggiunta una quantità di tampone acetato a pH 5 (una soluzione di EtOH con NaOAc) e la

quantità desiderata di ^{18}F in modo da raggiungere l'attività prescelta per l'analisi. Si è scelto di procedere variando l'attività: partendo da 78 MBq fino ad un massimo di 320 MBq. Il ^{18}F veniva recuperato dal ciclotrone all'interno di una cartuccia cromatografica, nella quale venivano fatti eluire 500 μl di NaCl in modo da recuperare il ^{18}F in soluzione.

Le soluzioni sono state analizzate attraverso un controllo HPLC con rilevazione dell'attività emessa attraverso il metodo riportato nel paragrafo 5.1.

5.4.2 Test di stabilità nel tempo Y(III) DO2A2Ind

Tenendo conto dei risultati degli esperimenti del paragrafo 5.4.1, sono stati effettuati degli studi sulla stabilità del complesso di Y(III) – ^{18}F in relazione al tempo.

Venivano preparate delle soluzioni, come riportato nel paragrafo precedente, a quantità e attività nota del complesso radiomarcato con ^{18}F . Si è scelto di procedere variando l'attività partendo da 78 MBq ad un massimo di 320 MBq. A questo punto venivano eseguite cinque analisi HPLC di seguito l'una all'altra, aumentando il volume di iniezione di 2 μL in modo da mantenere la stessa attività durante tutto il corso dell'analisi. Contemporaneamente veniva utilizzato un contatore gamma al fine di confermare che l'attività iniettata fosse effettivamente la stessa per tutte le analisi. È noto, infatti, che il ^{18}F ha un tempo di emivita di 109.8 minuti. Il metodo HPLC utilizzato (metodo D) aveva una durata di 15.5 minuti, e ciascuna analisi è stata intervallata da un lavaggio dello strumento di 4,5 minuti. L'intervallo di tempo trascorso tra due analisi successive era quindi di 20 minuti. Per fare in modo di mantenere la stessa attività in ogni iniezione di campione è stato necessario calcolare di quanto decadeva il ^{18}F in 20 minuti, possiamo utilizzare la legge del decadimento radioattivo:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

Dove:

- $N(t)$ è il numero di nuclei di ^{18}F rimanenti dopo un tempo t .
- N_0 è il numero iniziale di nuclei di ^{18}F .
- λ è la costante di decadimento, calcolata come $\lambda = \frac{\ln(2)}{T_{1/2}}$, dove $T_{1/2}$ è l'emivita
- t è il tempo.

Prima calcoliamo λ :

$$\lambda = \frac{\ln(2)}{109.8} \approx 0,0063 \text{ minuti}^{-1}$$

Ora possiamo calcolare la frazione della sostanza rimanente dopo 20 minuti:

$$N(20) = N_0 \cdot e^{-0,0063 \times 20}$$

$$N(20) \approx N_0 \cdot e^{-0,126} \approx N_0 \cdot 0,881$$

Quindi, dopo 20 minuti, rimane circa l'88,1% dell'attività iniziale del fluoro-18. Di conseguenza, la sostanza è decaduta di circa il 12% in 20 minuti. Il volume iniettato nella prima analisi era di 15 μL ; il 12% di 15 μL risulta 1.8, tenendo conto dell'errore sperimentale abbiamo preferito aumentare di 2 μL il volume di iniezione a ciascun ciclo di analisi.

Alcune di queste analisi sono state eseguite in assenza di purificazione (ovvero il prodotto di reazione veniva iniettato senza azioni di lavaggio per togliere l'eccesso di ^{18}F). Specialmente nel caso del complesso di Y(III) si è notato che l'azione di purificazione non risultava strettamente necessaria, in quanto la % di incorporazione di ^{18}F (nel complesso) era prossima al 100%. Inoltre, sono state eseguite analisi purificando il prodotto di sintesi su SepPak C18 ed analizzate nel tempo, come precedentemente spiegato nel paragrafo 5.1.

5.5 Sintesi del complesso [(Tb(III) DO2A2Ind)₂- ^{19}F]

È stato prelevato 1 mg (1,4 μmol) di complesso di Tb(III) DO2A2Ind (MWM 707.21 g/mol) e sciolto in 1 mL di acqua deionizzata, creando una soluzione madre utilizzata per tutte le analisi (1.41 mM). Per gli esperimenti a freddo, la soluzione madre è stata diluita prelevando 22.6 μL e aggiungendo 377.3 μL di acqua, ottenendo 7 soluzioni "test" di 400 μL ciascuna (8 μM). Successivamente, è stata preparata una soluzione di KF (MW 58,1 g/mol) sciogliendo 1 mg (17 μmol) in 19 mL di acqua, e questa soluzione è stata aggiunta in varie quantità alle soluzioni test del complesso di Tb(III) per ottenere diversi rapporti stechiometrici.

Ratio Tb: ^{19}F	mol ^{19}F [mol]	Volume da prelevare di KF [μL]	Volume totale prove [μL]
1:0,6	1,920E-08	21,33	421,33
1:1	3,200E-08	35,56	435,56
1:1,6	5,120E-08	56,89	456,89
1:2	6,400E-08	71,11	471,11
1:2,5	8,000E-08	88,89	488,89
1:3	9,600E-08	106,67	506,67
1:4	1,280E-07	142,22	542,22

Le analisi hanno dimostrato che l'aumento della quantità di ^{19}F porta a una maggiore formazione del dimero, come osservato tramite HPLC-MS (metodo C). Il rapporto stechiometrico Tb(III) DO2A2Ind- ^{19}F di 1:4 ha dato risultati eccellenti, con una prevalenza quasi totale del dimero rispetto al complesso originario senza fluoro (68% di incorporazione).

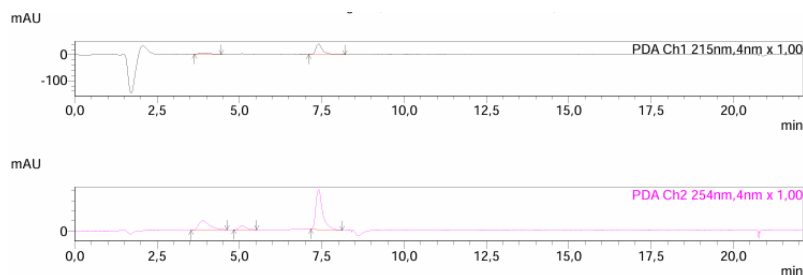
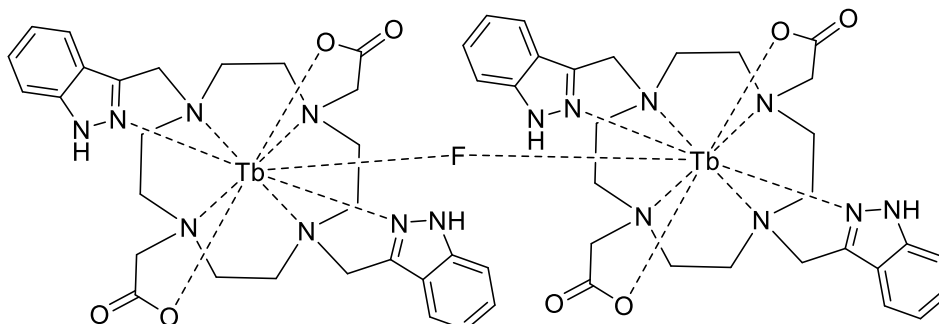


Figura 5.3: cromatogramma Tb(III)- ^{19}F di 1:4. Il primo picco ha un tempo di ritenzione pari a 3.6 minuti ed è relativo al complesso non fluorurato; si intravede un secondo picco ad un tempo di ritenzione pari a 5.0 minuti corrispondente al legante libero, ed infine il terzo picco rappresenta il dimero con un tempo di ritenzione di 7.4 minuti.

Questa soluzione è stata selezionata per ulteriori analisi di temperatura e pH.



Le analisi al variare della temperatura sono state condotte a 37°C e 60°C , lasciando la soluzione 1:4 del complesso ternario $[(\text{Tb}(\text{III})\text{L})_2\text{-}^{19}\text{F}]$ in queste condizioni per un'ora. Per le analisi a diversi pH, sono stati considerati ottimali i valori di pH 4, 4,5 e 5, ciascuno testato alle temperature indicate. I risultati saranno discussi nei capitoli successivi.

5.5.1 Marcatura con ^{18}F del complesso Tb(III) DO2A2Ind

A seguito dei risultati ottenuti con le soluzioni marcate con ^{19}F , si è optato per l'utilizzo di soluzioni madri più concentrate (1,41 mM). Il processo di marcatura è stato condotto su volumi complessivi di 500 μL , prelevando 33 μL (47 nmol) di soluzione di complesso di Tb(III) per ogni analisi. Questa è

stata combinata con un tampone a pH 5 (una soluzione di AcOH con NaOAc) ed infine è stata aggiunta la quantità necessaria di ^{18}F per raggiungere l'attività target. La concentrazione della soluzione corrispondeva a 93 μM . Il ^{18}F è stato recuperato dal ciclotrone tramite una cartuccia cromatografica e successivamente eluito con 500 μL di NaCl per essere utilizzato in forma liquida.

Le soluzioni marcate sono state analizzate mediante HPLC (metodo D) per misurare l'attività emessa. Un gamma counter è stato inoltre impiegato per monitorare il decadimento del ^{18}F nel tempo, considerata la sua breve emivita di 109,8 minuti. Gli esperimenti hanno generato risultati diversi in funzione dei rapporti di reagenti utilizzati.

5.5.2 Test di Stabilità nel tempo del Complesso Tb(III) DO2A2Ind

Basandosi sui risultati del Paragrafo 5.5.1, sono stati condotti studi sulla stabilità nel tempo del complesso Tb(III). Sono state preparate soluzioni con quantità e attività note del complesso radiomarcato, come riportato nel sottoparagrafo precedente, ed eseguite cinque analisi HPLC consecutive della stessa soluzione, aumentando il volume di iniezione di 2 μL per mantenere l'attività costante durante le analisi. Un gamma counter è stato utilizzato per monitorare la costanza dell'attività iniettata nel tempo.

Alcune analisi sono state eseguite sia senza purificazione, iniettando il prodotto grezzo della reazione direttamente, che purificando il campione tramite cartuccia SepPak C18 e monitorando in entrambi i casi il comportamento nel tempo.

5.6 Sintesi del complesso ternario [(Lu(III) DO2A2Ind) $_2$ - ^{19}F]

È stato prelevato 1 mg (1,38 μmol) di complesso di Lu(III) DO2A2Ind (MW 723.23 g/mol) e sciolto in 1 mL di acqua deionizzata, generando una soluzione madre che è stata impiegata per tutte le analisi successive (1.38 mM). Tuttavia, per gli esperimenti a freddo, la soluzione madre è stata diluita prelevando 23.1 μL e aggiungendo 376.8 μL di acqua, ottenendo così 7 soluzioni "test" di 400 μL ciascuna (8 μM). Successivamente, è stata preparata una soluzione di KF (MW 58,1 g/mol) sciogliendo 1 mg (17 μmol) in 19 mL di acqua. Questa soluzione è stata poi aggiunta in varie quantità alle soluzioni test del complesso di Lu(III) per ottenere diversi rapporti stechiometrici.

Ratio Lu: ¹⁹ F	mol ¹⁹ F [mol]	Volume da prelevare di KF [μL]	Volume totale prove [μL]
1:0,6	1,920E-08	19,20	419,20
1:1	3,200E-08	32,00	432,00
1:1,6	5,120E-08	51,20	451,20
1:2	6,400E-08	64,00	464,00
1:2,5	8,000E-08	80,00	480,00
1:3	9,600E-08	96,00	496,00
1:4	1,280E-07	128,00	528,00

Le analisi condotte hanno mostrato che, aumentando la quantità di ¹⁹F, si incrementava la formazione del dimero, come rilevato tramite HPLC-MS (metodo C). Il rapporto stechiometrico Lu(III)-¹⁹F di 1:4 non ha riportato dei risultati soddisfacenti (19% di incorporazione) come invece era stato osservato negli altri casi; quindi la formazione dell'addotto ternario del complesso di Lu(III) con il ¹⁹F è risultata molto più complicata.

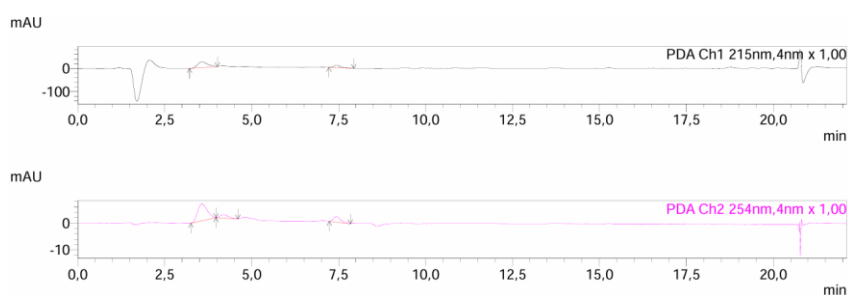
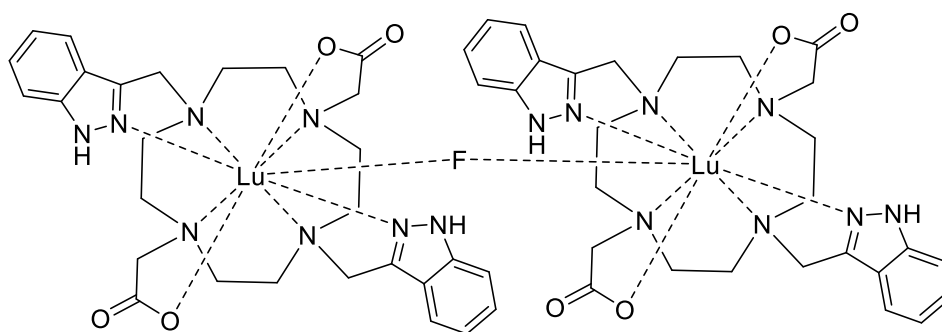


Figura 5.4: cromatogramma Lu(III)-¹⁹F di 1:4. Il primo picco ha un tempo di ritenzione pari a 3.5 minuti ed è relativo al complesso non fluorurato; si intravede un secondo picco ad un tempo di ritenzione pari a 4.1 minuti corrispondente al legante libero, ed infine il terzo picco rappresenta il dimero con un tempo di ritenzione di 7.0 minuti.

Quindi, seppure il dimero era presente, rimaneva in equilibrio con una grande quantità il legante libero. Tale soluzione 4:1 ¹⁹F-complesso di Lu(III) è stata comunque utilizzata per ulteriori analisi al variare della temperatura (37 e 60 °C) e del pH (4, 4.5 e 5 a tutte le temperature). I risultati saranno illustrati nei capitoli successivi.



5.6.1 Marcatura con ^{18}F del complesso Lu(III) DO2A2Ind

Dopo aver ottenuto risultati non particolarmente soddisfacenti con il ^{19}F , si è deciso di impiegare soluzioni madri più concentrate (1,38 mM) per migliorare la marcatura. La marcatura è stata eseguita su volumi totali di 500 μL , prelevando una quantità di 34 μL (46 nmol) di soluzione di complesso di Lu(III) ad ogni analisi. A queste, è stata aggiunta una quantità di tampone a pH 5, una soluzione di AcOH con NaOAc, ed infine è stato aggiunto il ^{18}F per raggiungere l'attività desiderata per l'analisi. La concentrazione della soluzione risultava di 94 μM . Il ^{18}F è stato recuperato dal ciclotrone tramite una cartuccia cromatografica, utilizzando 500 μL di NaCl per ottenerlo in soluzione.

Le soluzioni sono state sottoposte ad analisi HPLC (metodo D) per rilevare l'attività emessa, utilizzando il metodo di separazione cromatografica paragrafo 5.1. Un gamma counter è stato impiegato per monitorare il decadimento del ^{18}F nel tempo. Questi esperimenti hanno prodotto risultati variabili a seconda dei diversi rapporti di reagenti utilizzati.

5.6.2 Test di Stabilità nel Tempo del Complesso Lu(III) DO2A2Ind

Sulla base dei risultati ottenuti nel Paragrafo 5.6.1, sono stati condotti studi sulla stabilità del complesso Lu(III) nel tempo. Sono state preparate soluzioni a concentrazione e attività note del complesso radiomarcato, come descritto nel sottoparagrafo precedente, e sono state eseguite analisi HPLC consecutive, aumentando il volume di iniezione per mantenere costante l'attività durante tutto il corso delle analisi. Un gamma counter è stato utilizzato per verificare che l'attività iniettata rimanesse costante nel tempo.

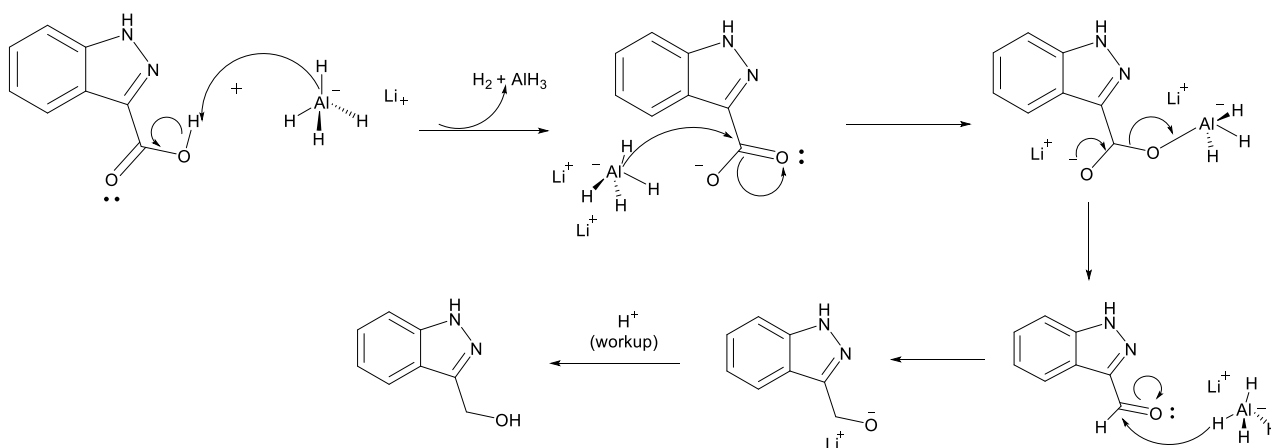
Al contrario delle analisi eseguite con gli altri complessi, il Lu(III) ha dimostrato problemi di marcatura, risultando alquanto instabile. Sono state comunque eseguite come precedentemente gli esperimenti nel tempo sia purificando il campione che no.

Capitolo 6- RISULTATI E DISCUSSIONE SUI PROCESSI DI SINTESI

6.1 . Sintesi di *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato

6.1.1 Sintesi del 3-idrossimetilindazolo

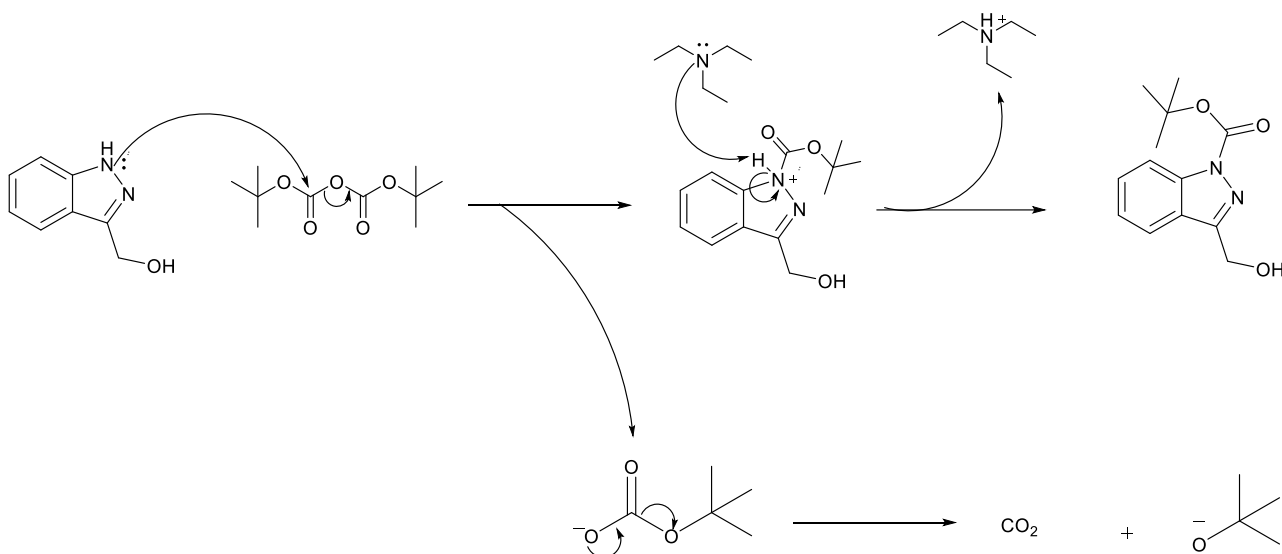
La riduzione dell'acido indazolico ha previsto una prima sostituzione nucleofila acilica e una successiva addizione nucleofila, generando in un primo momento l'aldeide e successivamente l'alcol primario desiderato. Il LiAlH_4 è una fonte di idruro (H^-) che agisce come un nucleofilo molto forte, attaccando il carbonio elettrofilo del gruppo carbossilico (R-COOH), formando un intermedio alcossido. Il secondo passaggio è l'uscita dello ione idrossido (OH^-) per dare un intermedio aldeidico (R-CHO). In realtà, l'aldeide si forma transitoriamente perché reagisce immediatamente con un altro idruro. Infatti, l'intermedio aldeidico viene ridotto ulteriormente da un secondo attacco nucleofilo dell'idruro (H^-) al carbonio elettrofilo del gruppo carbonilico (C=O), formando un alcolato ($\text{R-CH}_2\text{O}^-$). Quest'ultimo, infine, viene protonato durante la fase di work up acido, portando alla formazione dell'alcol primario finale.



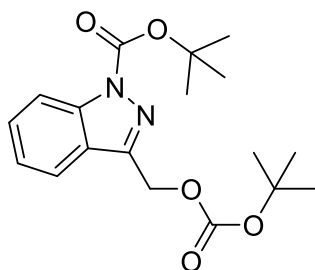
6.1.2 Sintesi di *tert*-butil 3-(idrossimetil)-1H-indazolo-1-carbossilato

La seguente reazione prevede l'attacco dell'ammina su un sito carbonilico del di-*tert*-butil dicarbonato (Boc_2O), risultando nel distacco del gruppo uscente carbonato di *tert*-butile. Successivamente tale intermedio viene attaccato in maniera nucleofila dal doppietto elettronico situato sull'ammina da proteggere, formando un intermedio tetraedrico. Dopo l'attacco nucleofilo, una base attaccherà

l'ammina protonata generando il derivato dell'ammina protetto con il BOC. Contemporaneamente si forma come sottoprodotto la CO₂.

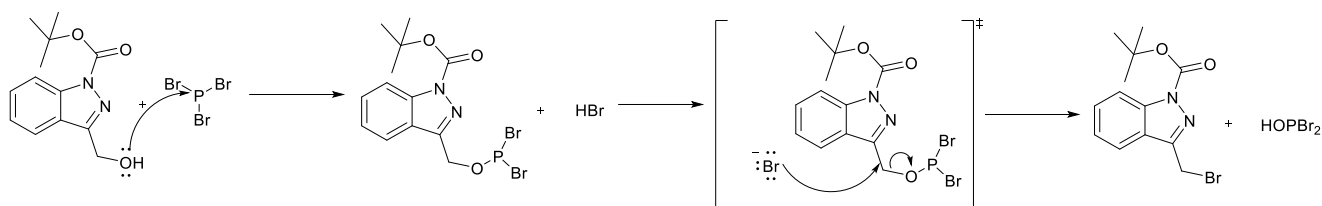


Tuttavia, la reazione ha spesso portato alla formazione del sottoprodotto diprotetto. Il gruppo protettore BOC₂O riusciva a proteggere non solo l'ammina ma anche l'alcol primario, bloccando la possibilità di procedere con lo step successivo.



6.1.3 Sintesi del *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato

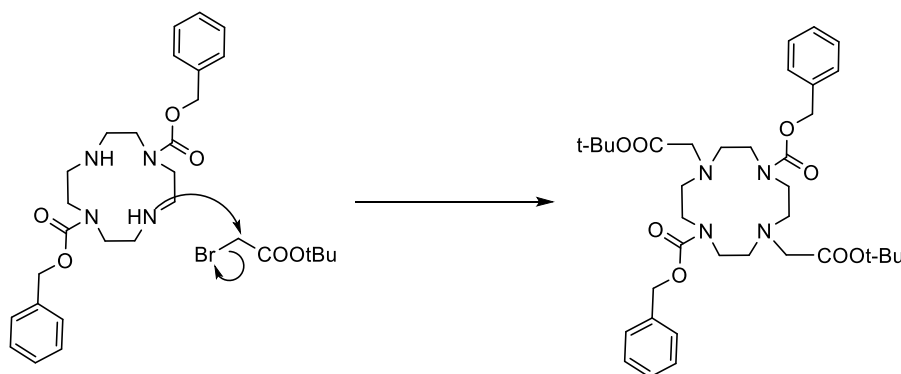
La reazione degli alcoli con tribromuro di fosforo porta alla formazione dell'alogenuro alchilico. Avviene con gli alcoli primari e secondari tramite meccanismo S_N2. Pertanto, non avviene la formazione di un carbocatione che potrebbe dar luogo a riarrangiamenti.



6.2 Sintesi del legante DO2A2Ind

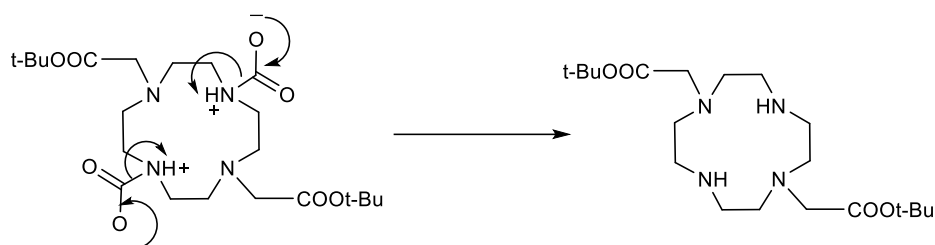
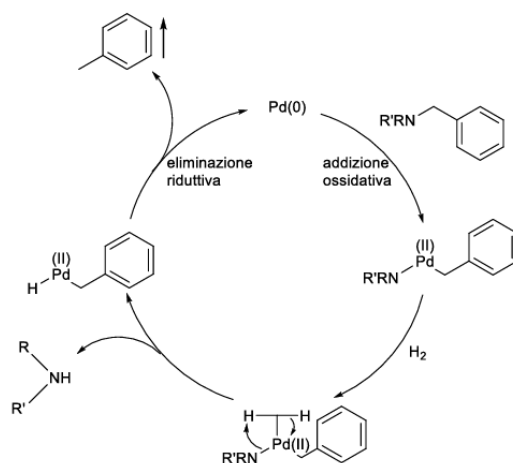
6.2.1 Alchilazione del 1,7-bis-benzilossicarbammato-cyclen.2HCl (Cbz₂Cyclen)

La reazione prevede una sostituzione nucleofila S_N2, delle ammine secondarie libere del cyclen Cbz diprotetto (Cbz = carbobenzilossi). La reazione forma anche HBr, il quale andrebbe a protonare le ammine non reagite inibendo la loro capacità nucleofila. Per evitare questo, alla soluzione di reazione viene aggiunta la base CO₃²⁻ che neutralizza HBr non appena si forma. La reazione avviene due volte, in modo da alchilare le ammine secondarie dell'anello.



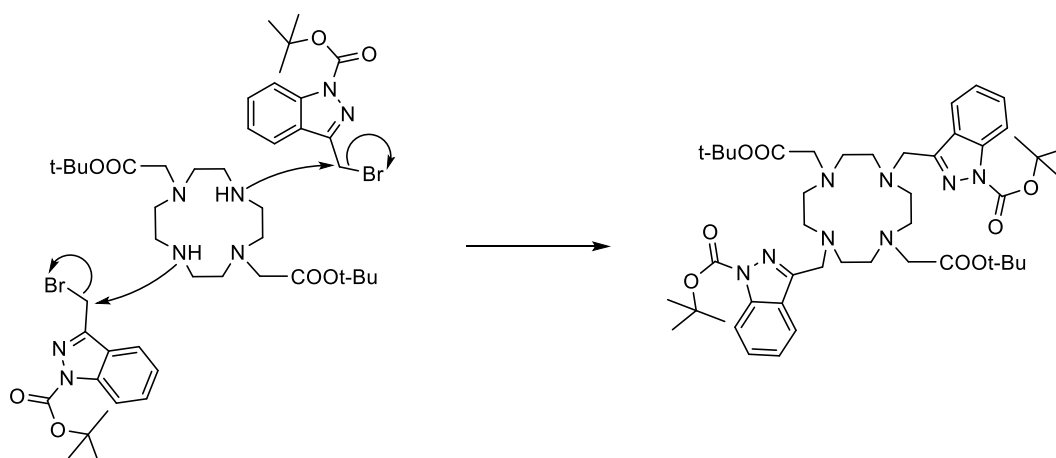
6.2.2 Sintesi di 1,7-Bis(*terz*-butossicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano

La reazione consiste in un'idrogenazione eseguita su Pd/C. L'idrogenolisi avviene tramite un meccanismo organometallico catalizzato dal palladio, che genera toluene e CO₂ come sottoprodotti. Pertanto, essendo il toluene volatile, non è necessario effettuare ulteriori purificazioni del prodotto finale una volta conclusa la reazione. Per rimuovere il Pd/C, è stato impiegato un filtro di vetro sinterizzato, con un filtro di carta sovrapposto a uno strato di Celite, che serve a trattenere solo il catalizzatore solido.



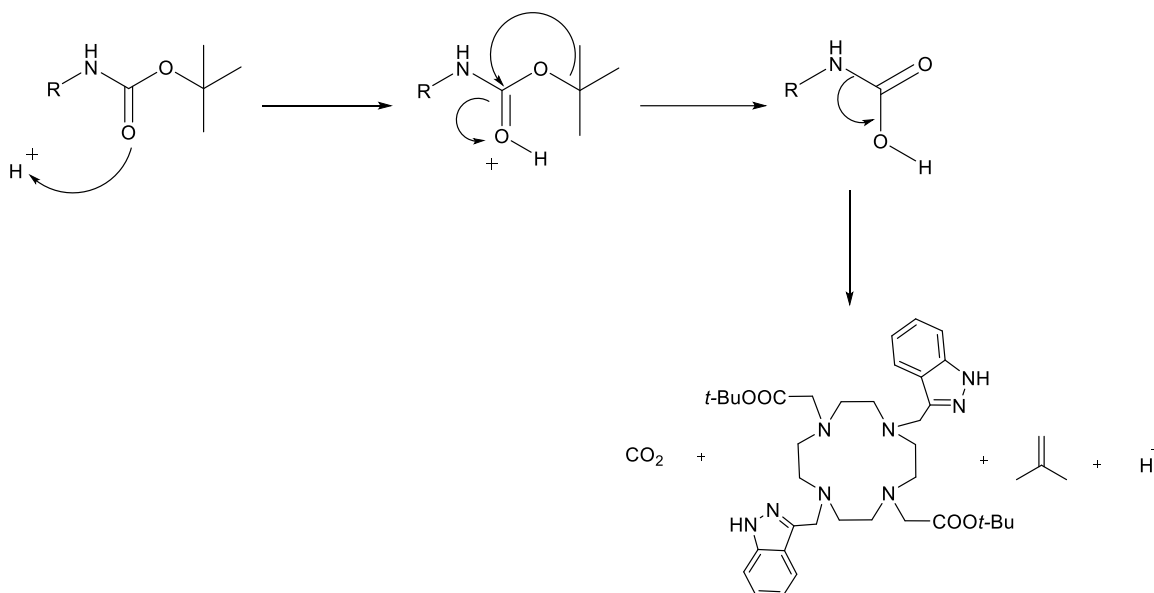
6.2.3 3 Alchilazione di 1,7-Bis(terz-butossicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano

La reazione prevede una sostituzione nucleofila S_N2 in cui le ammine secondarie del DO2A(tBu)₂ attaccano l' α -alogeno estere primario del braccio alchilante *tert*-butil 3-(bromometil)-1H-indazolo-1-carbossilato. Alla soluzione di reazione viene aggiunta la base CO₃²⁻ che neutralizza HBr non appena si forma.

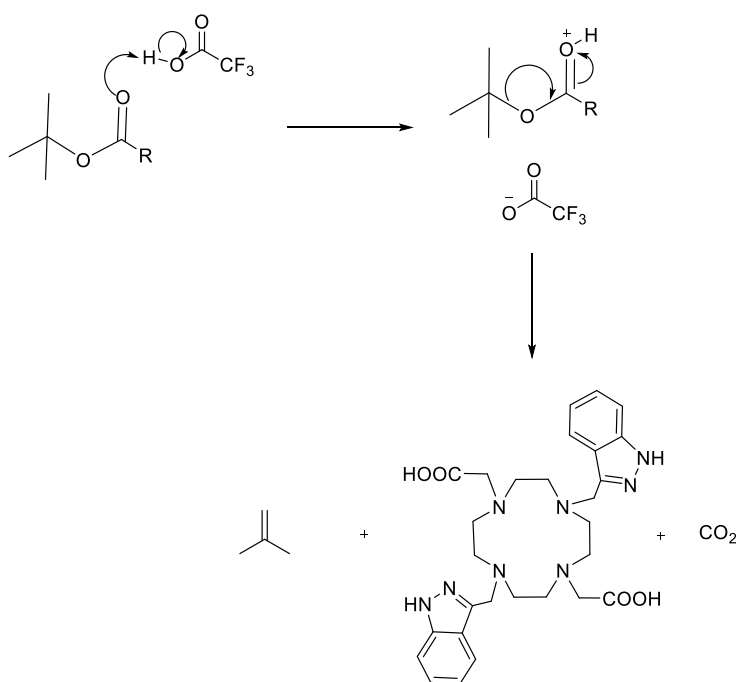


6.2.4 Deprotezione acida e formazione del di DO2A2Ind

Gli acidi come acido trifluoroacetico (TFA) possono essere utilizzati per deproteggere i gruppi protettori come il Boc (ter-butilossicarbonil) e il terz-butile. Avviene la protonazione dell'ossigeno (C=O) innescando la frammentazione in un catione terziario che deprotonandosi formerà un isobutene gassoso. Il carbammato frammentato può decarbossilarsi, rilasciando CO₂ e liberando l'ammina.



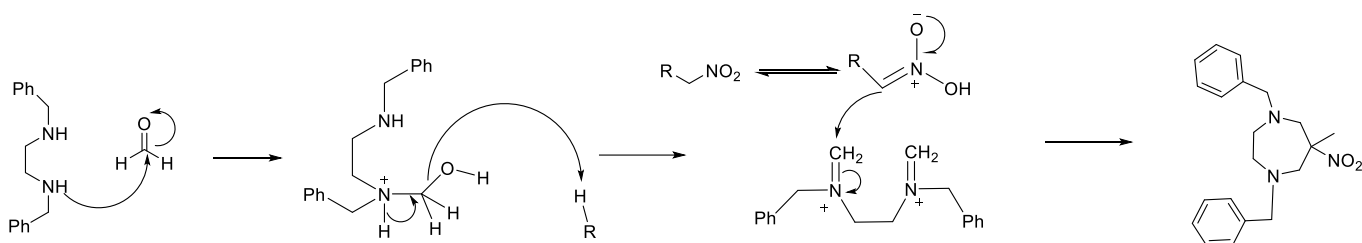
Contemporaneamente alla deprotezione del Boc avviene la deprotezione del tertbutile:



6.3 Sintesi del legante AAZ2AInd

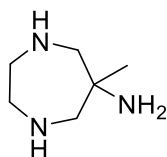
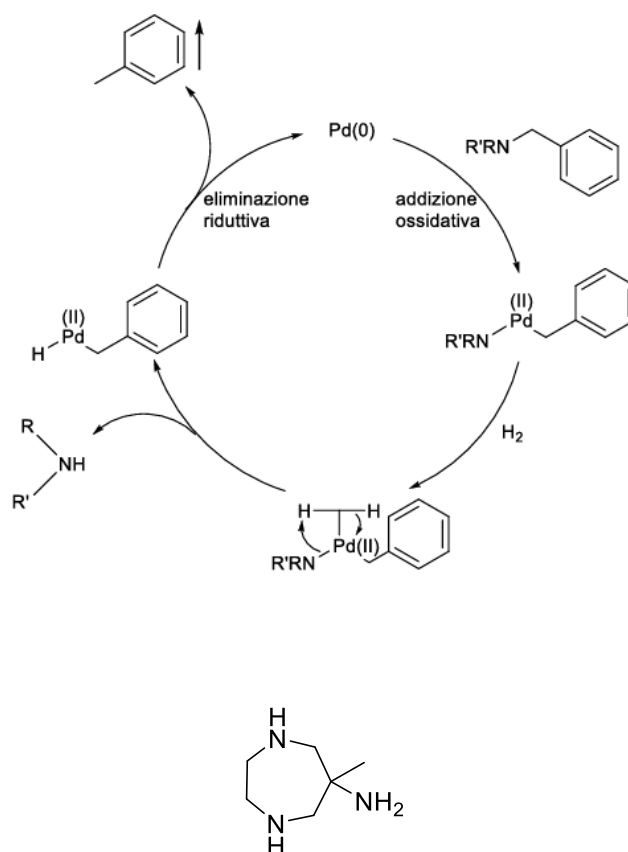
6.3.1 Sintesi del 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitro-1,4-diazepane

La reazione procede secondo un meccanismo di tipo Nitro-Mannich. Il processo inizia con la formazione di uno ione imminio, derivante dalla reazione tra le ammine dell'etilendiammina e la formaldeide. Il 6-nitroesanoato metilico può tautomerizzare nella sua forma enolica, permettendo l'attacco al carbonio elettrofilo dello ione imminio. Questo passaggio si ripete due volte (grazie alla presenza di due protoni acidi in posizione α rispetto al gruppo nitro), consentendo la chiusura di un anello a 7 termini e la formazione del prodotto finale.



6.3.2 Sintesi del 6-amino-1,4-peridrodiazepina (amped)

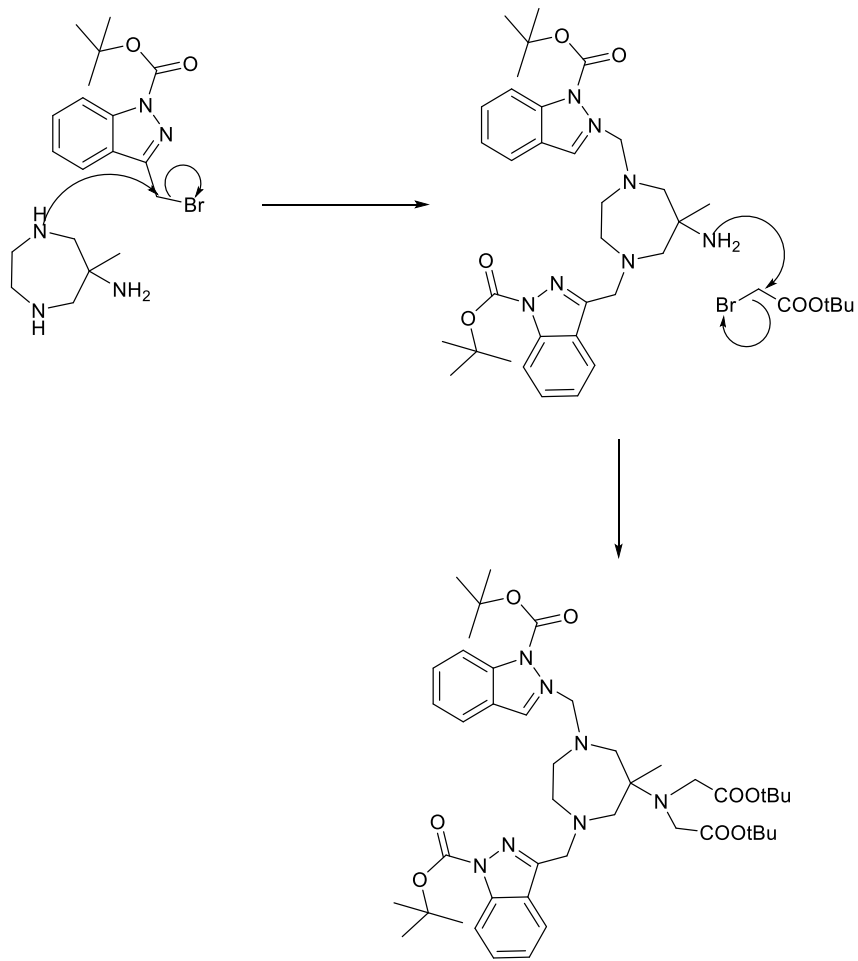
La reazione consiste in un'idrogenazione eseguita su Pd/C. L'idrogenolisi avviene tramite un meccanismo organometallico catalizzato dal palladio, che genera toluene come sottoprodotto. Pertanto, essendo il toluene volatile, non è necessario effettuare ulteriori purificazioni del prodotto finale una volta conclusa la reazione. Per rimuovere il Pd/C, è stato impiegato un filtro di vetro sinterizzato, con un filtro di carta sovrapposto a uno strato di Celite, che serve a trattenere solo il catalizzatore solido. Oltre alla deprotezione dei gruppi benzilici, viene ridotto anche il gruppo nitro ad ammina primaria.



6.3.3 Sintesi di AAZ2A(*t*Bu)₂Ind(*t*Bu)₂

La reazione prevede una sostituzione nucleofila S_N2 da parte delle ammine secondarie dell'amped verso il bromuro primario del braccio alchilante. La reazione si ripete due volte (una per ammina secondaria endociclica). La reazione forma anche HBr. La reazione viene bloccata sull'ammina esociclica perché meno basica e più ingombrata. Tuttavia, la reazione è stata eseguita one pot con lo step successivo. Il braccio BrCH₂COOtBu è stato aggiunto direttamente alla reazione in modo da alchilare l'azoto esociclico. La reazione forma anche HBr, ma alla soluzione viene aggiunta la base CO₃²⁻ che neutralizza HBr non appena si forma.

Il prodotto necessita lo step di purificazione, che non è stato possibile ottimizzare a causa di mancanza di tempo. Una prospettiva futura è attuare le analisi effettuate con il legante DO2A2Ind anche con il AAZ2AInd.



Capitolo 7: risultati e discussione: radiomarcatura ed esperimenti di stabilità

7.1 Sintesi dei complessi M(III) DO2A2Ind-¹⁹F

Gli esperimenti preliminari hanno previsto la formazione dell'addotto ternario fra il complesso e il ¹⁹F seguendo la procedura descritta nel capitolo 5, valutando la formazione degli addotti ternari a diversi rapporti ¹⁹F:complesso, con una concentrazione di complesso di 80 μM, e determinando la loro stabilità a diverse temperature e pH.

7.1.1 ¹⁹F-YDO2A2Ind

Per quanto riguarda il Y-DO2A2Ind, si può osservare come aggiungendo una minima quantità di ¹⁹F si formi il dimero con una percentuale di formazione del dimero pari al 70% come determinato tramite misure HPLC-MS. Aumentando le moli di ¹⁹F, fino a raggiungere un rapporto ¹⁹F:complesso di 4:1, si osserva un valore di formazione pari al 87%.

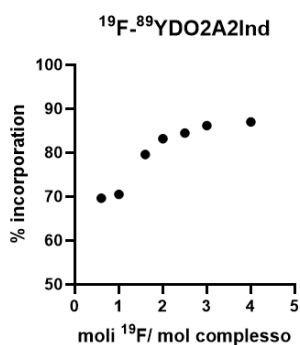


Figura 7.1: Andamento della formazione del dimero (%) rispetto al rapporto in moli ¹⁹F/complesso

Gli studi di formazione dei complessi fluorurati sono stati effettuati variando il pH di reazione (4.0, 4.5 e 5) e mantenendo costante la temperatura di reazione a 37°C o a 60°C.

Le soluzioni a differenti pH sono state mantenute alle relative temperature per un'ora e successivamente è stata monitorata stabilità della formazione del dimero attraverso analisi HPLC-MS (metodo C).

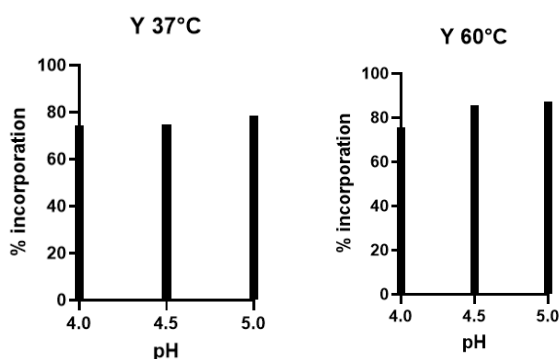


Figura 7.2: Studi di stabilità al variare del pH alle temperature di 37°C e 60°C.

Attraverso questi esperimenti si è notata una stabilità nella formazione del dimero a diversi pH ed a diverse temperature. A pH 5, sia per la temperatura di 37°C (78.7% di dimero) che per la temperatura di 60°C (87.2% di dimero) si è notata un'alta percentuale di formazione del dimero, per questo motivo le analisi di marcatura con ^{18}F sono state condotte a temperatura ambiente e pH 5.

7.1.2 ^{19}F -TbDO2A2Ind

Analogamente al caso precedente, anche con il complesso di Terbio sono state svolte le analisi variando la quantità di ^{19}F per determinare la % di formazione del dimero. Anche in questo caso si è visto un aumento della % di formazione del complesso, anche se più lento rispetto a quello rilevato per il complesso di Y. Per il rapporto ^{19}F : complesso – 4:1, la percentuale di incorporazione del ^{19}F risultava del 82.4%.

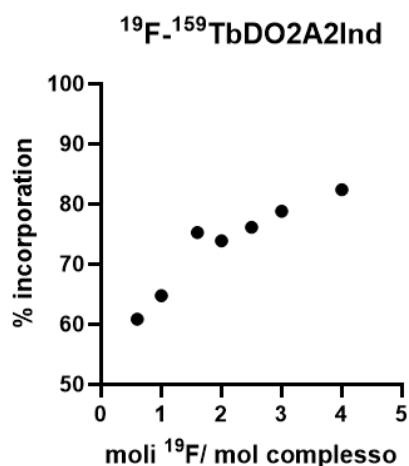


Figura 7.3: Andamento della formazione % del dimero (%) rispetto al rapporto in moli ^{19}F /complesso.

Le successive analisi hanno previsto studi della formazione dei complessi fluorurati dimerici al variare del pH (4.0, 4.5 e 5) mantenendo costante la temperatura a 37°C e a 60°C, utilizzando la soluzione in rapporto ^{19}F /complesso 4/1. Le soluzioni a differenti pH sono state mantenute alle relative temperature per un'ora e successivamente è stata monitorata % di formazione del dimero attraverso analisi HPLC-MS (metodo C).

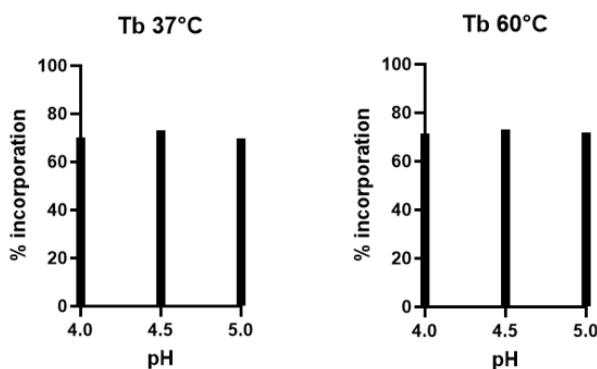


Figura 7.4: Studi di stabilità al variare del pH alle temperature di 37°C e 60°C.

I risultati non mostrano una differenza di formazione sostanziale tra i diversi pH e temperature testate, mostrando perciò come il dimero di Tb si formi a diverse condizioni. Anche in questo caso, per gli esperimenti successivi, si è proceduto a marcare il complesso con ^{18}F a pH 5 e temperatura ambiente.

7.1.3 ^{19}F -LuDO2A2Ind

Rispetto ai due casi precedenti, la formazione del dimero mostra un massimo del 23,2 % allo stesso rapporto $^{19}\text{F}/\text{complesso}$, per il quale gli altri complessi riportavano una percentuale di incorporazione del ^{19}F superiore al 80%. Si ipotizza che il motivo della scarsa formazione dell'addotto ternario fra il complesso di Lu(III) e il $^{19}\text{F}^-$ possa essere dovuto ad una minor raggio ionico del Lu^{3+} nonacoordinato rispetto all'Y(III) e al Tb(III). Probabilmente la dimensione dello ione è cruciale per la formazione di un addotto dimerico stabile. Nel caso del complesso di lutezio la dimensione ristretta dello ione, rispetto agli altri ioni trivalenti, determina un'instabilità cinetica nella formazione del dimero.

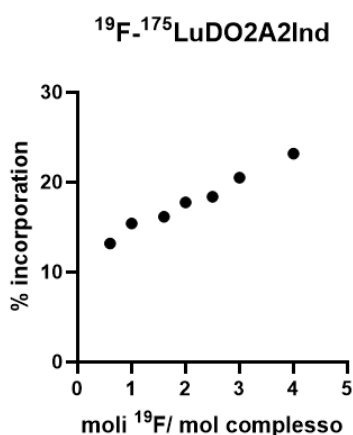


Figura 7.5: Andamento della formazione (%) del dimero rispetto al rapporto in moli $^{19}\text{F}/\text{complesso}$

Le successive analisi hanno previsto studi di formazione dei complessi fluorurati al variare del pH (4.0, 4.5 e 5) mantenendo costante la temperatura a 37°C e a 60°C , utilizzando la soluzione in rapporto $^{19}\text{F}/\text{complesso}$ 4/1 (quella che ha dimostrato la maggiore % di formazione dimerica negli esperimenti precedenti). Le soluzioni a differenti pH sono state mantenute alle relative temperature per un'ora e successivamente è stata monitorata la variazione dell'incorporazione % attraverso analisi HPLC-MS (metodo C).

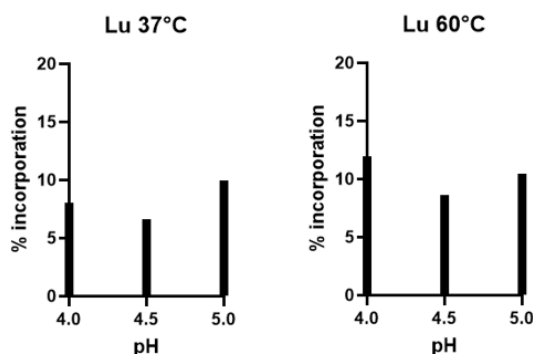


Figura 7.6: Studi di stabilità al variare del pH alle temperature di 37°C e 60°C.

7.2 Radiomarcatura con ^{18}F di Y(III)DO2A2Ind

Il primo esperimento di radiomarcatura prevede di valutare l'incorporazione (%) di ^{18}F al variare dell'attività, mantenendo costante la concentrazione del legante Y-DO2A2Ind. La percentuale di incorporazione corrisponde alla percentuale di fluoruro incorporato nel complesso rispetto al totale utilizzata per la fluorurazione. È stata utilizzata la soluzione del complesso Y-DO2A2Ind ad una concentrazione pari a 1.5 mM per tutti gli esperimenti. Da tale soluzione sono stati prelevati 30 μL (47 nmol) e aggiunti progressivamente quantità crescenti di attività, insieme a quantità di buffer (una soluzione EtOH e NaOAc) in modo da ottenere un volume totale di 500 μL . La concentrazione delle soluzioni usate per questo esperimento corrispondeva a 94 μM .

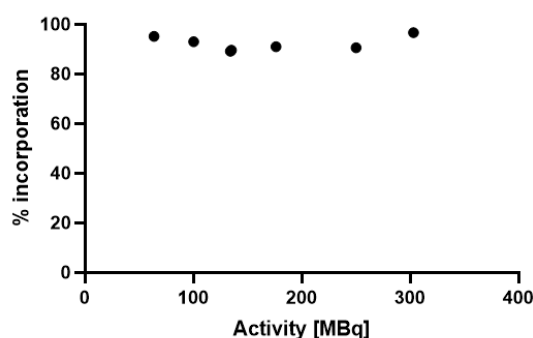


Figura 7.8: Incorporazione (%) di ^{18}F a valori di attività crescente per il complesso Y-DO2A2Ind [94 μM].

L'incorporazione % risultava, anche ad attività molto elevate (fino a 300 MBq), lineare e sempre con un valore superiore all' 80%.

7.3 Test di stabilità nel tempo di ^{18}F -Y(III) DO2A2Ind

La stabilità del complesso radiomarcato è stata studiata mediante radio-HPLC (Metodo D), misurando la % di ^{18}F associata al complesso Y(III)-DO2A2Ind al passare del tempo, mediante corse cromatografiche effettuate a intervalli di 20 minuti. Per l'esperimento di marcatura si sono utilizzati

47 nmol di complesso e 350 MBq di ^{18}F . L'attività specifica calcolata risultava di 5.3[MBq/nmol]. La soluzione è stata analizzata senza purificazione del grezzo di reazione. Dal momento che la emivita del ^{18}F è di 110 minuti, la attività associata alla soluzione del complesso radiomarcato decade del'11,9% in 20 minuti. Quindi, per misurare una misura quanto più possibile precisa della stabilità, si è reso necessario l'aumento del volume di iniezione di 2 μL per ogni nuova analisi HPLC, garantendo questo che la medesima attività è stata analizzata a diversi tempi

Il seguente cromatogramma (*Figura 7.9*) riporta il comportamento del complesso radiomarcato con ^{18}F . Al termine di ogni reazione di marcatura, è stata calcolata l'attività specifica, ovvero la quantità di radioattività di ^{18}F espressa in MBq per unità di massa del precursore utilizzato per la sintesi espressa in nmol (SA). In questo caso la SA risultava 5.3 [MBq/nmol].

Y 2	Concentrazione dell'attività [MBq/ul]	AMA [MBq/nmol]	pH	Purificazione	Attività utilizzata [MBq]
	0.5	5,3	5	No	350

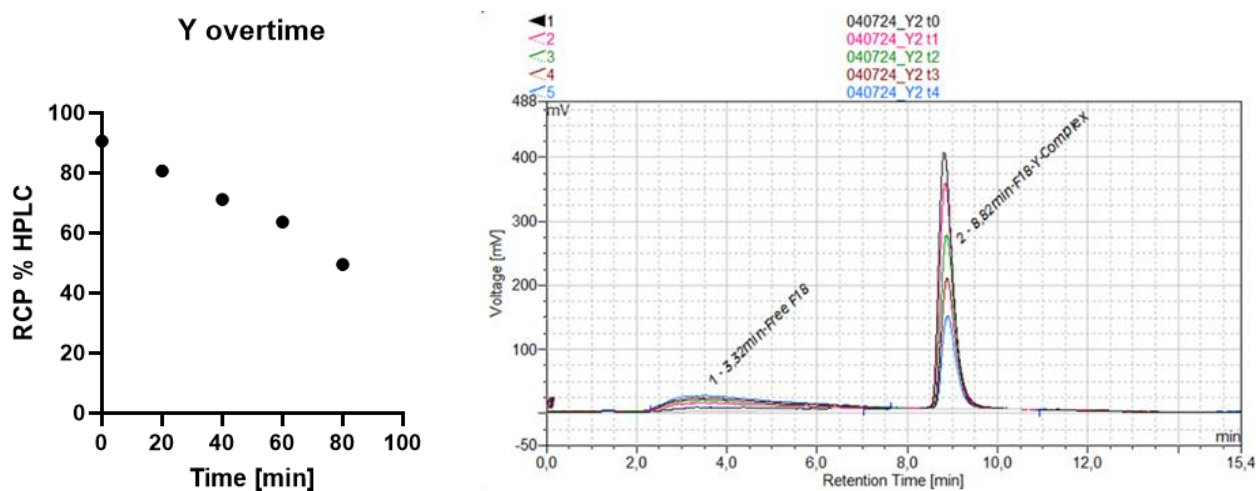


Figura 7.9: A sinistra: andamento della RCP (%) della stabilità del complesso marcato con ^{18}F rispetto al tempo. A destra: cromatogrammi relativi alla stabilità del complesso radio marcato: ^{18}F (picco a 9 min) e ^{18}F libero (tra 2 e 7 min).

Le RCP (%) in HPLC rappresentano l'area relativa al complesso radiomarcato e purificato in relazione all'attività di ^{18}F libero. Come è possibile osservare dal grafico riportato sulla sinistra della *Figura 7.9*, la RCP (%) segue un decadimento lineare nel tempo, raggiungendo il 50% entro 80

minuti. Questo decadimento lineare risulta difficile da spiegare in assenza di ulteriori analisi, tra cui lo studio della stabilità nel tempo degli ioni metallici radioattivi, perciò gli isotopi ^{90}Y , ^{161}Tb , ^{177}Lu e la conferma della possibile mancanza di atomi donatori in modo da stabilizzare stabilizzare la complessazione, tuttavia ancora da determinare.

Successivamente è stata eseguita la stessa marcatura, seguita dalla purificazione, in modo tale da studiare l'andamento della stabilità nel tempo del complesso purificato e l'effetto della eliminazione dell'eccesso di complesso non marcato sulla RCP. La soluzione marcata con una quantità scelta di ^{18}F è stata purificata come descritto nel capitolo 5.1. L'andamento della RCP (%) nel tempo risultava simile all'andamento del complesso non purificato; per il complesso non purificato dopo 80 minuti si aveva un RCP del 50%, mentre per il purificato del 20%.

Y 1B	Concentrazione dell'attività [MBq/ul]	AMA [MBq/nmol]	pH	Purificazione	Prodotto [MBq]	Purificazione percentuale [%]	RCP % (tempo 0) Prodotto purificato
	0.5	5.6	5	Yes	4.5	3	55.46

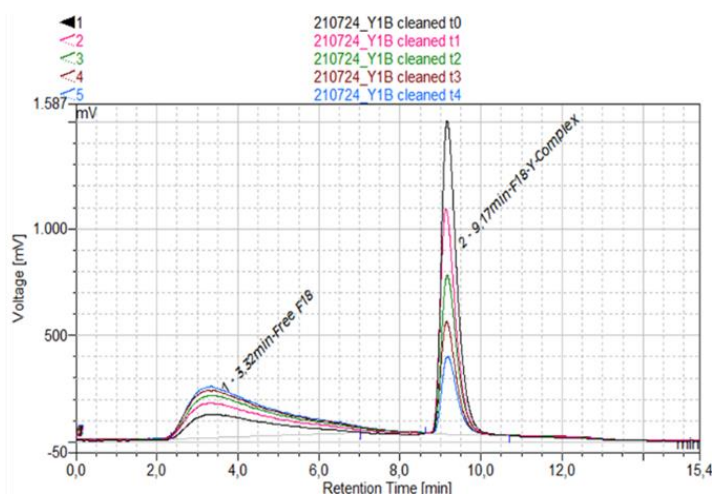
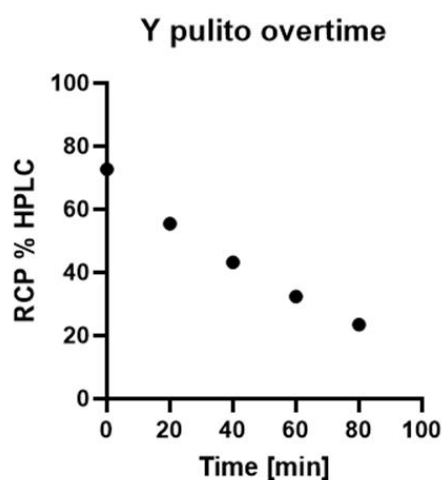


Figura 7.10: A sinistra: andamento della RCP (%) rispetto al tempo. A destra: cromatogrammi relativi a formazione del complesso radiomarcato con ^{18}F (picco a 9 min) e ^{18}F libero (tra 2 e 7 min).

7.4 Radiomarcatura con ^{18}F di Tb(III) DO2A2Ind

Il primo esperimento di radiomarcatura del complesso Tb-DO2A2Ind ha previsto la valutazione della percentuale di incorporazione (%) del ^{18}F a diversi valori di attività di quest'ultimo.

Si è scelto un valore di complesso pari a 46 nmol (34 μL) per ciascun'analisi e si è marcato con crescenti quantità di ^{18}F . Le reazioni sono state condotte ad un pH di 5 e temperatura ambiente. Il volume totale di soluzione per ciascun'analisi corrispondeva a 500 μL , e la relativa concentrazione era pari a 93 μM . Inizialmente non è stata eseguita purificazione, in modo da poter determinare la capacità di incorporazione dei diversi complessi di metallo trivalente.

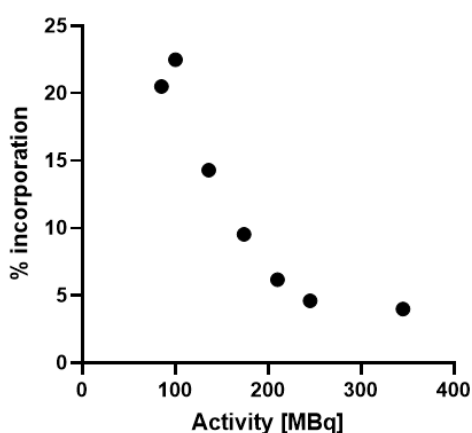


Figura 7.11: Incorporazione (%) di ^{18}F a valori di attività crescente per il legante Tb-DO2A2Ind [93 μM].

Come mostrato in *Figura 7.11*, con 46 nmol del complesso, aumentando l'attività, il grado di incorporazione diminuisce linearmente. Il motivo di ciò è che le molecole di complesso risultavano in difetto di molto rispetto al ^{18}F che restava libero in soluzione. In questo caso si è notato come l'incorporazione percentuale non superi valori del 25% anche a bassi valori (100 MBq) di attività di ^{18}F . Il fluoro tendeva quindi a rimanere libero in soluzione piuttosto che marcare il complesso.

7.5 Test di stabilità nel tempo di ^{18}F -Tb(III) DO2A2Ind

La stabilità del complesso radiomarcato è stata studiata mediante radio-HPLC (Metodo D), misurando la % di ^{18}F associata al complesso Tb(III)-DO2A2Ind al passare del tempo, mediante corse cromatografiche effettuate a intervalli di 20 minuti. Per l'esperimento di marcatura si sono utilizzati

46 nmol di complesso e 100 MBq di ^{18}F . L'attività specifica calcolata risultava di 2.1 [MBq/nmol]. Come nei test precedenti, la soluzione è stata analizzata senza purificazione del grezzo di reazione. Dal momento che la emivita del ^{18}F è di 110 minuti, la attività associata alla soluzione del complesso radiomarcato decade del'11,9% in 20 minuti. Quindi, per misurare una misura quanto più possibile precisa della stabilità, si è reso necessario l'aumento del volume di iniezione di 2 μL per ogni nuova analisi HPLC, garantendo questo che la medesima attività è stata analizzata a diversi tempi.

Tb1	Concentrazione dell'attività [MBq/ul]	AMA [MBq/nmol]	pH	Purificazione
	0.2	2.1	5	No

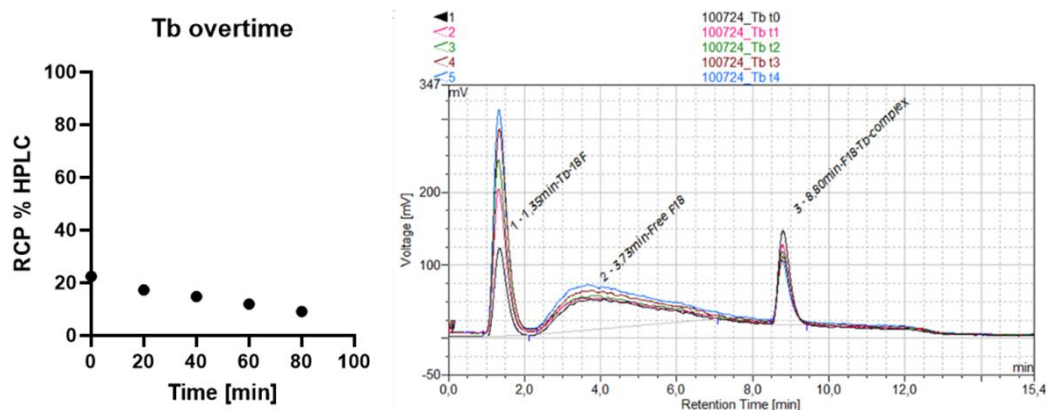


Figura 7.12: A sinistra: andamento della RCP (%) rispetto al tempo. A destra: cromatogrammi relativi a formazione del complesso radiomarcato con ^{18}F (picco a 9 min), ^{18}F libero (picco tra 2 e 7 min) e ^{18}F -Tb (picco a 1.5 min).

In questo caso i risultati hanno mostrato un comportamento alquanto diverso rispetto al corrispettivo complesso di Y(III) radiomarcato. Col passare del tempo è diminuito il picco relativo al complesso di Tb(III) fluorurato, e contemporaneamente aumentava sia quello del ^{18}F libero che il picco probabilmente relativo al complesso Tb- ^{18}F . Per meglio identificare le specie radioattive visibili nel profilo radioattivo, è stata eseguita un'analisi HPLC iniettando una soluzione marcata con ^{18}F di un sale di Tb(III) (TbCl_3). Il cromatogramma riportava un picco alto e stretto a 1.5 minuti corrispondente al ^{18}F -Tb; ed un secondo picco allargato tra 2 e 7 minuti relativo al fluoro libero. Il picco iniziale, relativo al legame metallo-fluoro, si forma a causa di un processo di decomplessazione assistita dalla presenza di ioni fluoruro.

Lo stesso esperimento è stato svolto purificando la soluzione e valutando la stabilità del complesso marcato in tali condizioni. L'attività del complesso radiomarcato ^{18}F post purificazione era pari a 3.7 MBq.

Tb A	Concentrazione dell'attività [MBq/ul]	AMA [MBq/nmol]	pH	Purificato	Prodotto [MBq]	Purificazione percentuale [%]	RCP % (tempo 0) Prodotto purificato
	0.42	4.2	5	yes	3.7	1.92	68.26

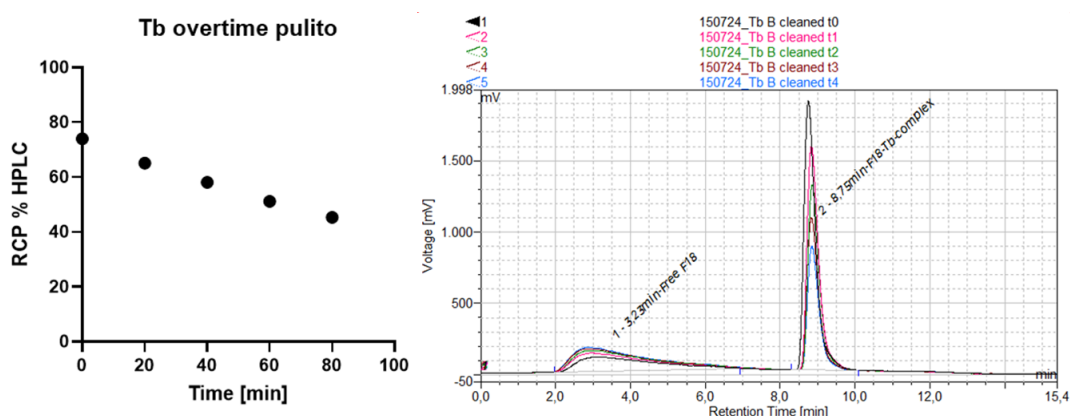


Figura 7.13: A sinistra: andamento della RCP (%) rispetto al tempo. A destra: cromatogrammi relativi a formazione del complesso radiomarcato con ^{18}F (picco a 9 min), ^{18}F libero (picco tra 2 e 7 min).

Dal cromatogramma si deduce come il complesso fluorurato purificato sia più stabile rispetto al complesso senza purificazione. Dopo 80 minuti, il valore di RCP risulta al di sotto del 50%. Si deduce, inoltre, che il picco relativo al ^{18}F -Tb non compaia più post purificazione, probabilmente trattenuto nella cartuccia in seguito alla purificazione. Inoltre, si denota la presenza del picco relativo al fluoro libero, fin da subito. Ciò è probabilmente dovuto ad una purificazione manuale non del tutto efficiente.

7.6 Radiomarcatura con ^{18}F di Lu(III)DO2A2Ind

Come descritto per gli altri complessi, il primo esperimento di radiomarcatura mirava a valutare l'incorporazione % di ^{18}F a livelli di attività crescenti, mantenendo costante la concentrazione del legante Lu-DO2A2Ind. Sono stati prelevati 34 μL di soluzione madre di complesso (47 nmol) poi

marcato seguendo la procedura descritta nel capitolo 5.1. Il volume totale corrispondeva 500 μL e perciò 94 μM . Le reazioni si sono svolte a pH 5 e a temperatura ambiente, e si è omessa la purificazione del prodotto radiomarcato, per permettere la valutazione dell'incorporazione % con ^{18}F del complesso di Lutezio.

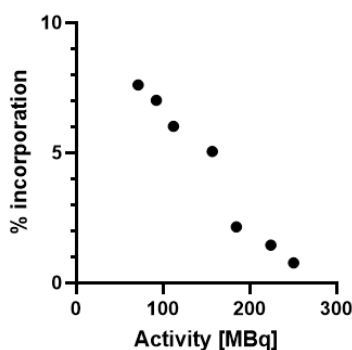


Figura 7.14: Incorporazione (%) di ^{18}F a valori di attività crescente per il legante Lu-DO2A2Ind [94 μM]

L'incorporazione % del complesso di Lutezio non supera l'8 % anche per quantità relativamente basse di ^{18}F . Il massimo valore di incorporazione % misurato è stato del 7.6 % per un'attività di 71 MBq di ^{18}F . In tutti i casi, oltre a grandi % di ^{18}F libero, si osserva anche la presenza di picchi cromatografici relativi alla formazione della specie ^{18}F -Metallo libero.

7.7 Test di stabilità nel tempo di ^{18}F -Lu(III)DO2A2Ind

La stabilità del complesso radiomarcato è stata studiata mediante radio-HPLC (Metodo D), misurando la % di ^{18}F associata al complesso Lu(III)-DO2A2Ind al passare del tempo, mediante corse cromatografiche effettuate a intervalli di 20 minuti. Per l'esperimento di marcatura si sono utilizzati 47 nmol di complesso e 100 MBq di ^{18}F . L'attività specifica calcolata risultava di 2.1 [MBq/nmol]. Come nei test precedenti, la soluzione è stata analizzata senza purificazione del grezzo di reazione. Dal momento che la emivita del ^{18}F è di 110 minuti, la attività associata alla soluzione del complesso radiomarcato decade del'11,9% in 20 minuti. Quindi, per misurare una misura quanto più possibile precisa della stabilità, si è reso necessario l'aumento del volume di iniezione di 2 μL per ogni nuova analisi HPLC, garantendo questo che la medesima attività è stata analizzata a diversi tempi.

Lu 1C	Activity concentration [MBq/ul]	AMA [MBq/nmol]	Reaction pH	Purified or not
	2.32	1.7	5	No

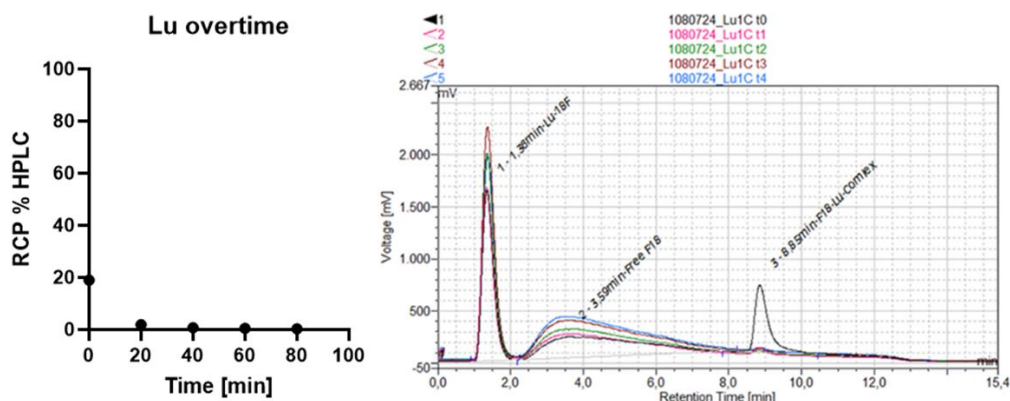


Figura 7.15: A sinistra: andamento della RCP (%) rispetto al tempo. A destra: cromatogrammi relativi a formazione del complesso radiomarcato con ^{18}F (picco a 9 min), ^{18}F libero (picco tra 2 e 7 min) e ^{18}F -Tb (picco a 1.5 min).

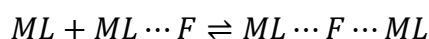
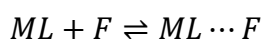
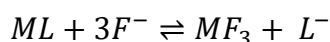
La dimensione ridotta del raggio ionico del lutezio (1.03 \AA), causa una forte instabilità cinetica; che in concomitanza all'eccesso di fluoro provoca una decomplessazione molto veloce del metallo.

Per i complessi Y-DO2A2Ind; Tb-DO2A2Ind i risultati ottenuti sono stati promettenti, mostrando un aumento nella formazione del dimero all'aumento della quantità di ^{19}F . Non si sono notati cambiamenti nella cinetica di incorporazione cambiando pH o temperatura. Per quanto riguarda Sc-DO2A2Ind, i risultati non mostravano la formazione del dimero o in ogni caso del complesso fluorurato. La marcatura con ^{18}F ha mostrato ottimi risultati sia in termini di incorporazione che di stabilità per il complesso Y-DO2A2Ind e Tb-DO2A2Ind purificato; mentre per il complesso Tb-DO2A2Ind non purificato nel tempo si è notata la formazione del picco del complesso Tb-F. Nel caso del Lu-DO2A2Ind, i risultati sono stati meno positivi in quanto sia l'incorporazione che la stabilità dell'addotto radiomarcato sono risultati scarsi. Il comportamento anomalo del complesso di Lu(III), rispetto a quelli del Tb(III) e Y(III), si può spiegare tramite un'instabilità cinetica del complesso, probabilmente dovuta alla dimensione ridotta del raggio ionico, che facilita la formazione del legame Metallo-Fluoro.

Capitolo 8: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Durante il corso di questa tesi, sono stati sintetizzati e caratterizzati leganti specifici per complessare ioni metallici trivalenti di Ittrio (Y), Terbio (Tb) e Lutezio (Lu). Successivamente, questi complessi sono stati marcati con il radioisotopo ^{18}F per applicazioni in medicina nucleare, specialmente nel contesto della diagnostica tramite PET (Tomografia a Emissione di Positroni). Gli esperimenti di marcatura sono stati effettuati in modo da valutare la stabilità nel tempo ed il grado di incorporazione del fluoro (labelling yield), variando l'attività aggiunta. I risultati ottenuti si possono considerare promettenti per ulteriori studi, con la possibilità di introdurre un'applicazione teranostica con gli isotopi radioattivi dei corrispondenti radiometalli trivalenti ^{90}Y ; ^{161}Tb ; ^{177}Lu .

La sintesi del legante ha previsto la formazione di una zona idrofobica, caratterizzata dalle due braccia di natura azaindolica, che facilitano la coordinazione del fluoro; per questo motivo si denota uno scambio tra l'acqua ed il fluoro anche a basse concentrazioni, specialmente per il complesso di Y(III) e Tb(III). I primi esperimenti sui complessi hanno previsto la coordinazione del ^{19}F con la relativa formazione del dimero come riportato in letteratura per i corrispondenti complessi di Eu e Tb, seguendo l'equilibrio:



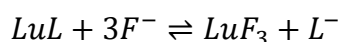
E' stato osservato che per il complesso di Y(III) la formazione del dimero è avvenuta in maniera molto rapida con un grado di formazione del 70% già dopo l'aggiunta di 0.6 eq di fluoruro. Per il complesso di Tb(III) si è notata una situazione piuttosto analoga; mentre per il complesso di Lu(III) la formazione del dimero è risultata più difficoltosa. Il complesso Lu(III)-DO2A2Ind ha determinato una notevole instabilità cinetica, probabilmente dovuta al raggio ionico nettamente più piccolo rispetto agli altri ioni utilizzati: Y(III) 1.075; Tb(III) 1.095; Lu(III) 1.032. La scarsa inerzia cinetica è causata dal raggio ionico basso come si nota dalla veloce decomplessazione dello ione metallico in presenza di fluoro libero.

Nel caso del complesso Y(III)-DO2A2Ind, si è ricavata una grande percentuale di incorporazione dell'isotopo radioattivo con una soluzione 94 μM di complesso (47 nmol). Si è determinato che a 47 nmol si raggiungeva un grado di incorporazione molto elevato, per qualsiasi attività utilizzata; questo

perché la quantità di complesso risultava in eccesso rispetto al ^{18}F e quindi tendenzialmente tutto il ^{18}F utilizzato veniva incorporato nel complesso. Provando la marcatura dei complessi Tb(III)-DO2A2Ind e Lu(III)-DO2A2Ind, con circa le stesse nmol, e la stessa molarità, utilizzate in precedenza con il complesso di Y(III), si nota un comportamento totalmente differente.

Per quanto riguarda il Terbio, si è notata comportamento intermedio tra Y e Lu. Si può notare come, in assenza di purificazione, la formazione del complesso marcato risulti più complicata e che nella stessa condizione di marcatura del complesso di Y(III), il massimo grado di incorporazione sia del 23%. Tramite la purificazione si è rimosso efficientemente la specie terbio-fluoro; infatti il cromatogramma mostra unicamente il picco relativo al complesso radiomarcato ed al fluoro libero.

Al contrario, il complesso Lu-DO2A2Ind ha mostrato una minore stabilità, principalmente a causa del suo raggio ionico più piccolo rispetto all'Ittrio e al Terbio; infatti, forma complessi meno stabili, che possono degradarsi più rapidamente. Dagli esperimenti condotti si nota come il complesso di Lu tenda a degradarsi quando radiomarcato, facendo prevalere la formazione di Lu-F e spostando la reazione a destra.



La contrazione del raggio ionico provoca la formazione del sottoprodotto Lu-F ed impartisce una instabilità cinetica, mostrando un distacco fin dalle prime analisi del metallo. Le differenze di stabilità tra i complessi limitano attualmente il loro utilizzo su larga scala, specialmente nel caso del Lutezio.

I dati relativi alla stabilità nel tempo devono essere ancora confermati con ulteriori analisi (radio TLC). Dai dati ricavati in letteratura ^[25], i dimeri di ^{19}F risultano particolarmente stabili, con costanti piuttosto elevate e un'impossibilità nel rilascio del metallo; in disaccordo dai dati ricavati con il radio-HPLC.

Ulteriori studi dovrebbero concentrarsi sull'ottimizzazione delle tecniche di sintesi e sull'analisi della biocompatibilità a lungo termine, con particolare attenzione alla stabilità in vivo. Sono previste ulteriori analisi NMR sui complessi fluorurati con ^{19}F per determinare in maniera precisa il grado di formazione del dimero e del monomero, abbassando le concentrazioni dei complessi.

Inoltre, risulta necessario ripetere le analisi con il secondo legante sintetizzato AAZ2A2Ind, in modo da poter determinare l'efficacia con quest'ultimo, eventualmente con lo Sc(III).

Il futuro di questi complessi è promettente, con ampi margini di miglioramento nella stabilità dei complessi e nella loro applicazione in terapie mirate. Le ricerche future potrebbero concentrarsi sull'ottimizzazione dei complessi di Lu per migliorare la stabilità, e su una maggiore esplorazione dei

complessi di Tb per applicazioni terapeutiche mirate. Inoltre, lo sviluppo di nuovi leganti potrebbe aumentare ulteriormente l'efficacia di questi complessi per uso clinico.

Il principale vantaggio e la possibile applicazione futura di questi complessi fluorurati risiedono nella possibilità di combinarli in applicazioni teranostiche, cioè l'uso simultaneo per diagnosi e terapia. L'introduzione di complessi come quelli del Ittrio-90, Terbio-161 e del Lutezio-177 per applicazioni teranostiche rappresenta un importante passo avanti verso una medicina personalizzata, in cui il trattamento del paziente può essere ottimizzato grazie a una diagnosi e terapia mirate.

Bibliografia:

- [1] R. Lawson, *An Introduction to Radioactivity*, (1999).
- [2] e01_978-0-12-814397-1_01.pdf, (n.d.). https://toc.library.ethz.ch/objects/pdf03/e01_978-0-12-814397-1_01.pdf (accessed October 3, 2024).
- [3] D.L. Bailey, American Association of Physicists in Medicine, eds., *Nuclear medicine physics: a handbook for teachers and students*, International Atomic Energy Agency, Vienna, 2014.
- [4] Z. Sóti, J. Magill, R. Dreher, G. Pfennig, *The New Edition of the Karlsruhe Nuclide Chart in Summer 2015*, (2015).
- [5] B.T. Smith, *Introduction to radioactivity and radioactive decay*, (n.d.).
- [6] F. Boccato Payolla, A.C. Massabni, C. Orvig, *Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: a short review*, *Eclética Quím. J.* 44 (2019) 11–19. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v44.3.2019.p11-19>.
- [7] R.J. Hicks, M.S. Hofman, *Is there still a role for SPECT–CT in oncology in the PET–CT era?*, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9 (2012) 712–720. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.188>.
- [8] T.I. Kostelnik, C. Orvig, *Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy*, *Chem. Rev.* 119 (2019) 902–956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294>.
- [9] K. Vermeulen, M. Vandamme, G. Bormans, F. Cleeren, *Design and Challenges of Radiopharmaceuticals*, *Semin. Nucl. Med.* 49 (2019) 339–356. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.07.001>.
- [10] S.S. Gambhir, *Molecular imaging of cancer with positron emission tomography*, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 683–693. <https://doi.org/10.1038/nrc882>.
- [11] P. Zanzonico, *Positron emission tomography: a review of basic principles, scanner design and performance, and current systems*, *Semin. Nucl. Med.* 34 (2004) 87–111. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2003.12.002>.
- [12] dr. kotyanaik maloth, N. Velpula, S. Ugrappa, S. Kodangal, *Radioisotopes: An overview*, *Int. J. Case Rep. Images* 5 (2014) 604. <https://doi.org/10.5348/ijcri-201457-RA-10012>.
- [13] K. Chen, X. Chen, *Design and Development of Molecular Imaging Probes*, *Curr. Top. Med. Chem.* 10 (2010) 1227. <https://doi.org/10.2174/156802610791384225>.
- [14] *Scienza Per Tutti - 4. Ciclotrone*, (n.d.). <https://scienzapertutti.infn.it/5-ciclotrone> (accessed October 3, 2024).
- [15] K.R. Scroggie, M.V. Perkins, J.M. Chalker, *Reaction of [18F]Fluoride at Heteroatoms and Metals for Imaging of Peptides and Proteins by Positron Emission Tomography*, *Front. Chem.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.687678>.
- [16] *Kryptofix 222, Lamentations Chem.* (n.d.). <https://gaussling.wordpress.com/tag/kryptofix-222/> (accessed October 3, 2024).
- [17] B.P. Burke, G.S. Clemente, S.J. Archibald, *Boron–18F containing positron emission tomography radiotracers: advances and opportunities*, *Contrast Media Mol. Imaging* 10 (2015) 96–110. <https://doi.org/10.1002/cmmi.1615>.
- [18] B.P. Burke, G.S. Clemente, S.J. Archibald, *Boron–18F containing positron emission tomography radiotracers: advances and opportunities*, *Contrast Media Mol. Imaging* 10 (2015) 96–110. <https://doi.org/10.1002/cmmi.1615>.

- [19] M.M. Jensen, A. Kjaer, Monitoring of anti-cancer treatment with ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT PET: a comprehensive review of pre-clinical studies, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 5 (2015) 431–456.
- [20] C. Nanni, L. Fantini, S. Nicolini, S. Fanti, Non FDG PET, *Clin. Radiol.* 65 (2010) 536–548. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2010.03.012>.
- [21] M.M. Alauddin, Positron emission tomography (PET) imaging with ^{18}F -based radiotracers, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2 (2011) 55–76.
- [22] G. Tang, M. Wang, X. Tang, M. Gan, L. Luo, Fully automated one-pot synthesis of [^{18}F]fluoromisonidazole, *Nucl. Med. Biol.* 32 (2005) 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2005.03.010>.
- [23] L. Russelli, J. Martinelli, F. De Rose, S. Reder, M. Herz, M. Schwaiger, W. Weber, L. Tei, C. D'Alessandria, Room Temperature Al ^{18}F Labeling of 2-Aminomethylpiperidine-Based Chelators for PET Imaging, *ChemMedChem* 15 (2020) 284–292. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900652>.
- [24] W. Laurène, L. Raúl, S. Katalin, F. Céline, K. Gilles, M. Antonio, C. Charlotte, A. Samir, Design and synthesis of a new bifunctional chelating agent: Application for Al $^{18}\text{F}/^{177}\text{Lu}$ complexation, *J. Inorg. Biochem.* 246 (2023) 112267. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112267>.
- [25] J.N. Whetter, B.A. Vaughn, A.J. Koller, E. Boros, An Unusual Pair: Facile Formation and In Vivo Validation of Robust Sc– ^{18}F Ternary Complexes for Molecular Imaging, *Angew. Chem.* 134 (2022) e202114203. <https://doi.org/10.1002/ange.202114203>.
- [26] J.N. Whetter, D. Śmiłowicz, E. Boros, Exploring Aqueous Coordination Chemistry of Highly Lewis Acidic Metals with Emerging Isotopes for Nuclear Medicine, *Acc. Chem. Res.* 57 (2024) 933–944. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00781>.
- [27] Table 7 . The hard and soft acids and bases (HSAB) theory. The Lewis..., ResearchGate (n.d.). https://www.researchgate.net/figure/The-hard-and-soft-acids-and-bases-HSAB-theory-The-Lewis-acids-and-bases-presented-in_tbl4_30072770 (accessed October 3, 2024).
- [28] L. Lattuada, A. Barge, G. Cravotto, G.B. Giovenzana, L. Tei, The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3019. <https://doi.org/10.1039/c0cs00199f>.
- [29] T. Liu, A. Nonat, M. Beyler, M. Regueiro-Figueroa, K. Nchimi Nono, O. Jeannin, F. Camerel, F. Debaene, S. Cianférani-Sanglier, R. Tripier, C. Platas-Iglesias, L.J. Charbonnière, Supramolecular Luminescent Lanthanide Dimers for Fluoride Sequestering and Sensing, *Angew. Chem.* 126 (2014) 7387–7391. <https://doi.org/10.1002/ange.201404847>.
- [30] J.N. Whetter, B.A. Vaughn, A.J. Koller, E. Boros, An Unusual Pair: Facile Formation and In Vivo Validation of Robust Sc– ^{18}F Ternary Complexes for Molecular Imaging, *Angew. Chem.* 134 (2022) e202114203. <https://doi.org/10.1002/ange.202114203>.
- [31] Y. Basel, A. Hassner, Di- *tert* -butyl Dicarboxylate and 4-(Dimethylamino)pyridine Revisited. Their Reactions with Amines and Alcohols ¹, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 6368–6380. <https://doi.org/10.1021/jo000257f>.
- [32] T. Liu, A. Nonat, M. Beyler, M. Regueiro-Figueroa, K. Nchimi Nono, O. Jeannin, F. Camerel, F. Debaene, S. Cianférani-Sanglier, R. Tripier, C. Platas-Iglesias, L.J. Charbonnière, Supramolecular Luminescent Lanthanide Dimers for Fluoride Sequestering and Sensing, *Angew. Chem.* 126 (2014) 7387–7391. <https://doi.org/10.1002/ange.201404847>.