



Università degli studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”  
Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

# **Sintesi di nuove sonde paramagnetiche per applicazioni in Risonanza Magnetica per Immagini**

Candidato: Luca Gaino  
Relatore: Dr. Lorenzo Tei

Dicembre 2014



# INDICE

<b>1. Introduzione:</b>	pag. 5
1.1. Risonanza Magnetica per Immagini	pag. 6
1.1.1 Basi Teoriche	pag. 7
1.1.2 Meccanismo	pag. 8
1.1.3 Imaging Molecolare via MRI	pag. 10
1.2. Agenti di contrasto	pag. 11
1.2.1 Meccanismo d'azione	pag. 12
1.2.2 Cenni teorici	pag. 14
1.2.2.1 Determinazione di $q$	pag. 19
1.2.3 Strategie per la sintesi	pag. 21
1.2.3.1 Termodinamica della complessazione	pag. 22
1.2.4 Classi di agenti di contrasto	pag. 27
1.2.5 Stabilità e biodistribuzione	pag. 31
1.3. Analisi Rilassometriche	pag. 33
1.4 Sintesi DOTA-derivati	pag. 35
1.5 Scopo del lavoro	pag. 39
<b>2. DOTAMAP-derivati:</b>	pag. 42
2.1 Introduzione	pag. 43
2.2 Sintesi	pag. 45
2.3 Studio degli equilibri in soluzione	pag. 48
2.3.1 Costanti di protonazione	pag. 48
2.3.2 Cinetica di dissociazione	pag. 52
2.4 Analisi Rilassometriche	pag. 54
2.5 Conclusioni	pag. 57
2.6 Parte Sperimentale	pag. 58
2.6.1 Materiali e metodi	pag. 58
2.6.2 DOTAMAP-En	pag. 60

2.6.3 DOTAMAP-Cholic	pag. 63
<b>3. DOTMA-derivati</b>	pag. 69
3.1 Introduzione	pag. 70
3.2 Sintesi	pag. 73
3.3 Spettri ad alta risoluzione	pag. 79
3.4 Analisi Rilassometriche	pag. 86
3.5 Conclusioni	pag. 93
3.6 Parte Sperimentale	pag. 95
3.6.1 DO3MA	pag. 95
3.6.2 DO3MA-Ac	pag. 100
3.6.3 DO3MA-MA	pag. 102
3.6.4 HP-DO3MA	pag. 107
<b>4. HP-DO3A-derivati</b>	pag. 110
4.1 Introduzione	pag. 111
4.2 Sintesi	pag. 115
4.3 Analisi Rilassometriche	pag. 119
4.4 Conclusioni	pag. 127
4.5 Parte Sperimentale	pag. 128
4.5.1 MHP-DO3A	pag. 128
4.5.2 MHB-DO3A	pag. 130
4.5.3 HPMA-DO3A	pag. 133
<b>5. Bibliografia</b>	pag. 136

# **Capitolo 1:**

## **Introduzione**

## **1.1. Risonanza Magnetica per Immagini:**

La Risonanza Magnetica per Imaging (MRI) è una tecnica usata in campo medico per produrre immagini ad alta definizione dell'interno del corpo umano. È una delle tecniche diagnostiche più utilizzate perché non invasiva ed in grado di fornire informazioni fisiologiche anche prima dell'analisi clinica. Permette inoltre di evitare terapie radiochimiche, e scongiurare l'uso di radiazioni ionizzanti, come quelle utilizzate nella TAC.

L'MRI è basata sui principi della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ma la tecnica è conosciuta con il nome "imaging mediante risonanza magnetica" perché la parola "nucleare" aveva delle connotazioni negative.

La risonanza magnetica è stata scoperta in modo del tutto indipendente alla fine degli anni '40 da Bloch e Purcell, e nei decenni successivi si svilupparono le principali applicazioni della tecnica NMR sia in campo fisico che chimico. Nel 1971 avvenne un'importante scoperta che favorì lo sviluppo di tale metodo anche in ambito biomedico: Damadian dimostrò che differenti tipi di tessuti possiedono tempi di rilassamento diversi.<sup>1</sup> Due anni dopo, Lauterbur applicò gradienti di campi magnetici al fine di ottenere delle immagini; applicò i principi MRI a tubini NMR contenenti D<sub>2</sub>O immersi in becker contenenti H<sub>2</sub>O. L'applicazione della trasformata di Fourier (FT) alla tecnica NMR da parte di Ernst (1975) mise le basi per la moderna tecnica MRI.<sup>2</sup>

Negli anni successivi, con l'introduzione dell'Echo-Planar Imaging (EPI) si riuscirono ad ottenere immagini video (30 ms/immagine)<sup>3</sup>; l'acquisizione di una singola immagine, prima durava qualche minuto, mentre ora bastano pochi secondi.<sup>4</sup> Nel 1987 sono state registrate le prime immagini del ciclo cardiaco grazie all'EPI<sup>5</sup> e nello stesso periodo si applicò questa tecnica all'angiografia, riuscendo così a seguire il percorso del sangue attraverso arterie, vene e capillari.<sup>6</sup>

Le prime immagini di diverse zone del cervello sono state ottenute dallo sviluppo della tecnica EPI, nota come *functional MRI (fMRI)*, la quale ha permesso di scoprire e assegnare alle diverse regioni del cervello, le varie attività cerebrali, come il pensiero e il controllo motorio.<sup>7,8</sup>

Nel 2003 è stato assegnato il premio Nobel per la Medicina a Lauterbur e Mansfield per le loro scoperte sulla risonanza magnetica per immagini che hanno sancito la straordinaria importanza che questa tecnica ha raggiunto in ambito medico.

Attualmente l'MRI ha esordito come tecnica di imaging tomografico, in grado cioè di produrre un'immagine tridimensionale di una parte del corpo umano: da una semplice riproduzione di immagini tomografiche si è evoluta fino all'imaging volumetrico, capace cioè di dare una rappresentazione 3-D di una qualsiasi parte del corpo umano.

### 1.1.1. Basi Teoriche:

“L’oggetto” di interesse studiato con questa tecnica è il nucleo di idrogeno ( $^1\text{H}$ ). Esso può essere rappresentato come una sferetta carica che ruota attorno ad un asse e che possiede un momento magnetico intrinseco  $\mu$ , proprio come se fosse un piccolo magnete. Ciò vale anche per altri tipi di nuclei come  $^2\text{D}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , e molti altri nuclei con  $\mu \neq 0$ . Per l’indagine MRI si considera solo il protone, in quanto è un nucleo onnipresente nei tessuti umani, in quanto le molecole d’acqua che lo contengono compongono circa il 60 % del corpo umano.

I nuclei con queste caratteristiche immersi in un campo magnetico  $\mathbf{B}$ , orientano il proprio vettore  $\mu$  parallelamente a  $\mathbf{B}$ , compiendo un moto di precessione: tale azione è analoga a quella che la forza peso compie al moto della trottola mentre questa ruota su se stessa appoggiata su un piano orizzontale. Il moto di precessione (Fig.1) del vettore magnetizzazione  $\mathbf{M}$  avviene con una frequenza di precessione  $f_0$  (nota come frequenza di Larmor).

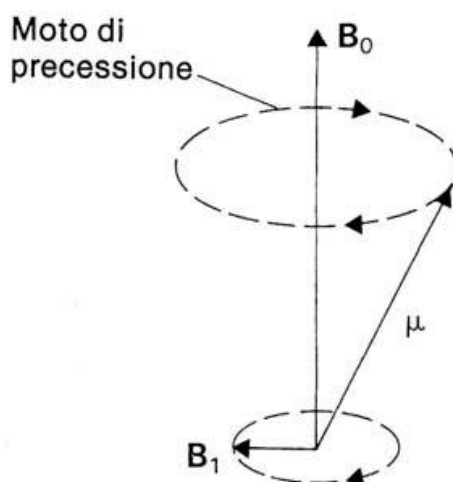


Fig. 1: Moto di precessione

Lo stato in cui  $\mu$  e  $\mathbf{B}_0$  sono allineati in modo parallelo è caratterizzato da un'energia  $E_{\uparrow\uparrow} = -\mu \cdot \mathbf{B}_0$  (le due frecce  $\uparrow\uparrow$  indicano che  $\mu$  e  $\mathbf{B}_0$  oltre ad essere paralleli hanno anche lo stesso verso), oppure da un'energia  $E_{\uparrow\downarrow} = \mathbf{B}_0 \cdot \mu$  (il nucleo nel campo magnetico  $\mathbf{B}_0$  può esistere solo in due stati,  $\uparrow\uparrow$  e  $\uparrow\downarrow$ ,  $\mu$  e  $\mathbf{B}_0$  adesso sono antiparalleli). L'introduzione di un campo magnetico variabile, con la stessa frequenza  $f_0$ , che interagisca con il protone darà luogo ad un fenomeno di risonanza e il campo a radiofrequenza potrà cedere al protone l'energia necessaria per fargli variare il moto di precessione. Il protone a questo punto può ritornare allo stato di partenza  $\uparrow\uparrow$  di energia  $E_{\uparrow\uparrow}$  emettendo un fotone di energia pari a quella che gli ha permesso di passare dallo stato  $\uparrow\uparrow$  a quello  $\uparrow\downarrow$ .

$$E_{\text{tot}} = h \cdot f = E_{\uparrow\downarrow} - E_{\uparrow\uparrow} = 2 \mu \cdot B_0$$

A cui corrisponde all'emissione di una radiazione elettromagnetica avente frequenza:

$$f = \frac{2 \cdot \mu \cdot B_0}{h} = 42.58 \cdot B_0 \text{ MHz}$$

Con il termine  $B_0$  si indica il campo che effettivamente il protone sente, dipendente quindi dall' "ambiente" microscopico che lo circonda, come ad esempio i piccoli campi magnetici prodotti dai nuclei vicini. L'intensità del segnale di ciascun protone risulterà quindi proporzionale alla densità di protoni che sono entrati in risonanza con la radiazione elettromagnetica incidente. In tal modo variando sia  $B_0$  e/o  $f_0$  (ovvero introducendo il concetto di gradiente) è possibile ricostruire una mappa anche tridimensionale della distribuzione dei protoni nel corpo umano.

### 1.1.2. Meccanismo

La tecnica MRI permette quindi di scansionare fette sottili del corpo umano, dando la possibilità di mostrare su uno schermo la diversa distribuzione dell'intensità dei segnali NMR. (Fig. 2)

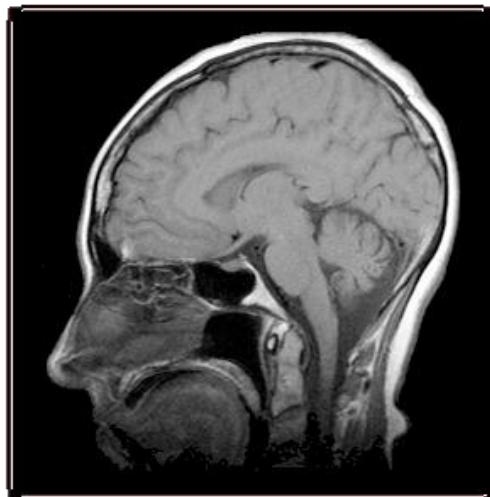


Fig. 2: Immagine MRI del cranio umano

L'intensità di ogni elemento dell'immagine (pixel) è proporzionale all'intensità del segnale NMR dell'elemento corrispondente. Così l'MRI permette di ottenere immagini di organi e tessuti che sono rappresentazioni topologiche di parametri NMR, in particolare della velocità di rilassamento longitudinale ( $1/T_1$ ) e trasversale ( $1/T_2$ ) dei protoni dell'acqua.



In pratica l'oggetto da sottoporre a scansione viene inserito in un campo magnetico esterno ed uniforme e la conseguente magnetizzazione macroscopica  $\mathbf{M}_z$  (cioè la somma vettoriale degli spin dei protoni) è allineata lungo la direzione del campo magnetico (convenzionalmente si considera l'asse  $z$ ). Dopo che uno o più impulsi a radiofrequenza sono applicati per perturbare gli spin dei protoni, il vettore magnetizzazione si annulla. La sua componente  $z$  tende, quindi, a "rilassarsi", cioè a tornare al suo valore di equilibrio, con un andamento esponenziale noto come rilassamento longitudinale o spin reticolo ( $T_1$ ). Nello stesso modo, il decadimento sul piano  $xy$  della magnetizzazione è noto come rilassamento trasversale o spin-spin ( $T_2$ ). I tessuti con valori di  $T_1$  brevi producono generalmente una maggiore intensità dell'immagine rispetto a quelli con valori più lunghi perché la magnetizzazione lungo l'asse  $z$  è maggiore nei tessuti che rilassano più velocemente. Viceversa a  $T_2$  brevi sono associati segnali a più bassa intensità perché si riduce la magnetizzazione trasversale.

Analizziamo ora un po' più nel dettaglio i due meccanismi di Rilassamento:

1.  $T_1$ : è il rilassamento longitudinale o spin-reticolo che conduce al ripristino della componente lungo  $z$  della magnetizzazione totale. Avviene tramite il trasferimento di energia dai protoni eccitati ai nuclei circostanti (il reticolo) ed è caratterizzato da una cinetica del primo ordine. Il sistema torna all'equilibrio dopo sette volte il  $T_1$ .  
L'intensità del segnale dipende dal valore di  $T_1$ , che è sufficientemente corto in soluzione non viscoso (siamo nel caso del rilassamento veloce) da far sì che l'intensità dei segnali sia proporzionale al numero di protoni che generano il segnale stesso.  
Per il nucleo  $^{13}\text{C}$  invece, i tempi di rilassamento sono più lunghi e quindi l'intensità dei picchi non è proporzionale al numero di atomi di carbonio associati al segnale. In generale, il  $T_1$  dipende molto dall'intorno chimico del nucleo d'interesse.
2.  $T_2$ : è il rilassamento trasversale o spin-spin che causa il ripristino del valore iniziale (cioè zero) della componente lungo il piano  $xy$  della magnetizzazione totale. Ciò avviene attraverso una distribuzione adiabatica dell'energia tra i nuclei del sistema spin-eccitato, si perde in pratica la coerenza di fase. Dato che questo è un processo adiabatico, l'energia totale del sistema non cambia. La larghezza dei picchi ottenuti è proporzionale al valore di  $T_2$  ( $T_2$  corto  $\rightarrow$  segnale largo). L'introduzione di un campo magnetico non omogeneo fa perdere quindi la coerenza di fase, accorciando il  $T_2$  e allargando i picchi.

L'MRI è quindi fondamentalmente un esperimento  $^1\text{H}$  NMR che permette di visualizzare le molecole d'acqua del corpo umano. Esso si basa sulla generazione di immagini ottenute attraverso la localizzazione spaziale dei protoni dell'acqua presente nel nostro corpo. Rispetto però ad un tradizionale esperimento NMR, l'informazione è ottenuta grazie all'applicazione di tre gradienti di

campi magnetici perpendicolari tra loro: uno per selezionare la fetta di corpo da analizzare, gli altri due per determinare le coordinate spaziali. Operando in questo modo, si ottengono delle unità di volume identificate in modo univoco.

### **1.1.3. Imaging Molecolare *via* MRI**

L'imaging molecolare è una delle aree più emozionanti nel campo della ricerca scientifica.

A differenza della concezione classica della medicina, rivolta prevalentemente alla cura della malattia una volta che è conclamata, la medicina moderna sarà "molecolare", ovvero rivolta alla comprensione e al trattamento delle alterazioni molecolari che poi causeranno le malattie. Questa nuova visione richiede perciò metodi nuovi d'indagine, strumenti innovativi per la diagnosi e la terapia delle malattie su base molecolare. Sono necessari quindi nuovi metodi non invasivi che permettano di ottenere allo stesso tempo sia informazioni morfologiche che funzionali per riuscire a determinare precocemente variazioni molecolari. Le tecniche di imaging risultano quindi perfette per questo tipo di scopo; si differenziano da quelle convenzionali in quanto sono rivolte all'esame di eventi o processi a livello molecolare come ad esempio l'esame dell'espressione di specifici geni endogeni e dei processi intracellulari.

Per ottenere ciò, però, sono necessari dei marcatori, ovvero dei traccianti dei flussi metabolici, dei processi biochimici, dell'espressione di enzimi e recettori intra ed extra cellulari, che siano costruiti in modo tale sia per riconoscere selettivamente un particolare isotopo, sia per poter superare le barriere chimico/fisiche vascolari per poter raggiungere il target.

Inoltre sono necessari strumenti ad alta risoluzione spaziale e temporale per la rivelazione di segnali generati da queste molecole e per poter studiare i processi dinamici all'interno di piccoli volumi.

Nel panorama dell'imaging molecolare sono a disposizione varie tecniche, ognuna delle quali con dei vantaggi e svantaggi: la risonanza magnetica, ad esempio, pur avendo un'eccellente risoluzione spaziale ha una scarsa sensibilità intrinseca, circa  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  mol/L, che confrontata con le altre tecniche risulta fortemente limitante. Per aggirare questo problema si devono introdurre agenti di contrasto più performanti, che garantiscono oltre all'ottima risoluzione spaziale anche un'elevata sensibilità.

Tecniche di medicina nucleare quali Single Photon Emission Computed (SPECT) e la Positron Emission Tomography (PET) insieme all'imaging ottico (OI) sono le altre tecniche utilizzate in procedure di imaging molecolare. Rispetto all'MRI esse hanno un'ottima sensibilità ma ridotta risoluzione sia spaziale che temporale. Inoltre SPECT e PET prevedono l'utilizzo di agenti radioattivi, anche se in quantità bassissime (picomolare), per cui è importante valutare gli aspetti di sicurezza

nella somministrazione del radioisotopo ai pazienti. Infine l'imaging ottico ha lo svantaggio dello scarso grado di penetrazione, specialmente se si lavora nelle lunghezze d'onda del visibile.

## **1.2. Agenti di contrasto:**

Come già sottolineato nei paragrafi precedenti, l'immagine ottenuta tramite la tecnica MRI è strettamente legata a parametri NMR quali il  $T_1$ , il  $T_2$  e concentrazione del nucleo osservato. Poiché tra i diversi tessuti non c'è grande differenza nella densità nucleare (poiché la concentrazione dei protoni varia poco all'interno del corpo umano), le immagini convenzionali sono essenzialmente basate sul contrasto ottenuto sfruttando le differenze nei tempi di rilassamento dei tessuti monitorati. Un agente di contrasto (CA) è perciò una sostanza in grado di abbassare il  $T_1$  o il  $T_2$  dei protoni dell'acqua nei tessuti in cui si distribuisce e quindi discriminare un tessuto da un altro e di permettere di acquisire più rapidamente immagini con un maggior potenziale diagnostico.

Il primo agente di contrasto è stato un sale paramagnetico (nitrato ferrico) proposto da Bloch nel 1946 che migliorava la velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua.<sup>9</sup> Successivamente Bloembergen e Solomon<sup>10-12</sup> svilupparono la teoria che descrive la correlazione tra la velocità di rilassamento nucleare e la presenza di una sostanza paramagnetica, mentre Eisinger, Shulman e Blumberg<sup>13</sup> dimostrarono che quando uno ione di un metallo paramagnetico è legato ad una macromolecola (nel loro caso era il DNA), aumenta la velocità di rilassamento protonico tramite l'allungamento del tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$ . Dopo i primi esperimenti MR *in vitro*, Lauterbur riuscì a fare la prima scansione del corpo umano nel 1977.<sup>14-16</sup> Dopo questo risultato, insieme a Mendoca-Dias e Rudin dimostrò<sup>17</sup> che gli agenti di contrasto paramagnetici consentono un'ulteriore discriminazione dei tessuti attraverso il miglioramento della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua. Nei loro esperimenti vennero utilizzati sali di manganese (II), un catione che si localizza preferibilmente nel normale tessuto miocardico invece che nelle regioni infartuate. Questa osservazione fu possibile grazie allo studio su cani con un'arteria coronaria occlusa in cui il miocardio normale si distingueva dalla zona infartuata in quanto dava un segnale più intenso sull'immagine MRI grazie all'accumulo di ioni  $Mn^{2+}$ .

I loro studi furono successivamente confermati da Brady.<sup>18,19</sup>

Si può quindi capire l'importanza dei complessi contenenti ioni di metalli di transizione o lantanoidei paramagnetici, in quanto possono diminuire il tempo di rilassamento dei nuclei vicini grazie ad interazioni dipolari.

Attualmente i CAs disponibili possono essere classificati secondo le loro diverse caratteristiche, quali la presenza e natura del loro centro metallico, le loro proprietà magnetiche, il loro effetto sull'immagine, la loro struttura chimica o la loro biodistribuzione.<sup>18,19</sup>

Il primo studio MRI sull'uomo utilizzando un agente paramagnetico è stato effettuato da Young, per migliorare la visualizzazione del tratto gastrointestinale<sup>20</sup>, utilizzando come CA il cloruro ferrico, somministrato per via orale.

Il potenziale diagnostico degli agenti paramagnetici è stato per la prima volta dimostrato nei pazienti da Carr<sup>21</sup> utilizzando Gd(III) dietilentriamminopentaacetato  $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$  in pazienti con tumori cerebrali, riuscendo così a fornire una migliore visione della regione celebrale lesionata.

La composizione chimica dei CAs è molto variabile. Essi possono essere chelati mononucleari o polinucleari paramagnetici; metalloporfirine; sistemi polimerici o macromolecolari (legati in modo covalente e/o non covalente); particelle superparamagnetiche (ossidi di ferro ad esempio); o polimeri diamagnetici; sonde diamagnetiche iperpolarizzate (gas e aerosol), e composti marcati con  $^{13}\text{C}$  o ioni (ad esempio  $\text{Li}^+$ ).

Attualmente, circa il 40-50% degli esami MRI fanno uso di mezzi di contrasto<sup>22</sup> ma tale percentuale dovrebbe aumentare ulteriormente in seguito allo sviluppo di mezzi di contrasto più efficaci e precisi di quelli attualmente disponibili in commercio.

### 1.2.1. Meccanismo d'azione

Il rilassamento dei segnali della risonanza magnetica deriva generalmente dalla presenza di campi magnetici locali fluttuanti. Se consideriamo una soluzione di acqua pura, il meccanismo più importante con cui tali campi sono prodotti è l'interazione dipolo-dipolo tra due protoni vicini. Ogni protone ha un momento di dipolo magnetico che produce un piccolo campo magnetico locale influenzando gli atomi vicini. Come risultato del moto browniano delle molecole di acqua, l'intensità del campo oscilla casualmente causando il rilassamento. I tempi di rilassamento  $T_1$  e  $T_2$  dipendono non solo dall'entità di questi campi, ma anche da una scala temporale che è espressa in termini di tempo di correlazione ( $\tau_c$ ). La variazione di  $\tau_c$  può causare differenze tra  $T_1$  e  $T_2$ , per esempio, in condizioni in cui viene ridotta la mobilità media dell'acqua (come avviene nei tessuti). La presenza di elettroni spaiati in uno ione paramagnetico è in grado di ridurre notevolmente i tempi di rilassamento degli spin nucleari capaci di interagire con lo spin elettronico e per questo motivo lo studio degli agenti di contrasto si è sviluppato principalmente verso i complessi di metalli paramagnetici.

Gli ioni paramagnetici hanno momenti di dipolo magnetico circa 1000 volte superiori a quello dei protoni. Essi producono dei grandi campi locali che possono aumentare le velocità di rilassamento di protoni dell'acqua nel momento in cui questi si trovano in prossimità degli ioni. I protoni più vicini sono quelli delle molecole d'acqua che coordinano lo ione paramagnetico in soluzione acquosa. Vi è anche un contributo *sfera esterna* al rilassamento causato da molecole di acqua oltre il primo guscio di idratazione. In molti esempi, questo può contribuire per circa il 10% della velocità di rilassamento totale,<sup>23</sup> ma in alcuni casi, come ad esempio quando lo scambio dell'acqua legata è molto lento o quando il complesso non lega direttamente una molecola d'acqua, il contributo della sfera esterna può predominare

In generale il segnale MRI tende ad aumentare con l'aumento di  $1 / T_1$ , mentre diminuisce all'aumentare di  $1 / T_2$  come conseguenza della dipendenza dei vettori di magnetizzazione longitudinale ( $M_z$ ) e trasversale ( $M_{xy}$ ) rispetto al tempo ( $t$ ). Dopo un impulso di  $90^\circ$  il vettore magnetizzazione totale passa dalla posizione parallela a quella perpendicolare rispetto al campo magnetico esterno, l'equazione che descrive il recupero della componente lungo l'asse z da 0 al valore massimo  $M_z^0$  è:

$$M_z = M_z^0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (1)$$

Analogamente, per il decadimento della componente lungo z, la magnetizzazione  $M_{xy}^0$  passa dal suo valore massimo a zero:

$$M_{xy} = M_{xy}^0 e^{-t/T_2} \quad (2)$$

La scala dei tempi del  $T_1$  è dell'ordine dei secondi, mentre per il  $T_2$  è dalle decine alle centinaia di millisecondi.

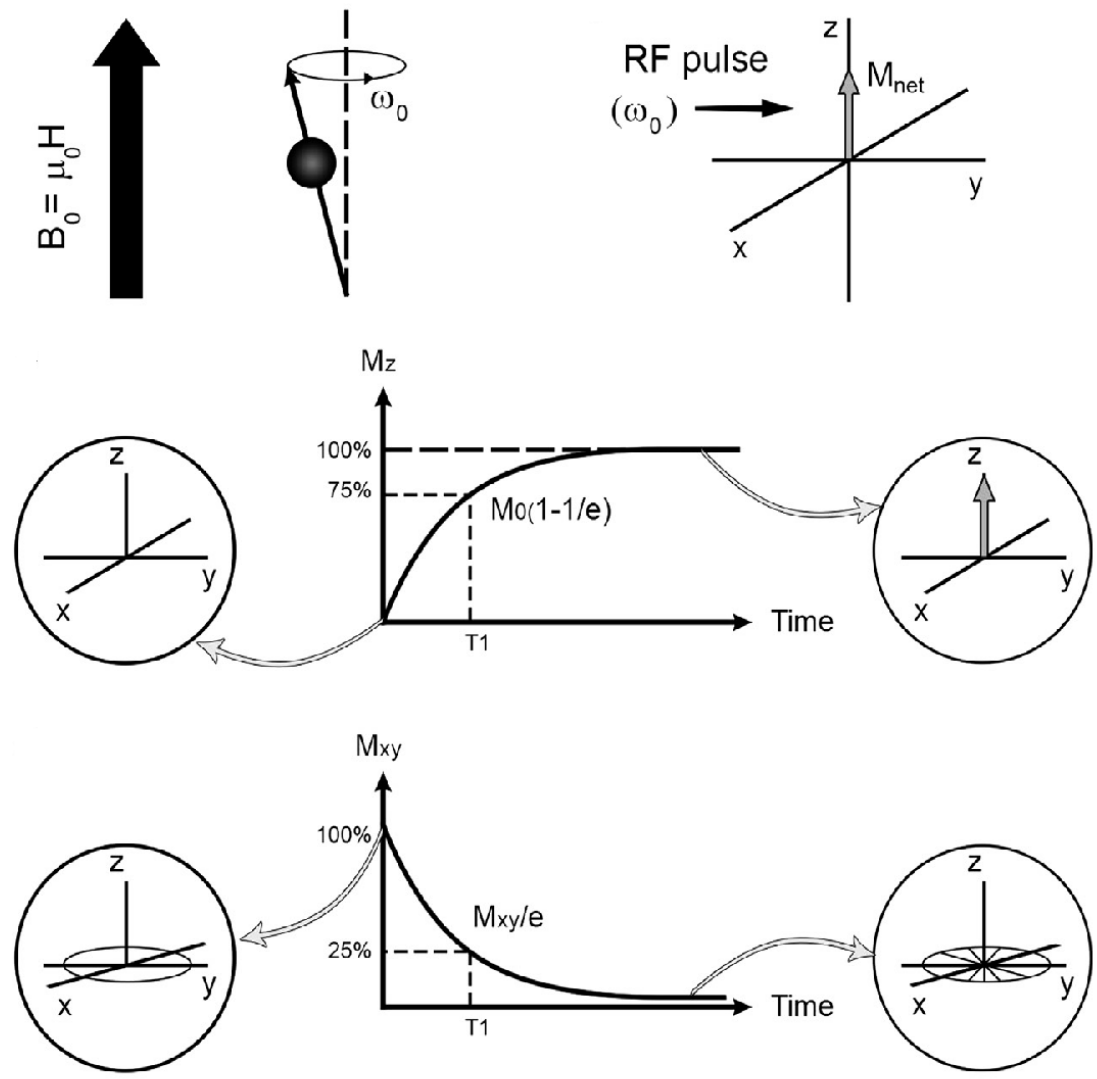


Fig. 3: Effetto dell'impulso della radiofrequenza sulla magnetizzazione

Le sequenze di impulsi che mettono in evidenza i cambiamenti di  $1/T_1$  sono indicate come  $T_1$  pesate, e analogamente avremo gli impulsi  $T_2$  pesati. I fenomeni presenti sono in ogni caso molto complessi e dipendono da vari fattori, come ad esempio dalla natura dell'agente di contrasto (se è in soluzione o in sospensione), dalla sua distribuzione e dalla concentrazione presente nella regione d'interesse e dalla forza del campo magnetico applicato. È quindi non propriamente corretto parlare di agenti  $T_1$  o  $T_2$ ,<sup>24</sup> anche se è possibile parlare di “effetti di contrasto positivo” (aumento del segnale) e “effetti di contrasto negativi” (diminuzione del segnale).

### 1.2.2. Cenni teorici

L'efficienza di un mezzo di contrasto viene comunemente valutata in termini di rilassività longitudinale ( $r_1$ ) e trasversale ( $r_2$ ), definita come velocità di rilassamento dei nuclei protonici

dell'acqua contenente ioni metallici in concentrazione mM (l'unità di misura risulta quindi essere  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

I contributi diamagnetico e paramagnetico alla velocità di rilassamento osservata sono additivi e il meccanismo di rilassamento paramagnetico, quando è presente, contribuisce in modo dominante:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad (i=1,2) \quad (3)$$

Dove:

$1/T_{i,obs} \rightarrow$  è la velocità di rilassamento del solvente osservata in presenza di specie paramagnetiche;

$1/T_{i,d} \rightarrow$  è la velocità di rilassamento del solvente in assenza di specie paramagnetiche;

$1/T_{i,p} \rightarrow$  è il contributo addizionale della specie paramagnetica.

In assenza di interazione tra il solvente e il soluto, la velocità di rilassamento dipende linearmente dalla concentrazione della specie paramagnetica  $[M]$  (espressa in mM), quindi l'equazione precedente risulterà essere

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[M] \quad (4)$$

La rilassività risulterà quindi essere:

$$r_i = \frac{1/T_{i,obs} - 1/T_{i,d}}{[M]} \quad (5)$$

Di solito la rilassività si riferisce al valore misurato ad una frequenza di 20 MHz (0,47 T) e alla temperatura di 25°C o 37°C (è spesso consigliato di riportare il valore a 37°C perché è una temperatura più vicina a quella del corpo umano, ma i chimici a volte preferiscono la rilassività alla temperatura ambiente, ovvero 25 °C).

La rilassività risulta essere la somma dei contributi dei rilassamenti delle molecole d'acqua della sfera di coordinazione interna del complesso ( $r_i^{IS}$ ) e della sfera esterna ( $r_i^{OS}$ ) e più il contributo diamagnetico.

$$\frac{1}{T_i^{obs}} = \frac{1}{T_i^{IS}} + \frac{1}{T_i^{OS}} + \frac{1}{T_i^d} \quad (6)$$

Di seguito è riportato uno schema dove si evidenziano i principali parametri che influenzano la rilassività nel caso in cui ci sia una molecola d'acqua coordinata allo ione paramagnetico Gd(III) in scambio con le molecole d'acqua della sfera interna, con una velocità di scambio  $k = 1 / \tau_M$

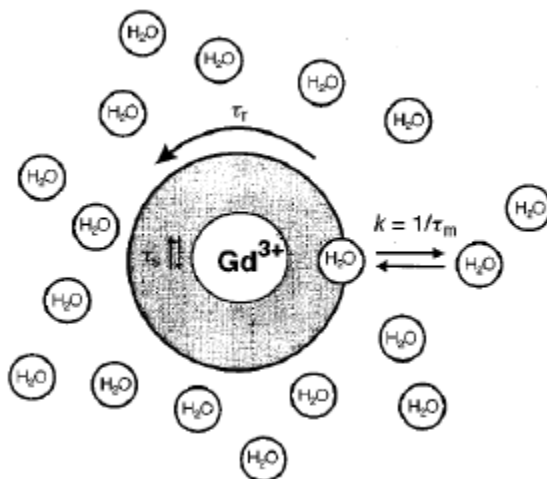


Fig.4: Schema sintetico dei meccanismi di rilassamento e dei principali parametri di una soluzione acquosa contenente un complesso dello ione Gd(III)  
[Aime, S. et al.; Chem. Soc. Rev. 1998, 27, 19-29]

Il contributo della sfera interna deriva dallo scambio della molecola d'acqua legata direttamente allo ione metallico con le molecole d'acqua del bulk esterno, secondo l'equazione di Solomon-Bloembergen:<sup>26-28</sup>

$$\frac{1}{T_i^{IS}} = [M] \frac{q}{55.6} \frac{1}{T_i^M + \tau_m} \quad (7)$$

Dove [M] è la concentrazione dello ione metallico paramagnetico, q è il numero di idratazione, ovvero il numero delle molecole d'acqua direttamente legate al metallo, 55,6 è la concentrazione dell'acqua,  $T_i^M$  è il tempo di rilassamento dei protoni dell'acqua della sfera interna, ed è controllato dal tempo di rotazione molecolare ( $\tau_R$ ). Quindi, in generale a campi minori di 3 T, più lenta è la rotazione molecolare, maggiore è la velocità di rilassamento e quindi la rilassività. Infine  $\tau_M$  è il tempo di scambio tra la molecola d'acqua legata allo ione e quelle nella sfera esterne di coordinazione. La Figura 5 riportata di seguito, mostra i diversi parametri che bisogna ottimizzare per avere un'alta rilassività:

- il numero di molecole di acqua direttamente legate allo ione metallico;



- il tempo medio di permanenza della molecola d'acqua nella prima sfera di coordinazione ( $\tau_m$ );
- il tempo di correlazione rotazionale della molecola ( $\tau_R$ )<sup>29</sup>.

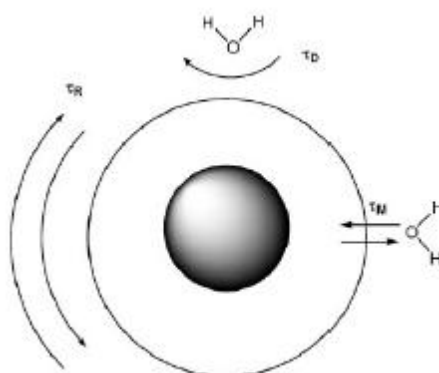
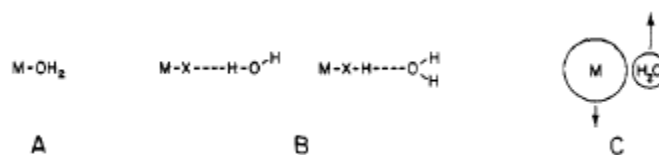


Fig. 5: Moti delle molecole d'acqua della sfera interna di coordinazione

E' utile inoltre classificare i contributi per la rilassività dei protoni dell'acqua rispetto a tre distinti tipi di interazioni, come indicato nello schema di seguito:



Nel caso A, la molecola d'acqua si lega alla sfera di coordinazione primaria del metallo e scambia con il bulk del solvente. Il termine “rilassamento della sfera interna” è applicato a questo tipo di meccanismo. Il caso B si verifica quando vi sono dei legami ad idrogeno tra la seconda sfera di coordinazione e il complesso, e se la durata di questa interazione è più lunga rispetto al tempo richiesto dalla molecola d'acqua e dal complesso per diffondere verso il bulk esterno. Tuttavia a causa delle incomplete conoscenze sulla seconda sfera di coordinazione, spesso non si distingue tra questo meccanismo e quello del caso C (causato dalla traslazione della molecola d'acqua oltre il complesso), riferendosi semplicemente ad una “sfera esterna di rilassamento”.

I mezzi di contrasto disponibili in commercio hanno una sola molecola d'acqua legata ( $q = 1$  dato che sono leganti ottadentati che servono a complessare stabilmente le ione  $Gd^{3+}$  ed a prevenire il rilascio dello ione metallico all'interno del corpo. Il numero di coordinazione del Gd (III) è nove, per cui rimane solo una posizione libera che è occupata dalla molecola d'acqua.

Tuttavia, ci sono diversi esempi recenti di agenti di contrasto stabili, contenenti due molecole d'acqua legate al  $Gd^{3+}$ , come ad esempio il legante noto come AAZTA (Acido 6-metil-6-amminoperidro-1,4-diazepin tetracarbossilico)<sup>30</sup>. Questo è un campo interessante e molto studiato perché l'aumento delle

molecole d'acqua coordinate al metallo, porta ad un aumento della rilassività del complesso essendo essa direttamente proporzionale a  $q$ , come si vede nell'equazione (7).

Come detto precedentemente, il  $T_1^M$  è governato dal riorientamento molecolare ( $\tau_R$ ), ma dipende anche dal tempo di residenza delle molecole d'acqua legate ( $\tau_M$ ) e dal rilassamento paramagnetico dello spin elettronico  $T_{1e}$  e  $T_{2e}$ . Non è facile studiare questi due fattori, ma è noto che entrambi i tempi dipendano dalla frequenza del campo magnetico esterno, e di solito, per i campi usati (0,5– 1,5 T),  $T_{1e}$  e  $T_{2e}$  non danno un contributo significativo. Invece il contributo di  $\tau_m$  diventa importante a valori di  $\tau_R$  più elevati rispetto a quelli che si hanno per molecole piccole. Gli agenti di contrasto sono in grado di provocare rilassività anche quando non ci sono molecole d'acqua nella sfera di coordinazione interna ( $q = 0$ ): la rilassività dovrà quindi provenire dai contributi dalla sfera esterna.<sup>31</sup> Questi apporti possono assumere due forme:

- Rilassamento della seconda sfera di idratazione, dove gli idrogeni delle molecole d'acqua sono legati agli atomi di ossigeno del carbossilato e il rilassamento avviene tramite meccanismo dipolare;
- Rilassamento della sfera esterna che sorge a causa della diffusione delle molecole d'acqua nella regione vicino al complesso del Gd(III);<sup>32</sup>

Tuttavia come abbiamo precedentemente detto, non è sempre possibile separare questi due meccanismi, ma si parla semplicemente di sfera esterna di coordinazione. E' importante anche notare che questo modello è solo un'approssimazione per i leganti poliamminocarbossilici, in quanto non tiene conto dell'interazione tra complesso e acqua, che per questi agenti di contrasto è molto importante.

E' noto inoltre che, nella seconda sfera di coordinazione, si trovano dalle dodici alle quindici molecole d'acqua con gli atomi di ossigeno approssimativamente distanti 4 Å dal centro metallico. Le molecole d'acqua della prima sfera di coordinazione esercitano un effetto di orientamento sulle molecole di seconda sfera, facendo sì che queste abbiano una parziale carica positiva maggiore rispetto alla sola acqua.

In generale, il contributo alla rilassività di sfera esterna è importante solo in presenza di gruppi in grado di strutturare un elevato numero di molecole di acqua intorno al complesso (polioli, carboidrati, fosfati) così che, quando si studiano nuovi agenti di contrasto, questo effetto è generalmente trascurato. Inoltre l'interpretazione quantitativa dei dati ottenuti da queste indagini (in termini di numero di molecole d'acqua della seconda sfera, il loro tempo di residenza, la distanza dal centro

metallico e la costante di equilibrio dell'associazione con il metallo chelato) è stata data solo nell'ultimo decennio. La velocità di rilassamento trasversale dell' $^{17}\text{O}$  dell'acqua,  $R_2$ , è determinata attraverso l'interazione tra il gadolinio e l'ossigeno dell'acqua e fornisce informazioni sull'idratazione del complesso.

L'interazione non è influenzata dalla riorientazione delle molecole del complesso ma dipende dal numero di idratazione  $q$ , dai parametri di rilassamento elettronico, dalla velocità di scambio delle molecole d'acqua, dal pH e dalla costante di accoppiamento scalare.<sup>33-35</sup>

La dipendenza dal pH di  $R_2$  dell' $^{17}\text{O}$  deriva sia dagli equilibri di idratazione, sia dalla velocità di scambio delle molecole d'acqua ( $k_{\text{ex}}$ ). Per poter discriminare tra queste due vie, è utile studiare la dipendenza di  $R_2$  dell' $^{17}\text{O}$  in funzione della temperatura ( $T$ ). Vale la pena sottolineare il fatto che questa analisi rappresenta solo una prima approssimazione che permette la stima dell'ordine di grandezza del contributo delle molecole di solvente presenti nella seconda sfera di coordinazione del complesso.

### 1.2.2.1 Determinazione di $q$

I mezzi di contrasto funzionano di norma in ambiente acquoso. È quindi importante studiare la struttura in soluzione per comprendere le proprietà biofisiche della molecola. Determinare il numero di idratazione  $q$  di un complesso di Gd(III) è fondamentale per capire le sue proprietà come agente di contrasto. Dato che il metodo dell' $^{17}\text{O}$  non fornisce direttamente informazioni sul numero delle molecole d'acqua, ma fornisce vari parametri per stimare il numero di molecole d'acqua coordinate, si possono sfruttare altre tecniche.

Un metodo, ad esempio, per determinare  $q$  consiste nello studiare i tempi di emivita della luminescenza di complessi di Eu(III) o Tb(III). Horrocks and Sudnick<sup>36</sup> mostrarono che la luminescenza di Tb(III) o Eu(III) è migliore se misurata in  $\text{H}_2\text{O}$  che in  $\text{D}_2\text{O}$ , questo perché l'oscillatore O-H dà luogo ad un coupling migliore che l'oscillatore O-D. Se i tempi di semivita della luminescenza sono misurati in  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , il rapporto tra il decadimento della luminescenza è costante in entrambi i solventi ed è proporzionale a  $q$ . Parker estese questo approccio applicando una correzione, che considera i contributi degli oscillatori della diffusione delle molecole d'acqua e di altri protoni scambiabili.<sup>37</sup>

Con questo metodo si sviluppò l'uso di complessi di Tb(III) o Eu(III) per determinare  $q$ ; questi ioni fiancheggiano il gadolinio nella tavola periodica e hanno raggi simili, quindi il risultato di questo approccio è un'ottima indicazione del numero di idratazione del gadolinio.

Un ulteriore vantaggio di questo metodo è la scarsa quantità (concentrazioni micromolari) di materiale richiesto. Di seguito (Fig. 6) è riportata una tabella con i numeri di idratazione di alcuni complessi di Eu(III), Tb(III), Dy(III), con il relativo metodo di analisi.<sup>38-50</sup>

ligand	$q$	method
DTPA	$1.2 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
DTPA	$1.3 \pm 0.2$	<sup>17</sup> O Dy.I.S.
DTPA	$1.2 \pm 0.2$	Eu(III) luminescence
DTPA	1.1	Tb(III) luminescence
DTPA	$1.08 \pm 0.11$	Eu(III) luminescence
DTPA	$1.10 \pm 0.11$	Tb(III) luminescence
BOPTA	$1.2 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
DTPA-BPA	$1.0 \pm 0.2$	<sup>17</sup> O Dy.I.S.
DTPA-BPA	$1.0 \pm 0.2$	Eu(III) luminescence
15-DTPA-en	$1.2 \pm 0.2$	<sup>17</sup> O Dy.I.S.
15-DTPA-en	$2.3 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
30-DTPA-enDTPA-en	$0.8 \pm 0.2$	<sup>17</sup> O Dy.I.S.
30-DTPA-enDTPA-en	$1.2 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
DOTA	$1.0 \pm 0.3$	<sup>17</sup> O LIS
DOTA	$1.2 \pm 0.4$	Eu(III) luminescence
DOTA	1.2	Eu(III) luminescence
DOTA	$1.0 \pm 0.1$	Tb(III) luminescence
DOTA	$1.2 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
DOTA	$0.9 \pm 0.5$	Tb(III) luminescence
DOTA	$0.98 \pm 0.10$	Eu(III) luminescence
DOTA	$1.05 \pm 0.11$	Tb(III) luminescence
TCE-DOTA	$1.06 \pm 0.11$	Eu(III) luminescence
TCE-DOTA	$0.60 \pm 0.06$	Tb(III) luminescence
HP-DO3A	$1.3 \pm 0.1$	Tb(III) luminescence
DO3A	$1.9 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
DO3A	$1.8 \pm 0.2$	Tb(III) luminescence
DO3A	$1.80 \pm 0.18$	Eu(III) luminescence
DOTP	$0.4 \pm 0.5$	Eu(III) luminescence
F-DOPTME	0	<sup>17</sup> O Dy.I.S.
DOTBzP	0	Eu(III) luminescence
DOTBzP	0	Tb(III) luminescence
DOTMP	0.01	Eu(III) luminescence
DOTMP	0.05	Tb(III) luminescence
DOTMP-MBBzA	$0.58 \pm 0.06$	Eu(III) luminescence
DOTMP-MBBzA	0	Tb(III) luminescence
TETA	0.6	Eu(III) luminescence
TTHA	0.2	Tb(III) luminescence
TTHA	$0.2 \pm 0.2$	<sup>17</sup> O Dy.I.S.

Fig 6: Numero delle molecole d'acqua per vari complessi

Un altro metodo per calcolare  $q$ , che sfrutta i complessi di Dy(III), è stato proposto da Alpoim.<sup>51</sup> Egli dimostra che lo shift indotto dal Dy(III) al segnale dell' <sup>17</sup>O NMR delle molecole d'acqua coordinate allo ione paramagnetico è proporzionale a  $q$ . L'unico svantaggio del metodo è quello di essere poco sensibile.

Qualsiasi differenza chimica o comportamento strutturale lungo la serie dei complessi con i Ln(III) di un particolare legante, può di solito essere descritta dalla diminuzione del raggio ionico lungo la serie dei lantanidi.<sup>52</sup> Con il cambio graduale del raggio ionico dello ione metallico non è raro per i leganti formare complessi isostrutturali lungo la serie.

### 1.2.3. Strategie per la sintesi

Come abbiamo detto precedentemente, per ottenere un agente di contrasto (CA) il più performante possibile bisogna ottimizzare tutti i parametri che influiscono sulla rilassività.

Considerando i complessi di ioni paramagnetici come Mn(II) e Gd(III) come prima opzione sarebbe preferibile avere il maggior numero di molecole d'acqua legate direttamente al metallo, così da aumentare  $q$  e quindi la rilassività. È quindi importante durante la fase di progettazione, garantire che l'acqua abbia accesso diretto allo ione paramagnetico, perché altrimenti il rilassamento sarebbe solo di sfera esterna e quindi poco efficiente. Tuttavia, sono state evidenziate<sup>53</sup> delle criticità riguardo la stabilità (ma anche la velocità di scambio dell'acqua) quando aumentano i siti di coordinazioni occupati dalle molecole d'acqua invece che da un atomo donatore di un legante multidentato.

Oltre alle caratteristiche chimico-fisiche del metallo e dal numero di molecole d'acqua ad esso legate, la rilassività dipende da diversi parametri come l'intensità del campo magnetico, i tempi di rilassamento  $T_i^M$  dei protoni dell'acqua legata, il tempo di riorientazione molecolare ( $\tau_R$ ) e la velocità dello scambio delle molecole d'acqua coordinate ( $k_{ex} = 1 / \tau_M$ ).

Nel corso degli anni sono state studiate diverse vie per allungare  $\tau_R$  al fine di ottenere una velocità di rilassamento più veloce e quindi una rilassività superiore. Un approccio comune è quello di legare covalentemente il complesso ad una macromolecola al fine di rallentarne la rotazione ad esempio un dendrimero, un polisaccaride, una proteina. Oppure si può sfruttare un'interazione non covalente come gli effetti dipolo – dipolo,  $\pi - \pi$ , legami ad idrogeno, forze di Van der Waals e effetti idrofobici. Interazioni non covalenti di questo tipo possono portare a formare addotti supramolecolari (host-guest) con costanti di formazione molto elevate, come ad esempio nel caso dell'interazione dei complessi recanti porzioni idrofobiche (lunghe catene alifatiche, gruppi aromatici, residui steroidei) con l'albumina di siero umano (la proteina più abbondante presente nel plasma).

La possibilità di modulare la velocità di scambio  $k_{ex}$  delle molecole d'acqua legate ad un mezzo di contrasto può sembrare difficile, ma recentemente si sono fatti passi in avanti per comprendere meglio i meccanismi di scambio e quindi il controllo di questo parametro. La carica totale del complesso ha un grande effetto sul  $\tau_M$ , l'acqua scambia più lentamente in sistemi carichi positivamente rispetto a quelli neutri e questi ultimi scambiano più lentamente di quelli carichi negativamente. Il  $\tau_M$  dipende anche dall'estensione della seconda sfera di idratazione, che è determinata dall'idrofobicità del complesso e dall'equilibrio conformazionale che assume il legante, dove i diversi valori di  $\tau_m$  corrispondono ai diversi isomeri conformazionali. Si possono modificare selettivamente i leganti in modo da favorire una forma rispetto l'altra.<sup>54,55</sup>

Anche la natura del controione può influenzare la velocità di scambio dell'acqua,<sup>54</sup> soprattutto nel caso di complessi carichi positivamente. Come la densità di carica dello ione metallico il controione

determina la struttura della sfera esterna di idratazione: più grande è la carica dello ione e la sua densità di carica, più forte è l'attrazione elettrostatica, rompendo i legami ad idrogeno relativamente deboli e creando una seconda sfera di coordinazione abbastanza definita dove lo scambio delle molecole d'acqua è abbastanza lento. Dall'altro lato ioni con una densità di carica minore (ad esempio ioni un con raggio ionico elevato), non riescono a perturbare in modo significativo i legami ad idrogeno dell'acqua, permettendo uno scambio più veloce dell'acqua con il centro metallico. Una scala approssimativa per ottenere una migliore rilassività è  $I^- > Br^- > AcO^- > CF_3COO^- > \text{triflati} > SO_4^{2-} > Cl^-$  (vedi figura 7)

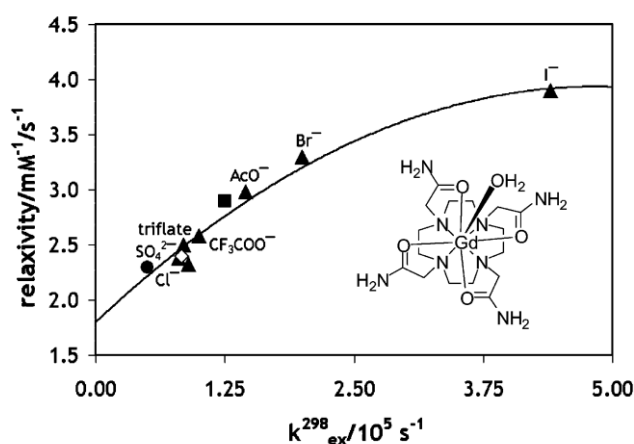


Fig. 7: Variazione della rilassività dei protoni dell'acqua (298 K, 20 MHz) con una serie di controioni. [From Parker, D. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 156]

### 1.2.3.1 Termodinamica della complessazione

Ci sono vari aspetti da prendere in considerazione per la sintesi di un legante al fine di ottenere un complesso termodinamicamente stabile. Tale stabilità è resa necessaria perché il complesso può entrare in competizione con fosfati, proteine e tutte le altre biomolecole con atomi donatori, ed inoltre cationi endogeni possono scambiare lo ione complessato causando la fuoriuscita dello ione metallico tossico. Tali problemi saranno analizzati più a fondo nel paragrafo successivo (*vedi 1.2.5 Stabilità e biodistribuzione*).

Bisogna quindi tenere conto dell'influenza delle braccia esterne, dell'effetto chelato e quello del macrociclo e che influenzano l'energia del sistema.

L'effetto chelato si riferisce alla coordinazione ad un centro metallico di due o più atomi donatori appartenenti allo stesso legante e ha causato notevoli controversie nel passato.<sup>56</sup> Da un lato vi è il modello proposto da Schwarzenbach, che ha suggerito che l'effetto potrebbe essere inteso in termini di volume delimitato, in cui il secondo atomo donatore del legante, potrebbe "muoversi" una volta

che il primo atomo donatore è stato coordinato. Dall'altra parte vi è Adamson<sup>57</sup> che ha definito l'effetto chelato come lo stato standard di riferimento, che scompare una volta che la costante di formazione è espressa in termini di frazione molare. In realtà, entrambi gli approcci dicono essenzialmente la stessa cosa, dal momento che nel metodo di Schwarzenbach l'entropia traslazionale del secondo legante monodentato è vicina a zero, a causa del movimento del complesso in un volume limitato, mentre nella proposta di Adamson l'entropia traslazionale è portata a zero una volta che i reagenti hanno riempito completamente lo spazio dello stato standard di riferimento. Tuttavia, in termini pratici, l'approccio di Adamson sembra essere più semplice, in quanto non richiede alcuna ipotesi sulla geometria del legante o sulla lunghezza del ponte che collega due o più atomi donatori. Questo approccio porta alla seguente equazione per l'effetto chelato<sup>58</sup>:

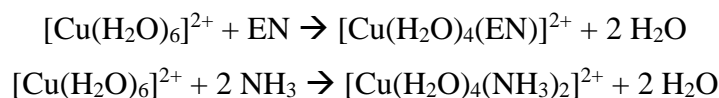
$$\log K_1 (\text{polidentato}) = \log \beta_n (\text{monodentato}) + (n - 1) \log 55.5$$

dove  $\log K_1$  si riferisce alla costante di stabilità del complesso con il legante polidentato,  $\log \beta_n$  si riferisce alla stabilità del complesso contenente il corrispondente legante monodentato, e 55,5 è la molarità dell'acqua. Il  $\log 55,5$  rappresenta, infatti, l'entropia di traslazione di una mole di soluto generata dalla concentrazione 1 M della soluzione. Quando il  $\log \beta_n$  è pari a zero, l'effetto chelato ha il valore di  $(n-1)\log 55,5$ . In altre parole, quando la forza degli atomi donatori dei leganti monodentati è indebolita al punto che essi godono di un'ulteriore stabilità relativa alle molecole di acqua con le quali sono in competizione per i siti di legame sullo ione metallico, il contributo dell'entropia all'effetto chelato è dato da  $\log 55,5$ .

L'equazione precedente serve per prevedere in modo abbastanza preciso i valori di  $\log K_1$  per i complessi poliamminici per una varietà di ioni metallici. Se però si considerano ad esempio gli ossigeni come atomi donatori (per esempio quelli dei gruppi carbossilici), vanno introdotte alcune correzioni. Il modello usato per stimare i valori di  $\log K_1$  basato sull'addizione dei gruppi donatori può essere un metodo molto efficace<sup>59</sup>. Le osservazioni sulle proprietà additive dei gruppi donatori porta ad una logica che può essere chiamata "regola dell'ambiente medio"<sup>60</sup>. Questa regola prevede che la costante di formazione dei complessi contenenti due diversi tipi di atomi donatori, sia la media delle costanti di formazione di una coppia di leganti contenenti ognuno solo un tipo di atomo donatore. Per esempio, la glicina ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ ), avrà la costante di formazione dei complessi che sarà la media dell'etilendiammina (EN) e dell'ossalato:

$$\log K_1 (\text{glicina}) = [ \log K_1 (\text{EN}) + \log K_1 (\text{ossalato}) ] / 2$$

La stabilità termodinamica di un chelato è legata all'aumento di entropia insita nello stesso processo la formazione del complesso. Ad esempio, si considerino i due differenti processi di complessazione dello stesso ione metallico,  $\text{Cu}^{2+}$  in soluzione acquosa, con un legante simile (gruppo amminico) dove la prima è una reazione di chelazione:<sup>61</sup>



Le due reazioni hanno variazione di entalpia standard comparabili, mentre la variazione di entropia standard è nettamente differente e in ultima analisi rappresenta il fattore a cui è legato il maggior carattere negativo dell'energia libera standard legata alla chelazione. Il valore di  $\Delta S^\circ$  è  $+23 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  per la reazione con il chelante bidentato e  $-8,4 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  nell'altro caso; ciò si può evidenziare dall'aumento totale di molecole che si ottiene dalla chelazione, verificabile dalla differenza della somma dei coefficienti stechiometrici dei prodotti e dei reagenti. Nel caso in cui non si ha chelazione la variazione di entropia invece è piccola, essendo praticamente invariato il numero di specie chimiche implicate.

Molti complessi supramolecolari host-guest, sono persino più stabili di quanto ci si possa attendere dal solo effetto chelato. Il recettore in queste specie può essere un legante macrociclico, che chela il substrato attraverso un certo numero di siti di legame. Tale complesso è stabilizzato addizionalmente dall'effetto macrociclico. Questo effetto non solo è causato dalla chelazione del substrato da parte dei siti multipli di legame, ma anche dall'organizzazione di questi siti nello spazio che fanno risparmiare energia di legame alla specie che si deve far "avvolgere" dal recettore per beneficiare del maggior grado di chelazione. L'effetto macrociclico rende queste molecole come i corandi (ad es.: eteri corona, azamacrocicli), più stabili di un fattore fino a cento volte rispetto a specie acicliche strettamente correlate come i podandi con lo stesso tipo di siti donatori. L'effetto macrociclico venne descritto per la prima volta da Cabbiness e Margerum nel 1970, i quali studiarono i complessi di  $\text{Cu}(\text{II})$  come quelli riportati nella Figura 8.



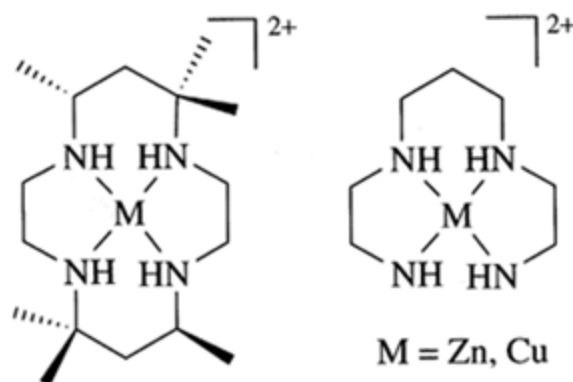


Fig.8: Complessi di Cu(II) studiati da Cabiness e Margerum.

Misure termodinamiche su analoghi complessi (non metilati) di  $Zn^{2+}$  mostrano che la stabilizzazione per effetto macrociclo è causata sia da contributi entalpici che entropici.

Nella chimica di coordinazione, è ben noto che un aumento delle dimensioni dell'anello chelato, porta a volte ad una diminuzione della stabilità del complesso. L'anello chelato è la struttura che formano gli atomi donatori del legante quando coordinano il metallo. La riduzione della stabilità è causata dalla maggior difficoltà avere dipoli e cariche sugli atomi donatori del legante a causa della tensione sterica. Ci si potrebbe logicamente aspettare, quindi, che uno dei modi per aumentare la selettività degli ioni di grandi dimensioni, rispetto a quelli più piccoli, sia aumentare le dimensioni dell'anello. Tuttavia, se si guardano le costanti di stabilità, si nota che avviene proprio il contrario: un aumento delle dimensioni dell'anello chelato porta ad un calo della stabilità nel caso di ioni metallici grandi, mentre si osserva un aumento per gli ioni metallici piccoli.<sup>62</sup> Si è visto che la diminuzione di stabilità aumenta con il raggio ionico, per cui diventa più marcata passando dal complesso a cinque termini a quello a sei. Questa osservazione conduce ad una seconda regola di progettazione del ligando:<sup>63</sup> un aumento delle dimensioni dell'anello chelato, porta ad un maggiore grado di destabilizzazione per gli ioni metallici più grandi rispetto a quelli più piccoli.

E' stato inoltre dimostrato che la selettività della cavità degli eteri corona, non dipende dalla presenza di un macrociclo ad anello, ma solo dalle proprietà dell'atomo donatore (in questo caso gli ossigeni neutri). I ligandi a catena aperta con l'ossigeno neutro come atomo donatore, mostrano una selettività molto simile a quella dei corrispettivi chelanti ciclici. Le dimensioni delle cavità dei leganti non ciclici è stata calcolata utilizzando la meccanica molecolare (MM),<sup>64,65</sup> basandosi sul fatto che la dimensione della cavità è uguale alla lunghezza del legame metallo-atomo donatore che produce il minimo stress nel complesso. La dimensione della cavità di leganti non ciclici non è fissa, ma dipende dal tipo di conformazione che essi assumono nello spazio.

Un altro fattore evidenziato dai calcoli MM è l'importanza dell'energia di solvatazione nella selettività per ioni dei metalli alcalini: nella fase gassosa la forza del legame sarebbe  $Li^+ \gg Na^+ \gg$

$Rb^+ \gg Cs^+$  che è in gran parte invertita se si considerano le energie di idratazione. L'inversione della stabilità nel complesso rispetto alla fase gassosa per i metalli alcalini più leggeri è causato da un aumento dello stress sterico di dei leganti man mano che il raggio ionico degli ioni diminuisce. Tuttavia questo aumento della tensione sterica non è causato solo dal fatto che la cavità diventa troppo grande per lo ione. Dai calcoli MM si nota un cambio conformazionale nel complesso in risposta ad un cambiamento del raggio ionico.

È importante quindi considerare questo effetto nella progettazione di nuovi leganti.

Per prima cosa bisogna considerare alcuni problemi: il primo sta nel creare leganti preorganizzati con una larga cavità. È noto che leganti di piccole dimensioni tendono ad avere un'elevata preorganizzazione, ma leganti grandi tendono a collassare su se stessi, rendendo così meno disponibile la cavità, oppure quest'ultima rimane occupata dalle molecole del solvente.<sup>66-68</sup>

Quando si considera la preorganizzazione di un legante, bisogna tener conto anche delle costanti di protonazione. Ad esempio, quando si considera il legante cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano), si notano costanti di protonazione<sup>69</sup> più elevate rispetto a semplici ammine secondarie alifatiche. Questo è attribuito alla formazione di legami ad idrogeno all'interno della cavità del legante, il quale deve necessariamente eliminare uno dei protoni sull'azoto per immobilizzare una molecola di solvente necessaria per la solvatazione. Invece quando un legante è in grado di fornire entrambe le basi di Lewis solvate per due protoni, si ha un notevole aumento della costante di protonazione. Una costante di protonazione maggiore corrisponderà quindi ad una minor stabilità del complesso con il macrociclo, perché occorrerà più energia nella formazione del complesso. L'ultimo aspetto da tenere in considerazione è l'effetto che hanno le braccia laterali dei macrocicli sulla stabilità dei complessi, perché la dimensione delle catene laterali influenza la selettività dello ione metallico.<sup>70</sup>

Molti studi sono stati fatti su complessi con azamacrocicli in cui gli atomi di azoto sono stati funzionalizzati con braccia metilcarbossiliche, soprattutto l'aggiunta di quattro gruppi acetici come sostituenti dell'azoto di tetraazamacrocicli<sup>71-74</sup>. Questi leganti ottadentati consentono di formare complessi molto stabili con tutti quegli ioni che possono raggiungere il numero di coordinazione (N.C.) di 8. Ad esempio, ioni metallici che hanno queste caratteristiche sono i lantanidi, i quali vengono complessati meglio da leganti DOTA-derivati (DOTA = Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico).<sup>75</sup>

I tetraazamacrocicli tetraacetati si sono dimostrati sistemi molto efficienti per la complessazione sia di lantanidi che di altri ioni metallici trivalenti principalmente per la presenza di ioni carbossilato. Infatti, le interazioni coulombiane tra anione (ione carbossilato) e catione (ione metallico) sono molto forti e stabilizzano meglio il complesso rispetto all'interazione tra lo ione metallico e ad esempio un atomo di azoto presente dentro il macrociclo. Anche da un punto di vista sterico si hanno dei vantaggi

nella complessazione con i carbossilati rispetto ad ammine od alcoli. Infatti, i gruppi amminici secondari/primari hanno uno/due atomi di idrogeno legati all'azoto ed inoltre il gruppo CH<sub>2</sub> adiacente ha due atomi di idrogeno che danno un possibile ingombro sul catione. Al contrario, il gruppo carbossilato è stericamente ottimale perchè si coordina allo ione metallico senza l'ingombro di idrogeno adiacenti dato che sia l'ossigeno che il carbonio carbonilico del gruppo carbossilato non hanno atomi di idrogeno collegati. Questa caratteristica è sfruttata per coordinare in maniera più efficiente: il carbossilato “circonda” il metallo occupando meno spazio, come si può notare nella figura sottostante

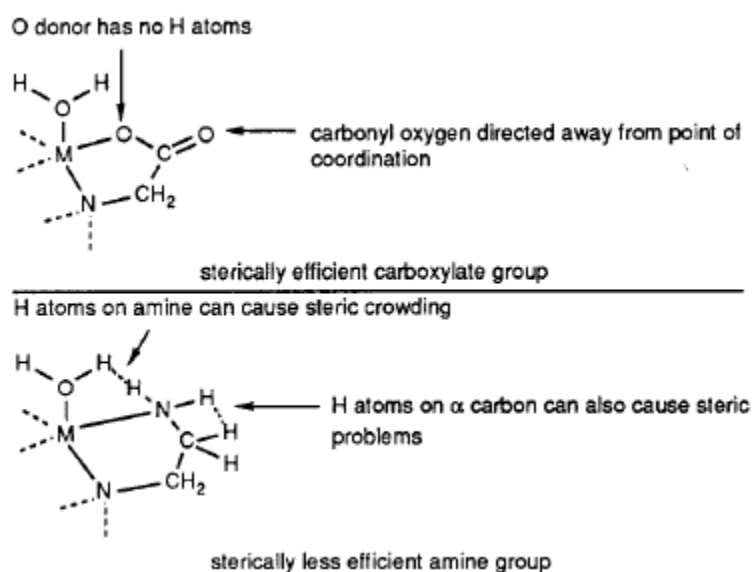


Fig. 9: Ingombro sterico degli atomi donatori del centro metallico M.

Molti altri tipi di gruppi donatori sono stati legati ai macrocicli, come gruppi piridinici,<sup>76</sup> fenolati,<sup>77</sup> 2-amminoetil,<sup>78,79</sup> ma non ci sono ancora sufficienti prove per stabilire se questi gruppi aumentano oppure no la selettività e la stabilità dei complessi. Tuttavia sembrerebbe che i gruppi piridinici e quelli amminoetil sono i gruppi che sono stericamente meno efficienti.

#### 1.2.4. Classi di agenti di contrasto

Tipicamente gli agenti di contrasto per MRI sono chelati mononucleari o polinucleari paramagnetici. Tuttavia ci possono essere molte altre tipologie di CAs tra cui: metalloporfirine; vettori polimerici o macromolecolari (legati in modo covalente e/o non covalente); particelle superparamagnetiche (ad esempio gli ossidi di ferro); sonde diamagnetiche iperpolarizzate (gas e aerosol), e composti marcati con <sup>13</sup>C o ioni (ad es. Li<sup>+</sup>).

Alcuni di questi agenti di contrasto sono in grado di accorciare soprattutto il tempo di rilassamento  $T_2$  e sono chiamati agenti negativi. CAs di questo tipo sono le nanoparticelle di ossido di ferro che in generale producono immagini più scure nei tessuti dove si distribuiscono.

I mezzi di contrasto positivi più comunemente utilizzati sono basati su ioni metallici paramagnetici, come  $Mn^{2+}$  (5 elettroni spaiati), e  $Gd^{3+}$  (7 elettroni spaiati). La presenza di elettroni spaiati è in grado di ridurre notevolmente i tempi di rilassamento degli spin nucleari capaci di interagire con lo spin elettronico, aumentando quindi l'efficienza degli agenti di contrasto. I complessi di Gd(III) sono diventati di uso comune nella diagnostica medica perché lo ione  $Gd^{3+}$  si è dimostrato il più efficiente a creare un contrasto ottimale sia per il suo elevato paramagnetismo che per il suo lungo tempo di rilassamento elettronico (causato dalla distribuzione simmetrica degli elettroni spaiati intorno al nucleo). Infatti, se si valuta solo il momento magnetico ( $\mu$ ) ci sono due altri lantanidi, il disprosio(III) e l'olmio(III) che hanno  $\mu$  più elevato di quello del  $Gd^{3+}$  (a causa di contributi degli orbitali elettronici al momento angolare). Tuttavia, l'asimmetria degli stati elettronici di  $Dy^{3+}$  e  $Ho^{3+}$  porta lo spin elettronico ad un rapido rilassamento per cui i protoni dell'acqua sentono a stento l'effetto dello ione paramagnetico.<sup>80</sup> Invece, la simmetria degli stati s del  $Gd^{3+}$  e un ambiente più ospitale per gli spin elettronici, e permettono allo spin elettronico di avere un rilassamento molto più lento.

Il primo mezzo di contrasto approvato per uso clinico è stato Gd-DTPA<sup>81-86</sup> con il nome commerciale di Magnevist® (Schering AG, Germania). Successivamente sono stati introdotti altri tre agenti di contrasto a base di gadolinio (III), con proprietà diverse dal Gd-DTPA: Gd-DOTA<sup>87-90</sup> (Dotarem®, Guerbet SA, Francia), Gd-DTPABMA<sup>91-93</sup> (bismetilammide; Omniscan®, GE Healthcare, US) e Gd-HPDO3A<sup>94-96</sup> (Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-(2-idrossipropil)-4,7,10-triacetico, Prohance®, Bracco Imaging, Italia).

Di seguito sono riportate le strutture dei complessi appena citati.

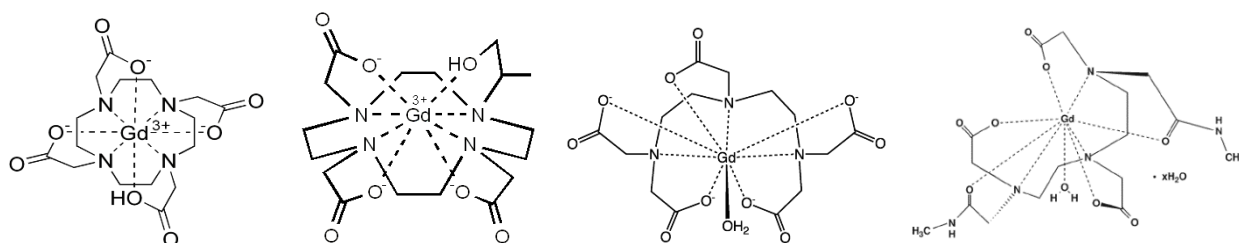


Fig. 10: Da sinistra possiamo vedere le formule di struttura del Gd-DOTA, Gd-HPDO3A, Gd-DTPA e Gd-DTPABMA

Dal punto di vista strutturale, a causa delle loro grandi dimensioni, i lantanidi possiedono elevati numeri di coordinazione, di norma nove. Tutti i complessi di Gd(III) a base macrociclica (cyclen-based) sono ottenuti a partire da leganti aventi otto atomi donatori che sono in grado di incapsulare

lo ione tra i quattro azoti coplanari dell'anello macrociclico e i quattro ossigeni dei gruppi carbossilici delle braccia acetiche. L'ultimo legame è formato con una molecola d'acqua posta in posizione assiale. Per questo tipo di complessi, la geometria di coordinazione è generalmente *monocapped square antiprism* (CSAP). In presenza di altre tipologie di leganti polidentati i lantanidi possono poi essere complessati con una geometria *Tricapped Trigonal Prism* come si può vedere nella figura riportata in seguito.

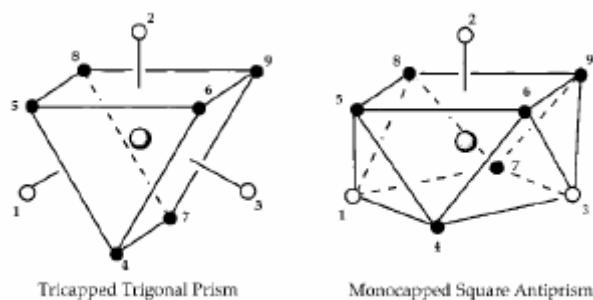


Fig. 11: Geometrie dei complessi nono-coordinati <sup>97</sup>

Nel caso di complessi aventi geometria CSAP si possono avere due forme geometriche di coordinazione diverse a seconda dell'angolo di torsione fra i piani quadrati. Un angolo di torsione più grande ( $39^\circ$ ) fra i due piani quadrati definisce una geometria SAP, mentre un angolo di torsione più piccolo ( $25^\circ$ ) è associato ad alla struttura TSAP (*Twisted Square Antiprism*), in cui cambia l'orientazione del braccio acetico.<sup>98</sup> Questi due isomeri scambiano reciprocamente in soluzione, ovvero interconvertono tra le due conformazioni mediante o l'inversione dell'anello macrociclico o la rotazione dei gruppi acetici.<sup>99-100</sup> Le due conformazioni dell'anello possono essere quindi ( $\delta\delta\delta\delta$ ) o ( $\lambda\lambda\lambda\lambda$ ), mentre le braccia possono essere orientate in senso orario ( $\Delta$ ) o antiorario ( $\Lambda$ ). Ne consegue che i quattro isomeri (due coppie enantiomeriche) che possono essere presenti in soluzione, sono:  $\Delta$  ( $\lambda\lambda\lambda\lambda$ ) /  $\Lambda$  ( $\delta\delta\delta\delta$ ) (SAP) e  $\Delta$  ( $\delta\delta\delta\delta$ ) /  $\Lambda$  ( $\lambda\lambda\lambda\lambda$ ) (TSAP). Combinando la rotazione delle braccia e anello di inversione determina l'interconversione tra gli enantiomeri (Figura 12).<sup>101</sup>

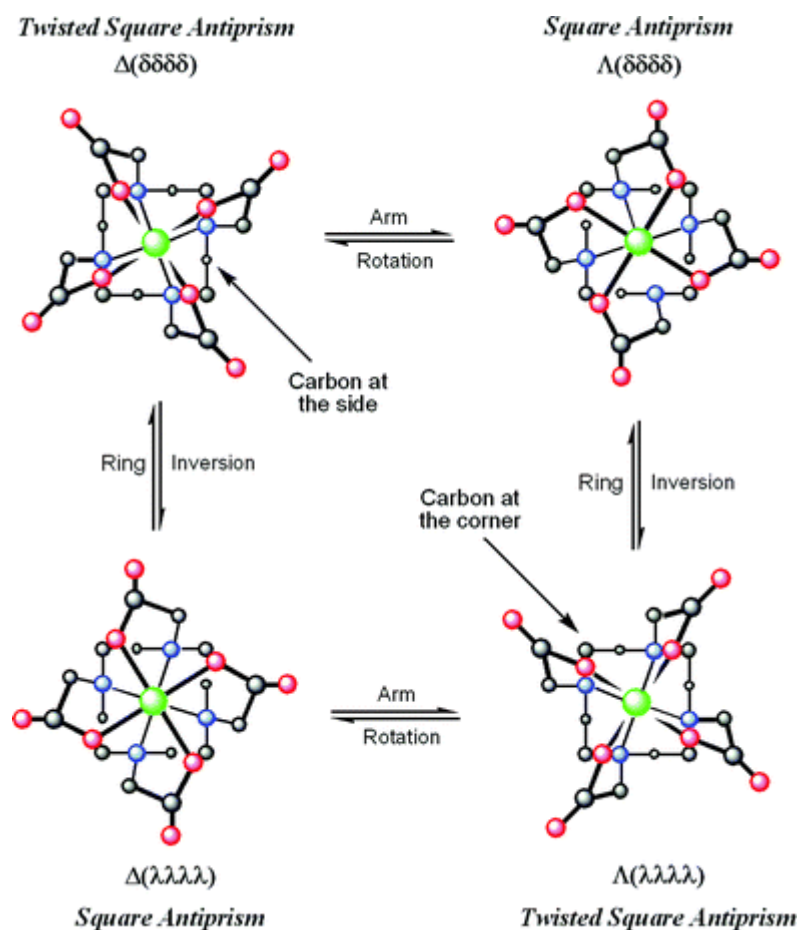


Fig.12: le quattro coppie di stereoisomeri del complesso LnDOTA.

Il processo di scambio conformazionale intramolecolare ha velocità dell'ordine di  $10 \text{ s}^{-1}$  e sono quindi relativamente lenti nella scala dei tempi dell'analisi NMR; permettendo così a ciascun stereoisomero di essere chiaramente visibile nello spettro  $^1\text{H}$  NMR di un chelante.

La struttura in soluzione dei vari complessi LnDOTA è stata quindi ampiamente indagata attraverso la spettroscopia NMR ad alta risoluzione. Gli spettri protonici (Figura 13) mostrano la presenza di dodici picchi divisi in due gruppi di sei segnali, assegnati agli isomeri SAP e TSAP.<sup>102</sup>

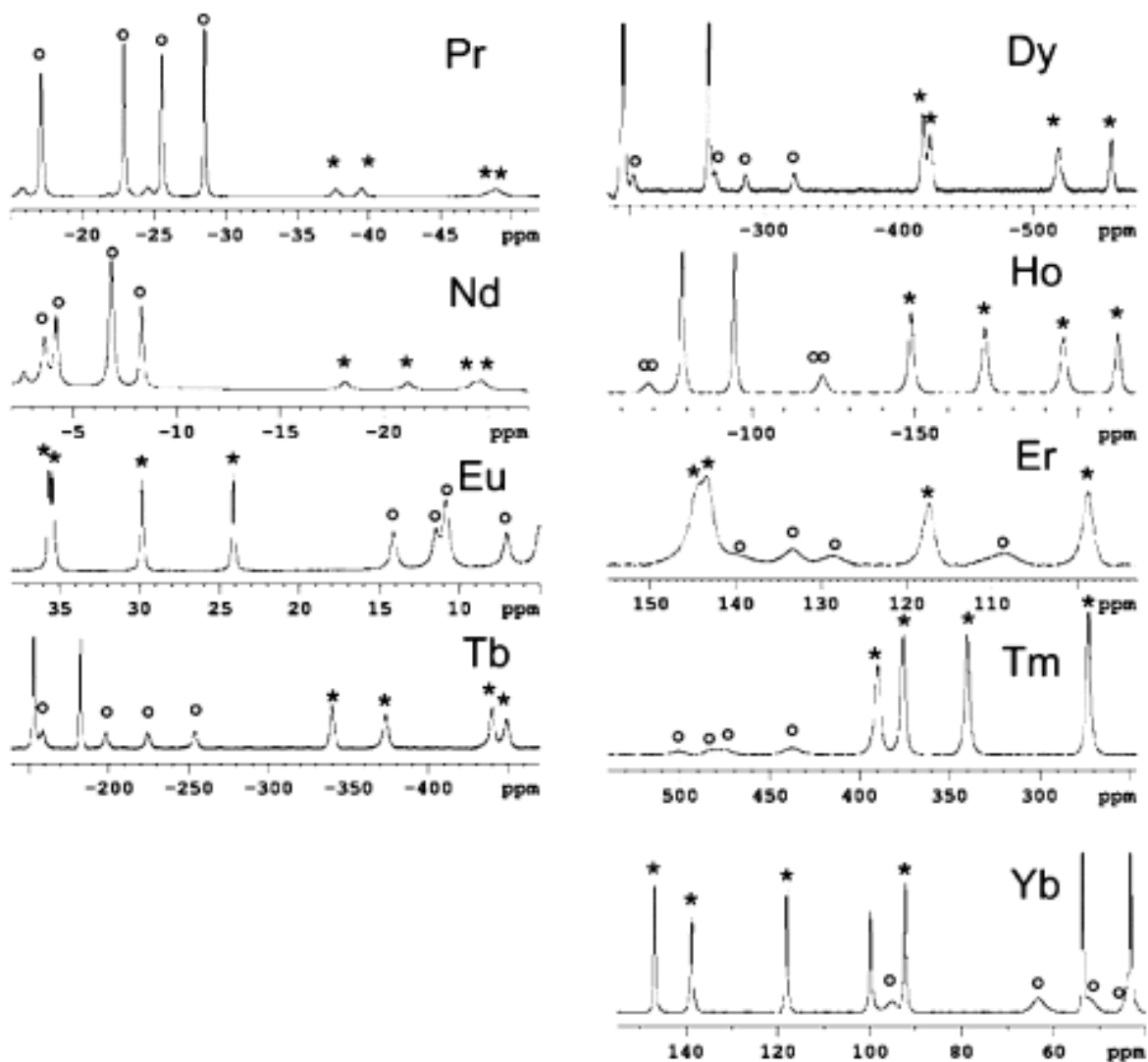


Fig.13: Porzione degli spettri NMR dei complessi LnDOTA, misurati a 278 K e a pH =7. Sono riportate le regioni dove risuonano i protoni assiali di entrambi gli isomeri (SAP e TSAP).

### 1.2.5 Stabilità e biodistribuzione

Due importanti aspetti da tenere in considerazione a proposito del possibile utilizzo nella pratica clinica degli agenti di contrasto sono la loro stabilità e la biodistribuzione *in vivo*. In generale, un agente di contrasto deve essere stabile sia termodinamicamente che cineticamente durante il periodo in cui rimane in circolo per evitare effetti tossici. Deve inoltre essere efficacemente eliminato dal corpo poche ore dopo la sua somministrazione (a meno che non si voglia indirizzarlo verso uno specifico target oppure che si richieda una sua permanenza nel flusso sanguigno).

Per gli agenti di contrasto per MRI gli effetti tossici possono essere dovuti essenzialmente a:

- rilascio dello ione metallico in seguito alla dissociazione del complesso;

- effetto del legante libero anch'esso rilasciato dalla dissociazione del complesso;
- effetto del complesso intatto;

Lo ione metallico ed il legante liberati dalla dissociazione del complesso possono provocare un notevole aumento nella tossicità: gli ioni metallici liberi possono dare origine a legami di coordinazione con eteroatomi come O, N, S appartenenti a sistemi biologici (membrane o macromolecole) alterando così gli equilibri dinamici necessari al loro funzionamento; i leganti liberi invece possono chelare ioni metallici essenziali, come ad esempio il calcio, rendendoli indisponibili. La tollerabilità di questi chelati dipende quindi dalla loro stabilità termodinamica e dalla cinetica della reazione di dissociazione del complesso. Per questo motivo i complessi utilizzati nella pratica clinica presentano valori di costante di complessazione maggiore di  $10^{20}$  e cinetiche di rilascio, a pH fisiologico, estremamente lente. È stato proposto di utilizzare come parametro per valutare la stabilità in vivo di un complesso metallico il rapporto fra le costanti di complessazione del metallo presente nel mezzo di contrasto e degli ioni metallici endogeni con il quale il legante potrebbe interagire (ad esempio  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ).

Per quanto riguarda la biodistribuzione di questi sistemi *in vivo*, bisogna rimarcare che i CAs attualmente approvati per uso clinico sono tutti agenti non specifici, cioè non interagiscono specificamente con alcun tipo di tessuti. Dopo la somministrazione endovenosa, l'agente di contrasto può diffondere rapidamente tra i vasi sanguigni, spazi che sono comunemente chiamati extracellulari. Tali CAs sono detti *extracellular fluid agent* (ECF), cioè complessi extracellulari a basso peso molecolare che scambiano rapidamente tra lo spazio intravascolare e quello interstiziale. A seconda della sua struttura, il chelato può rimanere più a lungo nei vasi sanguigni (*blood pool agents*): complessi ad alto peso molecolare, come i sistemi dendrimerici, o complessi in grado di interagire con l'albumina di siero umano, rimangono all'interno dello spazio intravascolare per tempi abbastanza lunghi.

Se il complesso possiede una bassa lipofilia viene escreto principalmente per via renale,<sup>103-106</sup> mentre se ha un forte carattere idrofobico, e specialmente se contiene sistemi aromatici, una certa quantità di complesso viene assorbito dalle cellule del fegato ed eliminato per via biliare<sup>107-108</sup>

In generale, maggiore è il grado di lipofilia di una molecola, maggiore è l'escrezione epatobiliare. Tuttavia se il carattere lipofilo è troppo elevato possiamo avere un accumulo dell'agente di contrasto nei tessuti grassi o nelle membrane cellulari, precipitare nei vasi sanguigni o essere catturato dalle cellule endoteliali, dalla milza o del fegato, causando una potenziale tossicità cronica.

È molto importante tenere in considerazione la stabilità termodinamica e l'inerzia cinetica di un complesso di Gd(III) perché bisogna evitare che venga rilasciato lo ione libero nel corpo. Il gadolinio non svolge funzioni fisiologiche nei mammiferi e la sua somministrazione come ione libero, è



fortemente tossica già a dosi dell'ordine di 10-20  $\mu\text{moli} / \text{Kg}$  ( $\text{LD}_{50} \cong 0,1 \text{ mmoli} / \text{Kg}$ ). Inoltre a concentrazioni ancora più basse si può avere la precipitazione di acidi nucleici, effetti antagonisti con gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (si accumula nel tessuto scheletrico) o con altri ioni metallici in metalloenzimi con conseguente alterazione della loro attività e una lunga serie d'interferenze in reazioni fisiologiche di varia natura. E' quindi chiaro che la dissociazione del Gd(III) dall'agente di contrasto per MRI non sia desiderabile e quindi l'elevata stabilità dei complessi è un requisito fondamentale e obbligatorio. La fibrosi sistemica nefrogenica (*NSF*) o dermatopatia nefrogenica fibrosante è una sindrome rara e grave che causa fibrosi alla cute, alle articolazioni, agli occhi e agli organi interni. La sua causa sembra sia associata con l'assunzione di alcuni tipi di agenti di contrasto basati sul gadolinio in pazienti con insufficienza renale grave, aventi bisogno quindi di frequenti dialisi che aumentano il tempo di residenza dell'agente di contrasto.<sup>109</sup> I primi casi di NSF sono stati identificati nel 1997,<sup>110</sup> ma l'NSF è stata descritta come un'entità nosologica nel 2000.<sup>111</sup> Mentre il coinvolgimento cutaneo è visibile immediatamente, il processo può coinvolgere qualsiasi organo come nella sclerodermia o sclerosi sistemica.<sup>112</sup> Nel 2006 è stata fatta la correlazione tra NSF e solo alcuni tipi di mezzi di contrasto a base di gadolinio.<sup>113-115</sup> In particolare, Omniscan, basato sul legante aciclico DTPA-BMA, è stato il principale responsabile di questa malattia in quanto rilasciava  $\text{Gd}^{3+}$  dopo essere rimasto in circolo per tempi superiori a qualche ora.

Quindi, dato che in letteratura vi sono numerosi articoli che dimostrano la maggior stabilità cinetica dei complessi macrociclici rispetto a quelli ottenuti con leganti aciclici,<sup>116-118</sup> l'utilizzo di questo tipo di mezzi di contrasto, in generale, elimina i problemi connessi all'NSF.

### **1.3 Analisi Rilassometriche:**

In generale, per determinare i parametri rilassometrici correlati ad un complesso di Gd(III) è necessario acquisire alcuni dati e poi analizzarli in funzione di formule matematiche che permettano di estrapolare i parametri di interesse. In primo luogo è necessario misurare la variazione della velocità di rilassamento longitudinale dell'acqua (relaxività,  $r_{1p}$ ) in presenza del complesso paramagnetico in funzione del campo magnetico applicato (intervallo 0.01-70 MHz, corrispondente a 0.00024 – 1.26 T) per ottenere il cosiddetto profilo di dispersione di risonanza magnetica nucleare (profilo NMRD). Tale profilo può essere analizzato in base alla teoria di Solomon-Bloembergen-Morgan (teoria SBM) del rilassamento paramagnetico. La teoria descrive la modulazione dell'interazione dipolare tra lo spin nucleare dei protoni dell'acqua e lo spin elettronico dello ione

paramagnetico in termini di numerosi parametri, tra cui i più importanti sono il tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$ , il numero di molecole di acqua di sfera interna  $q$  ed la loro velocità di scambio  $k_{ex}$ . La dipendenza di  $T_1$  dal campo  $B_0$  è rappresentata nel grafico a dispersione della risonanza magnetica nucleare (NMRD), ovvero profili che riportano i cambiamenti di  $(1/T_1)$  in funzione del campo magnetico applicato.

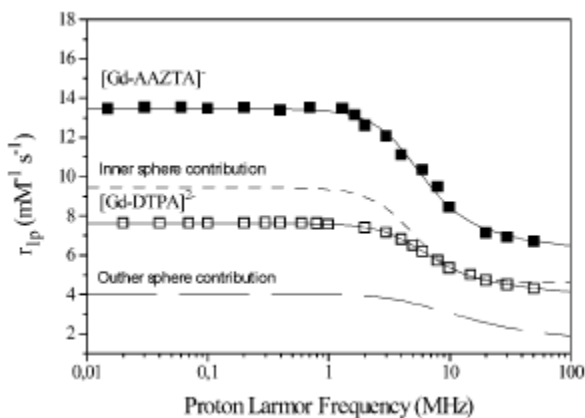


Fig.14: Profilo NMRD dei complessi Gd-DTPA e Gd-AAZTA

In parallelo, per determinare con accuratezza la velocità di scambio della molecola di acqua coordinata è necessario acquisire il cosiddetto profilo  $^{17}\text{O}$  NMR. Esso consiste nella misura dei tempi di rilassamento trasversali ( $R_2$ ) del nucleo  $^{17}\text{O}$  (di acqua marcata in  $^{17}\text{O}$ ) coordinato allo ione paramagnetico in funzione della temperatura (fra 275 e 345 K) di una soluzione circa 10 mM del complesso (in generale, tale misura viene effettuata ad alto campo magnetico, p.e. 500 MHz). I profili  $^{17}\text{O}$  NMR possono essere analizzati con le equazioni di Swift-Connick che, in base alla dipendenza di  $R_2$  dalla temperatura, permettono di ricavare la velocità di scambio dell'acqua coordinata allo ione paramagnetico.

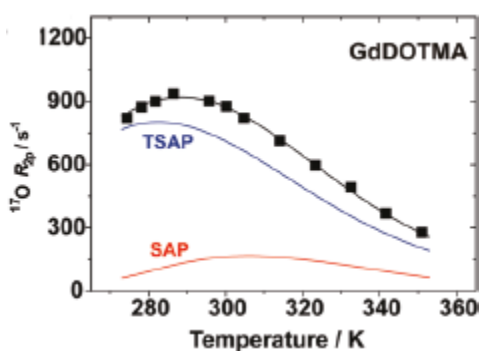


Fig.15: Profilo  $^{17}\text{O}$  NMR di Gd-DOTMA

## 1.4 Sintesi DOTA-derivati:

La procedura di ciclizzazione Richman-Atkins è stato il metodo più usato per anni per la sintesi dello scheletro macrociclico del 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (o Cyclen). Essa consiste nella reazione fra il sale disodico della tritosildietilentriammina e l'N-tosildietanolammina ditosilata per dare il cyclen tetraetosilato che successivamente viene deprotezionato con acido solforico concentrato (vedi Figura 16):<sup>119-123</sup>

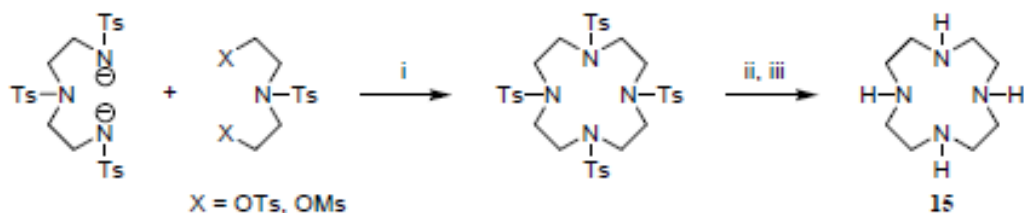


Fig. 16: Procedura di Richman-Atkins per la sintesi del Cyclen.  
i) DMF, 100°C, 2h, 80%; ii) 97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 °C, 48 h; iii) 6 N HCl.

Questo metodo è stato sostituito in seguito da sintesi più efficaci, anche se si basano su dei reagenti di partenza piuttosto costosi. Ad esempio, una procedura effettuata su scala di laboratorio è la sintesi di Weisman-Reed. (Figura 17).<sup>124</sup>

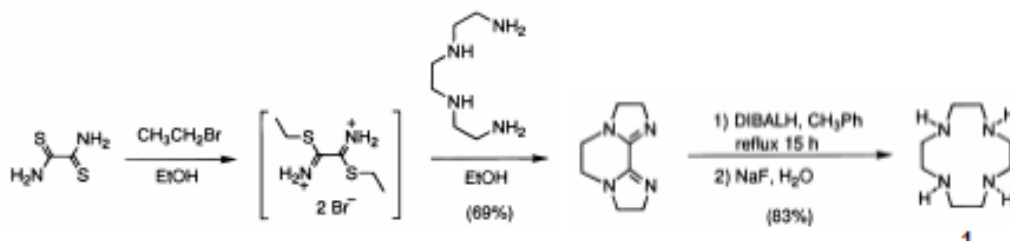


Fig. 17: Sintesi di Weisman-Reed per la sintesi del Cyclen

Il cyclen risulta anche disponibile commercialmente, ma è piuttosto costoso. Le braccia acetate del DOTA sono generalmente inserite facendo reagire il cyclen con un alchil bromoacetato e da una successiva deprotezione del tetraestere risultante in ambiente acido o basico a seconda dell'estere.

L'acido coniugato di ciascun azoto dell'anello presenta una pK<sub>a</sub> differente (10.5, 9.5, 1.6, 0.8)<sup>125</sup>, per cui è possibile fare una N-alchilazione selettiva andando a funzionalizzare in modo diverso le varie ammine secondarie del Cyclen.

Gli approcci possibili sono tre:

1) si procede con una di- o tri-alchilazione con un estere dell'acido bromoacetico e una successiva alchilazione con una catena diversa, ad esempio si può alchilare tre volte il Cyclen con il *t*-butil-

bromoacetato, ottenendo il DO3A(O*t*Bu)<sub>3</sub> (acido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetico) e funzionalizzare in maniera diversa l'ammina secondaria rimasta.

2) si protegge prima una o più ammine introducendo un gruppo protettivo (si possono ottenere, cyclen-1,7-carbobenzilossi (Cbz), cyclen-monoCbZ o cyclen-triBoc o altri sistemi protetti) e poi si alchila le ammine secondarie rimaste. Una volta deprotette le ammine si ottiene il prodotto desiderato che, se necessario, può essere ulteriormente funzionalizzato.

3) si inserisce direttamente il sostituito desiderato generalmente usando un eccesso di cyclen per evitare la polifunzionalizzazione e successivamente si fa reagire il cyclen-mono-sostituito con un estere dell'acido bromo acetico per completare la sostituzione sul macrociclo.

La scelta della via sintetica dipenderà, dalla natura, posizione e numero dei sostituenti che si vuole inserire, per cui non esiste una via migliore, ma dipende dal prodotto che si vuole preparare

Per quanto concerne la mono-alchilazione, uno dei primi esempi è il lavoro di Czarnik<sup>126</sup>. Egli ha fatto reagire il Cyclen con il 9-(Clorometil)antracene, ottenendo il prodotto come sale di Cloro senza dover purificare tramite colonna cromatografica (Figura 18)

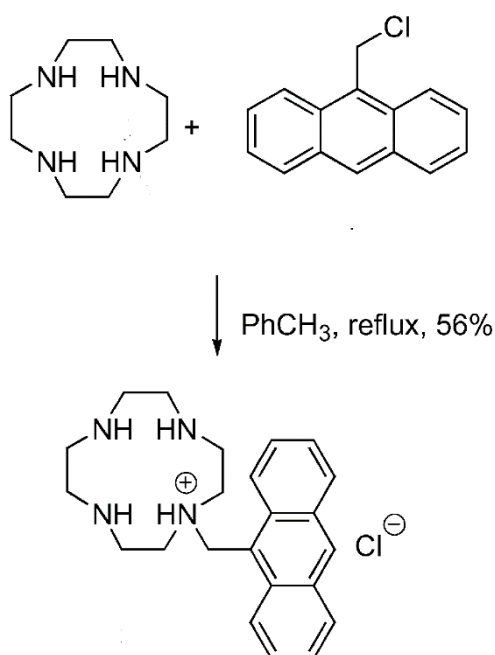


Fig.18: Schema di sintesi della monosostituzione del Cyclen

Il cloruro di ammonio dell'acido N-Cyclenacetico può essere ottenuto con rese abbastanza elevate (circa 75%), facendo reagire un eccesso di Cyclen con l'acido bromoacetico, usando come base il LiOH, seguito da lavaggi con acqua acida. (Figura 19)<sup>127</sup>

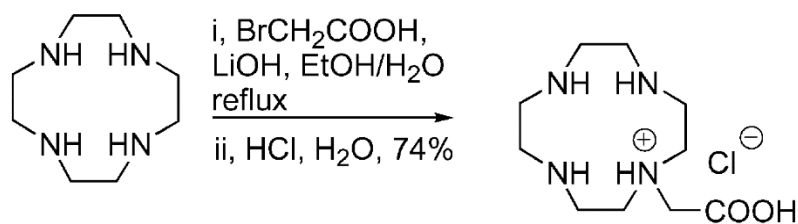


Fig. 19: Esempio di monoalchilazione

Il Cyclen-mono-benzilacetato è preparato tramite alchilazione del Cyclen con benzil bromoacetato in  $\text{CHCl}_3$ . La resa della reazione risulta essere elevata nonostante la purificazione tramite una colonna cromatografica. (Figura 20)

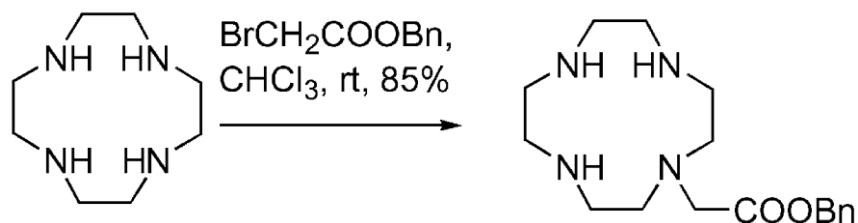


Fig. 20: Schema della monoprotezione del cyclen

Per quanto concerne la dialchilazione, possiamo avere due classi di isomeri, a seconda se si alchilano gli atomi di azoto N1-N4 o N1-N7. Il primo esempio di difunzionalizzazione N1-N4 del Cyclen è apparsa in letteratura nel 1999.<sup>128</sup> Il Cyclen è messo a riflusso in EtOH con una quantità equimolare di un estere dell'acido ossalico, ottenendo il prodotto con una resa elevata.

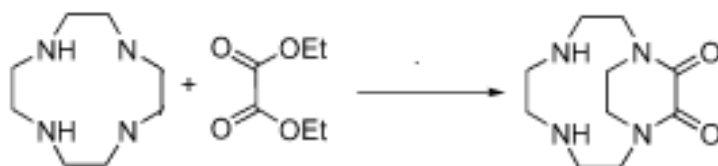


Fig. 21: Reazione tra il diEt ossalato e il Cycen

Vi sono procedure che permettono la diachilazione selettiva degli atomi di azoto in posizione 1,4- con il *t*-butil-bromoacetato. (Figura 22)

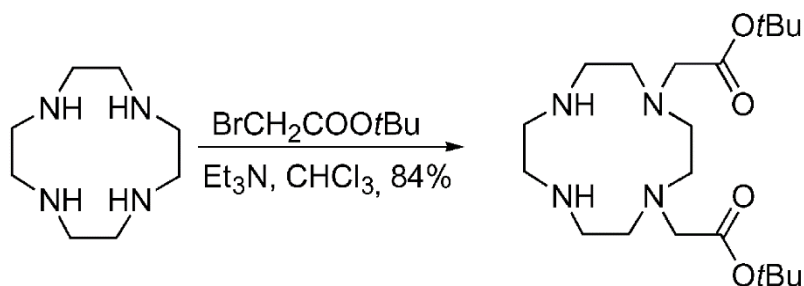


Fig. 22: Esempio di dialchilazione del Cyclen

Se invece si vuole alchilare gli atomi di azoto N1-N7, si può far reagire il Cyclen con Sodio bisolfito e formaldeide, sotto stretto controllo del pH (che deve essere tra 7 e 9), ottenendo il prodotto disostituito (Figura 23), con ottime rese. Tuttavia si nota la formazione di una piccola quantità di addotto N1-N4 che è eliminato tramite ricristallizzazione.

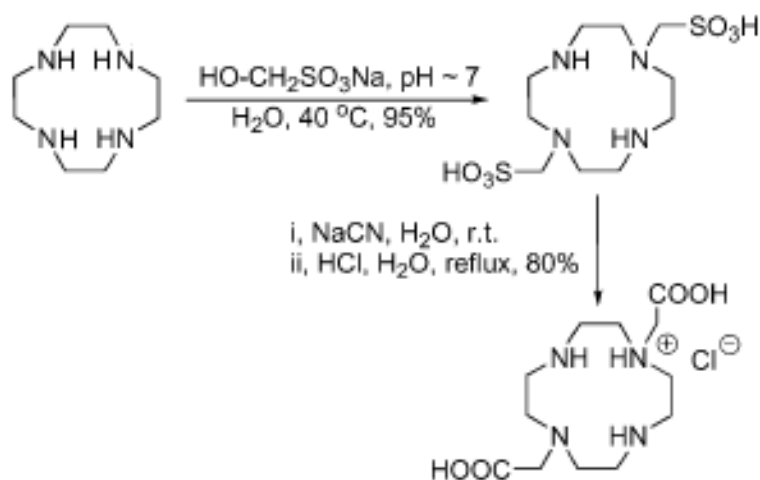


Fig. 23: Dialchilazione di N1 e N7 del Cyclen

Infine la trialchilazione può essere eseguita facendo reagire un estere dell'acido bromoacetico, a pH basico con il Cyclen (Figura 24). Il prodotto deve poi essere purificato a causa della presenza del sottoprodotto disostituito e di quello tetrasostituito.

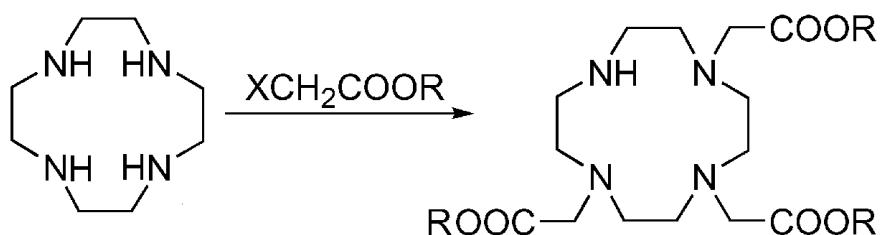


Fig. 24: Schema di sintesi del Cyclen di sostituito.  
 $x \rightarrow \text{Cl, Br, I, R} \rightarrow \text{Me, Et, t-Bu}$

## 1.5 Scopo del lavoro:

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare nuovi leganti poliamminocarbossilici partendo da uno scheletro comune, il cyclen, andando di volta in volta a modificare i sostituenti degli atomi d'azoto del macrociclo al fine di migliorare i parametri rilassometrici dei corrispondenti complessi di Gd(III) ( $q$ ,  $\tau_R$ ,  $\tau_M$ ) e quindi l'efficacia dell'agente di contrasto. Il miglioramento della rilassività deve avvenire senza comprometterne la stabilità cinetica e termodinamica.

Si sono studiate tre classi diversi di agenti di contrasto:

### 1) *DOTA-monopropionamide (DOTAMAP) derivati:*

La ricerca prende spunto da studi recenti effettuati nei laboratori del DiSIT che hanno dimostrato che l'allungamento del braccio ammidico di un legante DOTA-monoammide da acetammidico a propionammidico comporta un aumento di quasi due ordini di grandezza della velocità di scambio della molecola di acqua coordinata nel complesso di Gd(III). Questo maggiore  $k_{ex}$  comporta un notevole aumento di rilassività soprattutto in concomitanza con un aumento di  $\tau_R$ . Durante il progetto di dottorato è stato ripreparato un derivato DOTAMAP per effettuare studi di stabilità termodinamica e cinetica in collaborazione con ricercatori dell'Università di Debrecen (Ungheria). E' stato inoltre preparato il legante DOTAMAP funzionalizzato con metil estere dell'acido aminocolico (Figura 25), che ha l'abilità di interagire fortemente con l'albumina di siero umano andando a formare addotti supramolecolari host-guest con un elevata rilassività.

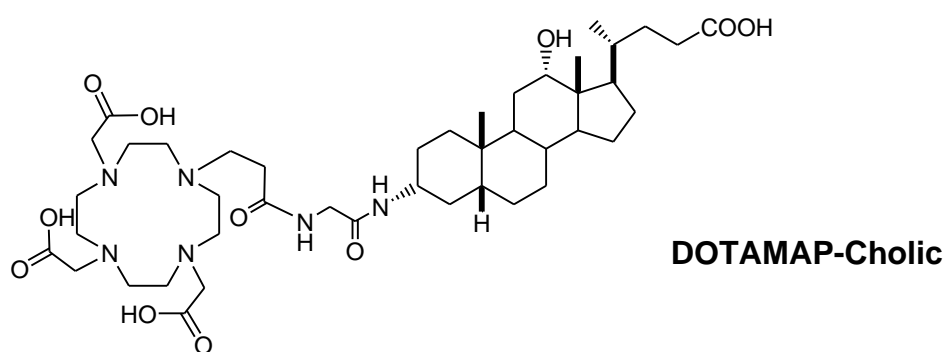


Fig. 25: Struttura del legante DOTAMAP-Cholic

### 2) *DOTMA-derivati:*

Il DOTMA è l'analogo del DOTA avente quattro metili in posizione  $\alpha$  sulle braccia acetiche (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrametilacetic acid). Il complesso GdDOTMA è di particolare interesse in quanto risulta avere una velocità di scambio ( $k_{ex}$ ) delle molecole d'acqua, più

veloce che il DOTA e quindi una relassività più alta soprattutto quando il complesso si lega a macromolecole incrementando così il suo  $\tau_R$ . Questa differenza nella velocità di scambio risiede nella geometria dei complessi: mentre i complessi LnDOTA sono presenti per lo più come isomero SAP, i complessi LnDOTMA sono invece principalmente in forma TSAP. In quest'ultima conformazione la  $k_{ex}$  è molto più elevata a causa della distanza un po' più lunga della molecola d'acqua rispetto al centro metallico, con conseguente indebolimento dell'interazione.<sup>144</sup> L'obiettivo di questo capitolo è stato quello di sintetizzare e caratterizzare tre leganti poliaaminocarbossilici simili al DOTMA in cui un braccio metilacetico è rimosso (DO3MA) oppure sostituito da uno acetico (DO3MAAc) o da uno acetammidico (DOTMA-MA) (Figura 26). In particolare, il legante DOTMAMA è stato preparato con lo scopo di ottenere un derivato del DOTMA che abbia la possibilità di essere usato come agente chelante bifunzionale e quindi di essere coniugato a vettori o a sistemi macromolecolari che presentino gruppi carbossilici funzionalizzabili.

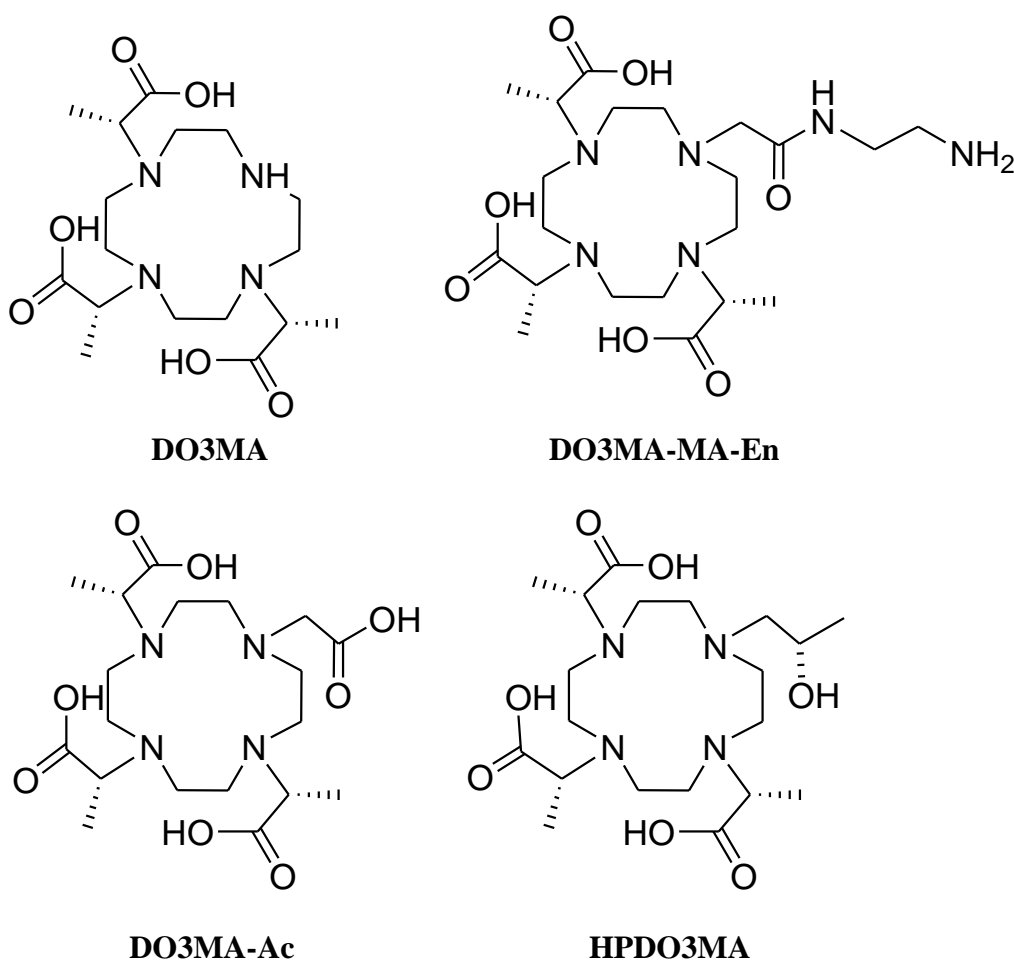


Fig. 26: Formula di struttura dei quattro leganti discussi in questo lavoro



### 3) HPDO3A-derivati:

Il Gd-HPDO3A (ProHance®) è un'agente di contrasto utilizzato per uso clinico. Esso ha tuttavia alcuni parametri non ottimizzati per ottenere rilassività elevate. L'HPDO3A è un legante macrociclo poliamminocarbossilico che differisce dal DOTA per la sostituzione di un braccio acetico con un 2-idrossi propilico. In questo capitolo verranno sintetizzati alcuni leganti in cui invece del gruppo metilico terminale della catena idrossipropilica sono stati inseriti diversi gruppi per modificare la distribuzione elettronica sul gruppo OH coordinante lo ione paramagnetico. In particolare sono stati preparati i seguenti leganti (Figura 27):

- i) un gruppo ammidico per ottenere l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-(2-idrossi propanammido)-4,7,10-triacetico (HPA-DO3A);
- ii) un gruppo estereo per ottenere l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-(metil-2-idrossi propanoato)-4,7,10-triacetico (MHP-DO3A);
- iii) un gruppo estereo spaziato da un ulteriore gruppo CH<sub>2</sub> per ottenere l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-(metil-2-idrossi butanoato)-4,7,10-triacetico (MHB-DO3A);

Di questi leganti sono stati preparati i complesso di Gd(III) che sono stati caratterizzati in dettaglio per via rilassometrica per ottenere più informazioni possibili sulla struttura in soluzione dei complessi. In particolare sono stati misurati: profili NMRD a diverse temperature, la rilassività al variare del pH e velocità di rilassamento trasversali (R<sub>2</sub>) e chemical shift ( $\Delta\omega$ ) <sup>17</sup>O NMR a temperatura variabile.

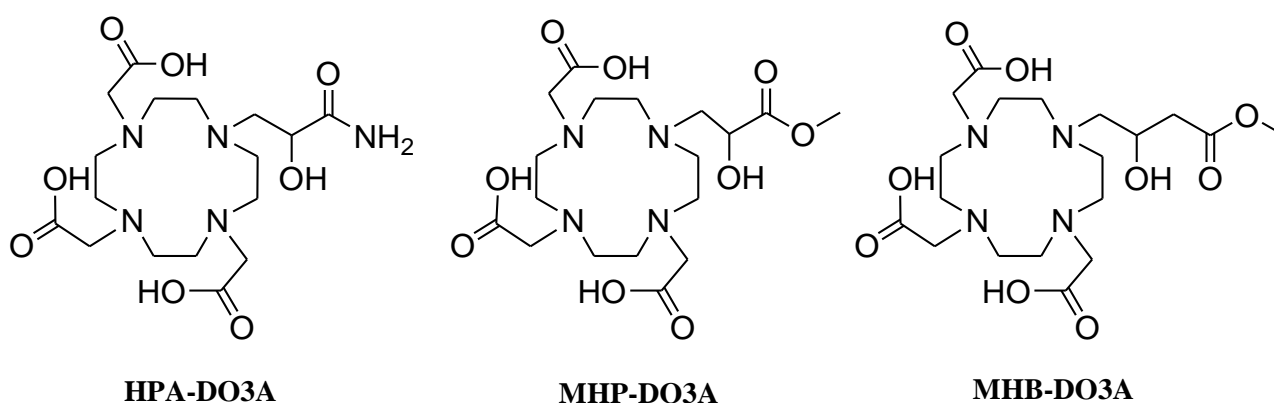


Fig. 27: Struttura dei tre leganti HPDO3A-derivati sintetizzati

# **Capitolo 2**

## **DOTA-mono propionammide (DOTAMAP)-derivati**

## 2.1 Introduzione:

Un legante DOTA-monoammide (DOTAMA) ha come base una struttura simile al DOTA, dove un braccio acetico è sostituito da uno acetammidico. In particolare, se il braccio acetammidico è allungato di un gruppo metilenico si ottiene un legante tipo DOTA-monopropionammide (DOTAMAP). Sia i chelanti DOTA-derivati che i DOTAMA-derivati possiedono una sola molecola d'acqua nella sfera interna di coordinazione ( $q = 1$ ) e hanno una rilassività che rimane nell'intervallo di  $4\text{-}5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 20 MHz (0.47 T) 298 K.

Una delle strategie più utilizzate per aumentare la rilassività è quella di incrementare il peso molecolare del complesso e quindi il tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$ . Questo può avvenire coniugando gli agenti di contrasto a substrati macromolecolari, come ad esempio una proteina, rallentando così la velocità di rotazione del composto ( $1 / \tau_R$ ). Tale interazione può avvenire attraverso o legami covalenti o con altri tipi di legami non covalenti come le interazioni idrofobiche, forze di Van der Waals o interazioni dipolari.

Tuttavia è noto che l'aumento della velocità di rilassamento risulta essere limitato se il complesso possiede una velocità di scambio delle molecole d'acqua ( $k_{ex} = 1 / \tau_M$ ) non sufficientemente elevata ( $\geq 5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ).<sup>129</sup>

Si è deciso quindi di investigare questo tipo di leganti sia da un punto di vista termodinamico/cinetico che rilassometrico, in quanto studi recenti hanno dimostrato che la velocità di scambio ( $k_{ex}$ ) della molecola d'acqua coordinata aumenta di due ordini di grandezza passando dall'acetammide (DOTAMA-En) alla propionammide (DOTAMAP-En) (Figure 28 e 29).<sup>130</sup>

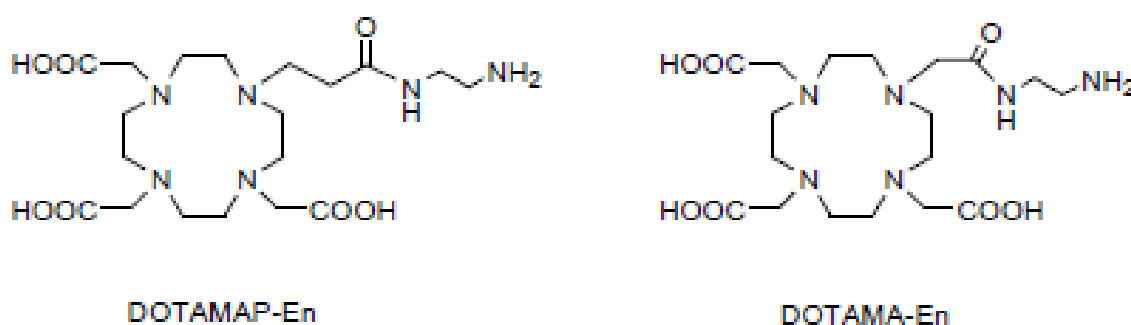


Fig. 28: I due leganti DOTAMAP-En e DOTAMA-En.

Quest'aumento è stato attribuito ad una maggior compressione sterica del sito di coordinazione nel complesso GdDOTAMAP-En, che induce un'accelerazione del processo di scambio, in accordo con i risultati ottenuti da Éva Tóth e il suo gruppo.<sup>131</sup>

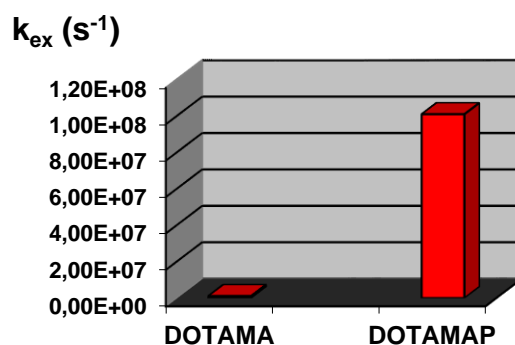
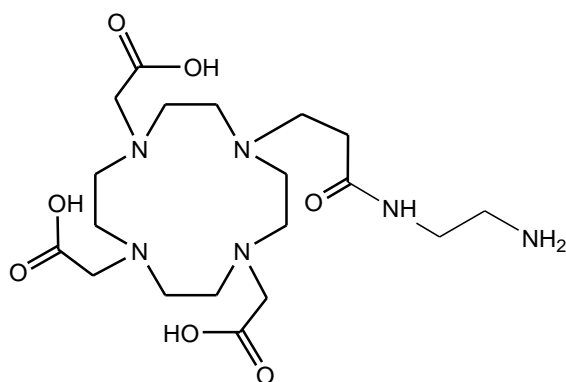


Fig. 29: Rapporto tra le diverse velocità di scambio delle molecole d'acqua

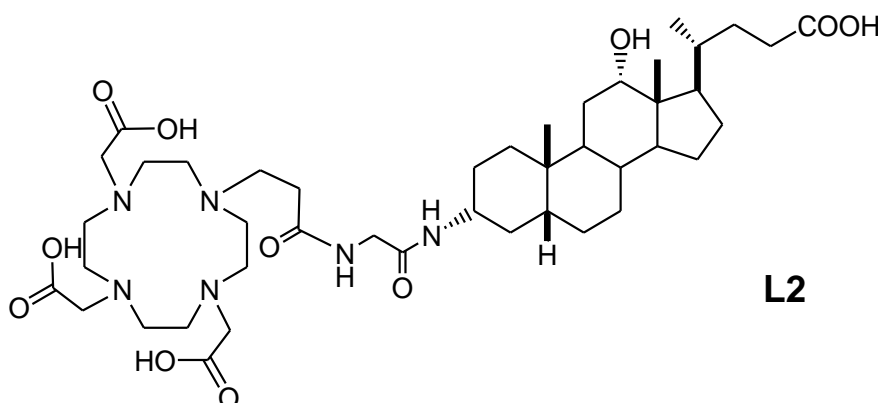
Poiché la sostituzione di un acetamide con una propionammide potrebbe essere accompagnata da una diminuzione indesiderata della stabilità termodinamica e cinetica, è stato necessario analizzare il comportamento in soluzione dei complessi e quindi la costante di stabilità termodinamica del complesso di Gd(III) e successivamente la sua inerzia cinetica rispetto alla dissociazione acido-catalizzata.

Curiosamente, anche se leganti DOTAMA-derivati sono stati ampiamente utilizzati in letteratura, sono stati riportati solo un numero molto limitato di dati termodinamici e cinetici.<sup>132,133</sup>

Si sono quindi sintetizzati due leganti appartenenti a questa classe, il DOTAMAP-En (**L1**) e un suo derivato legato covalentemente all'acido desossicolico, il DOTAMAP-Cholic (**L2**).



**L1**



**L2**

Il legante **L1** ha il vantaggio di poter essere usato come sonda bifunzionale grazie alla presenza di un gruppo amminico che può essere utilizzato per la coniugazione di biomolecole o vettori.

Nel legante **L2** la coniugazione ad un derivato dell'acido colico permette di avere una buona specificità per cellule epatiche, come riportato in letteratura nel caso di un DTPA-derivato funzionalizzato con l'acido colico che ha una elevata escrezione biliare.<sup>134</sup> Inoltre l'acido colico interagisce fortemente con l'albumina, ovvero la proteina più presente nel nostro corpo, andando ad aumentare la rilassività del sistema complesso-proteina (+ 430%), rispetto al complesso da solo perchè il peso molecolare del sistema host-guest aumenta e rallentando la velocità di rotazione molecolare ( $1/\tau_R$ ).

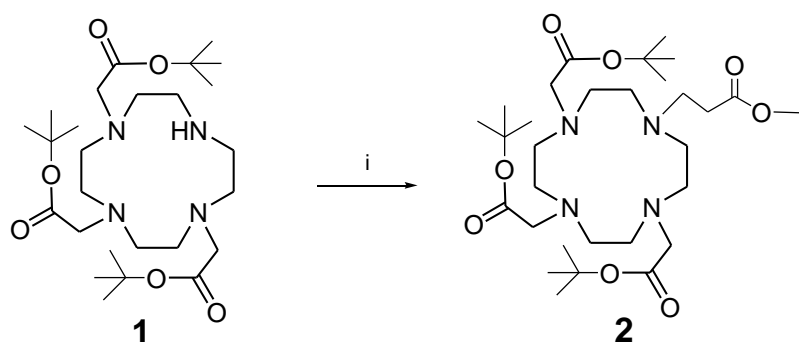
## **2.2 Sintesi:**

Per essere in grado di interagire fortemente con substrati macromolecolari ottenendo così alte rilassività, un chelato GdDOTAMAP-derivato deve essere progettato in modo da avere un gruppo spaziatore tra il complesso e l'unità di targeting più corto e rigido possibile. Per queste ragioni, abbiamo sintetizzato due leganti bifunzionali, uno con un acido carbossilico libero (**5** in Schema 4) che può essere legato covalentemente a specifici vettori biologici recanti un gruppo amminico, mentre l'altro contiene invece un gruppo amminico primario terminale (**L1**) che può legarsi ad un'estremità acida.

Per la sintesi si è partiti dallo stesso precursore, il DO3A(OtBu)<sub>3</sub>, preparato come sale di HBr come riportato in letteratura.<sup>135</sup> Per prima cosa è stato necessario deprotonare preventivamente l'ammina secondaria per poterla funzionalizzare: quindi si è sciolto il precursore in NH<sub>3</sub> acquosa e si è estratto quantitativamente con Etere dietilico.

Per le fasi successive invece si sono seguite due vie differenti.

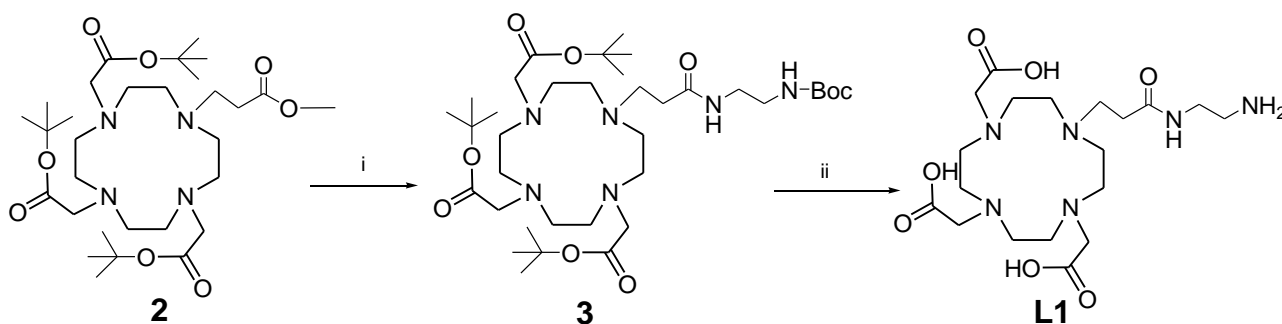
Per la sintesi del legante **L1** si è fatto reagire il DO3A(OtBu)<sub>3</sub> con il metil acrilato in presenza di N,N-diisopropilettilammina (DIPEA) come base, secondo l'addizione di Michael (addizione di un nucleofilo ad un substrato  $\alpha,\beta$  insaturo), come mostrato nello schema sottostante.



Schema 1: i: metil acrilato, 12 h, refluxo

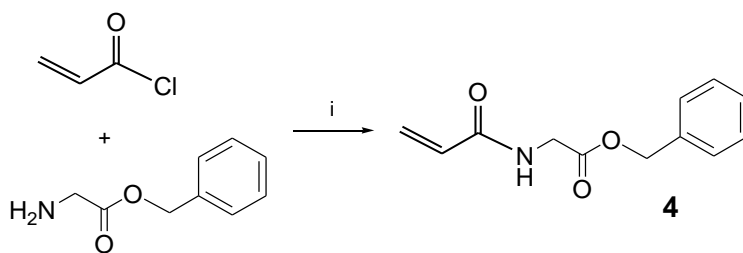
Nonostante il substrato sia stato usato come solvente, quindi in largo eccesso, si nota, attraverso l'analisi MS-ESI<sup>+</sup>, che il prodotto di partenza non è completamente esaurito. L'aumento della durata della reazione non comporta un significativo aumento della resa. Il prodotto è stato quindi purificato via cromatografia gravimetrica su gel di silice usando come eluente CH<sub>3</sub>CN/NH<sub>3</sub> 98:2.

Lo step successivo prevede l'amminolisi del metil estere tramite l'utilizzo dell'Etilendiammina-monoBoc (*N*-terzbutossicarbonil-1,2-diamminoetano). Il prodotto **3** così ottenuto è stato purificato attraverso cromatografia su gel di silice usando come eluente diclorometano:MeOH 9:1. Quindi **3** è stato deproteggato in maniera quantitativa con una miscela 1:1 di acido trifluoroacetico e diclorometano, ottenendo il legante **L1**.



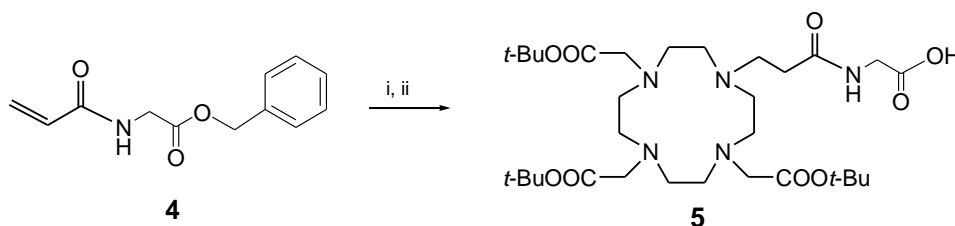
Schema 2: i: EtilendiAmmina-monoBoc, refluxo, 12 h; ii: TFA:DCM, o.n. r.t.

La sintesi di **L2** è iniziata con la formazione di benzil 2-(acrilammide)acetato attraverso l'acilazione con acriloil cloruro in condizioni di Schotten-Baumann, cioè in una miscela bifasica di diclorometano e carbonato di potassio acquoso (Schema 3).



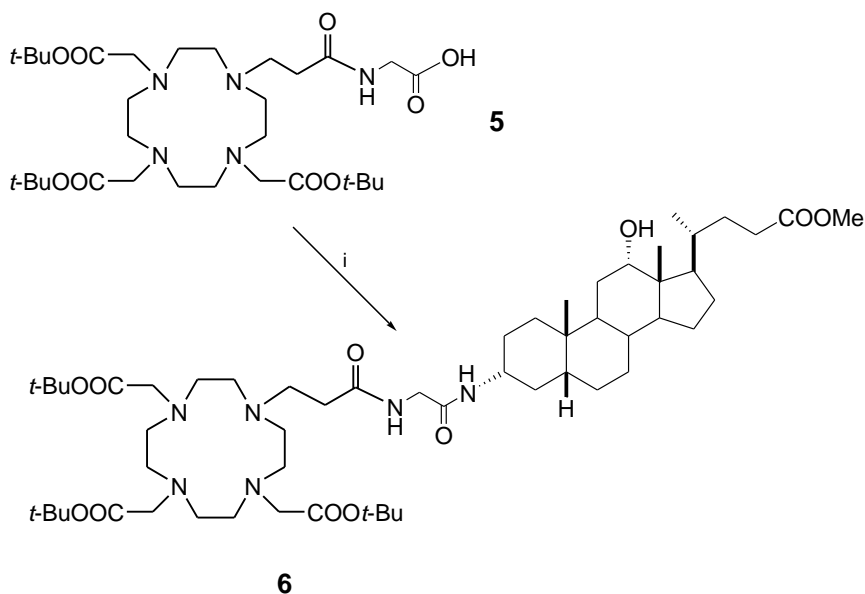
Schema 3: *i*:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$ ;  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$ , 4 h

Lo step successivo prevede l'alchilazione mediante addizione di Michael del  $\text{DO3A}(\text{OtBu})_3$  con il composto **4** seguita dall'idrogenazione Pd/C catalizzata dell'estere benzilico, per ottenere il chelante bifunzionale **5** (Schema 4).



Schema 4: *i*:  $\text{DO3A}(\text{tBu})_3$ ,  $\text{ACN}$ ,  $\text{DIPEA}$ , *reflux*, *o.n.* ; *ii*:  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{MeOH}$ , 4 h, *r.t.*

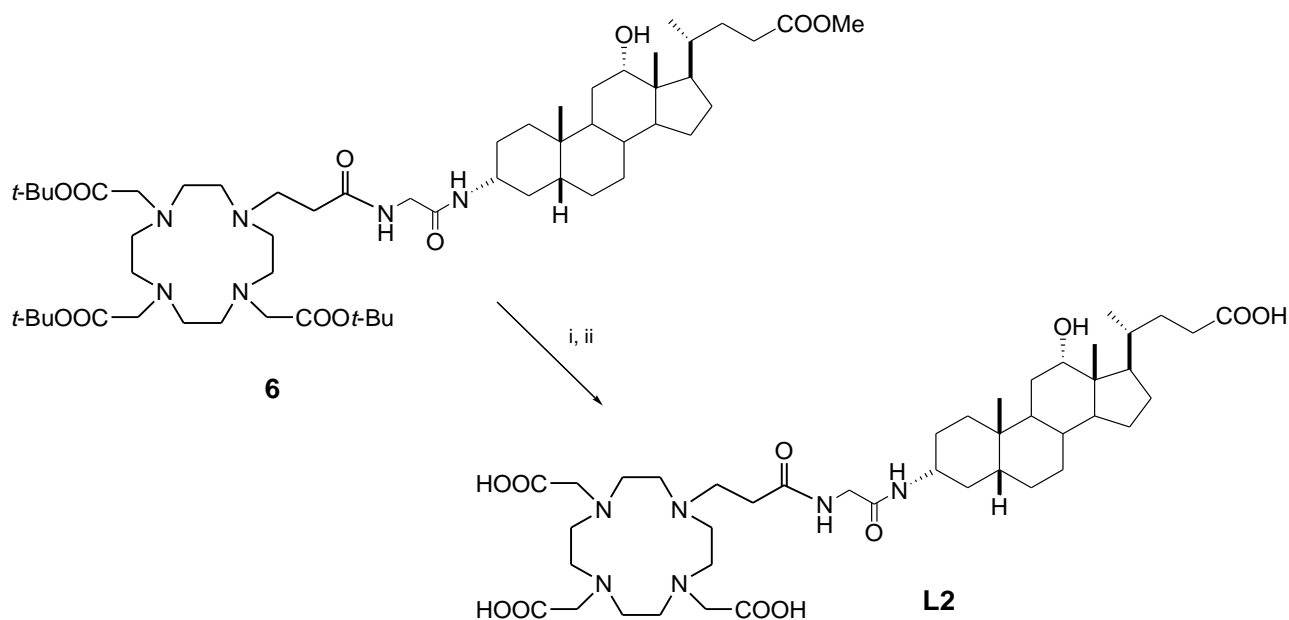
L'estremità acida non protetta del composto **5**, dopo essere stata attivata con HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene] - 1H -1,2,3-triazolo [4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) è stata fatta reagire in presenza di una base (DIPEA), con il metil estere dell'acido (3 $\beta$ , 5 $\beta$ , 12 $\alpha$ ) -3-ammino-12-idrossicolicolico, ottenendo il ligando **6** completamente protetto.



Schema 5: *i* acido aminodeossicolico metil estere,  $\text{DMF}$ ,  $\text{HATU}$ ,  $\text{DIPEA}$ , *r.t.*, *o.n.*

Nell'ultimo step, l'estere metilico dell'acido colico è stata idrolizzato con LiOH in MeOH ed infine, il ligando deprotetto **L2** è stato ottenuto in maniera quantitativa come solido bianco mediante

precipitazione con etere dietilico dopo idrolisi degli esteri *terz*-butilici con TFA:DCM, come mostrato nello schema seguente. **L2** è stato quindi caratterizzato tramite tecniche di ESI-MS e  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR mono e bidimensionali (vedere parte sperimentale).



Schema 6: *i*: LiOH, MeOH, 6 h, r.t. *ii*: TFA:DCM, r.t., o.n.

Il complesso tra il composto **L2** e il Gd(III) è stato sintetizzato aggiungendo un equivalente di una soluzione di  $\text{GdCl}_3$  ad una soluzione del legante, mantenendo il pH a 6,5 con NaOH diluito. La reazione è stata lasciata reagire una notte a temperatura ambiente.

## **2.3 Studio degli equilibri in soluzione:**

### **2.3.1 Costanti di protonazione:**

Visto che l'allungamento del braccio da acetico a propionico, potrebbe portare ad una minore stabilità del complesso, si è deciso di studiare la stabilità in soluzione dei complessi preparati, confrontandoli con i DOTA-monoacetammide derivati, in collaborazione con l'Università di Debrecen (Ungheria). In generale, è noto che la sostituzione nei DOTA-derivati di un gruppo carbossilico carico negativamente con un gruppo ammidico neutro riduce sensibilmente l'affinità del ligando per gli ioni  $\text{Ln}^{3+}$ . Per questo, le costanti di stabilità ( $\log K_{\text{LnL}}$ ) dei complessi monoammidici sono tipicamente di 3-4 ordini di grandezza inferiori rispetto a quelle dei complessi  $\text{LnDOTA}$ -derivati.



Di seguito sono riportati in modo dettagliato i risultati degli studi eseguiti dal gruppo di ricercatori dell'Università di Debrecen sui composti preparati durante il primo periodo di dottorato.

Le costanti di protonazione di H<sub>3</sub>L1, H<sub>3</sub>DOTAMA-En e H<sub>4</sub>DOTA ( $\log K_i^H$ ,  $i = 1, 2 \dots 6$ ) sono definite dall'equazione:

$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]}$$

e sono state determinate per via pH-potenzimetrica. I valori trovati sperimentalmente sono riportati nella tabella 1.

Lo schema di protonazione dei leganti DOTA-derivati è ben noto ed è stato pienamente caratterizzato attraverso metodi spettroscopici e potenziometrici.<sup>136-138</sup>

Si può tranquillamente supporre che i primi atomi ad essere protonati siano gli atomi di azoto del ciclo collocati nelle posizioni opposte dell'anello. La terza e la quarta protonazione coinvolgono invece i gruppi carbossilici delle braccia acetiche legate agli azoti non protonati a causa della maggior separazione della carica e la minor repulsione elettrostatica tra gli atomi donatori.

	H <sub>3</sub> DOTAMA-En	H <sub>3</sub> L1	H <sub>3</sub> DO3A <sup>a</sup>	H <sub>4</sub> DOTA <sup>a</sup>
<b>logK<sub>1</sub><sup>H</sup></b>	11.77	11.00	11.99	11.41
<b>logK<sub>2</sub><sup>H</sup></b>	9.98	9.52	9.51	9.83
<b>logK<sub>3</sub><sup>H</sup></b>	9.33	8.98	4.30	4.38
<b>logK<sub>4</sub><sup>H</sup></b>	4.01	4.59	3.63	4.63
<b>logK<sub>5</sub><sup>H</sup></b>	1.99	3.12	1.84	1.92
<b>logK<sub>6</sub><sup>H</sup></b>	1.53	1.88	–	1.58
<b>ΣlogK<sub>i</sub><sup>H</sup></b>	38.61	39.09	31.26	33.75

Tab. 1: valori delle costanti di protonazione.

<sup>a</sup> Rif: A. Takacs, R. Napolitano, M. Purgel, A. C. Benyei, L. Zekany, E. Brucher, I. Toth, Z. Baranyai and S. Aime, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 2858-2872.

Confrontando le costanti di protonazione di H<sub>3</sub>DOTAMA-En e H<sub>3</sub>DOTAMAP-En (**H<sub>3</sub>L1**), con H<sub>3</sub>DO3A e H<sub>4</sub>DOTA (Tabella 1) indica che i valori di  $\log K_1^H$  e  $\log K_2^H$  sono sostanzialmente comparabili, mentre i valori  $\log K_3^H$  per i primi due complessi sono quasi di cinque ordini di grandezza inferiori di quelle di H<sub>3</sub>DO3A e H<sub>4</sub>DOTA.

Considerando le costanti di protonazione delle β-alaninammide ( $\log K_1^H = 9.32$ )<sup>139</sup> possiamo ipotizzare in modo ragionevole che la terza protonazione per H<sub>3</sub>DOTAMA-En e **H<sub>3</sub>L1** coinvolga l'atomo di azoto del gruppo ammidico della catena laterale del ciclo. Infine, le altre costanti di

protonazione, che corrispondono alla protonazione dei tre gruppi carbossilici, sono simili per tutti e quattro i complessi.

La basicità ( $\Sigma \log K_i^H$ ) di H<sub>3</sub>DOTAMA-En e H<sub>3</sub>L1 è superiore a quella di H<sub>4</sub>DOTA e H<sub>3</sub>DO3A a causa dell'elevata costante di protonazione dell'azoto terminale dell'estremità amminica. Tuttavia, se si sottrae la prima costante di protonazione dal  $\Sigma \log K_i^H$ , si ottengono rispettivamente i risultati di 29.28 e 30.11, valori che sono inferiori al DOTA e paragonabili al DO3A. Da questo ne consegue che la stabilità termodinamica dei complessi dei lantanidi con H<sub>3</sub>DOTAMA-En e H<sub>3</sub>L1 dovrebbe essere significativamente inferiore di quella dei complessi LnDOTA.

Come si può vedere dai valori della logK dei complessi di Gd(III) riportati nella tabella 1, la sostituzione di un braccio acetico (GdDOTA) o acetammidico (GdDOTAMA-En) con una propionammide (GdL1) non è accompagnato da un'eccessiva riduzione della stabilità termodinamica:

	H <sub>4</sub> DOTA	H <sub>3</sub> DOTAMA-En	H <sub>3</sub> DOTAMAP-En
GdL	24,7	20,86	20,22
GdHL	2,8	9,24	9,21
GdH <sub>2</sub> L	6,07	-	-
GdH <sub>3</sub> L	-	4,72	4,21

Tab. 2: Le costanti di stabilità ( $\log K_{ML}$ ) e quelle di protonazione ( $\log K_{MHL}$ )  
Sono state misurate a 25°C e 0.1 M KCl

Spesso, gli equilibri di formazione dei complessi tra leganti macrociclici e ioni Ln<sup>3+</sup> non possono essere studiati attraverso una diretta titolazione pH-potenziometrica a causa della lenta cinetica di complessazione.<sup>140-148</sup> Così, le costanti di stabilità sono state calcolate combinando alla tecnica pH-potenziometrica, la spettrofotometria UV, utilizzando la procedura nota come "fuori cella" (Tabella 2).

	H <sub>3</sub> DOTAMA-En	H <sub>3</sub> L1	H <sub>3</sub> DO3A <sup>a</sup>	H <sub>4</sub> DOTA <sup>b</sup>
--	--------------------------	-------------------	----------------------------------	----------------------------------

<b>LaL</b>	20.49	–	18.63	21.7
<b>LaHL</b>	9.10	–	–	–
<b>CeL</b>	21.24	–	19.7 <sup>c</sup>	23.39
<b>CeHL</b>	8.84	–	–	–
<b>GdL</b>	22.25	20.22	21.56	24.7, 25.3 <sup>d</sup>
<b>GdHL</b>	9.24	8.40	–	–
<b>LuL</b>	21.95	–	21.44	25.4
<b>LuHL</b>	8.90	–	–	–

Tab. 3: Costanti di stabilità ( $\log K_{LnL}$ ) e protonazione ( $\log K_{LnHL}$ ).

Rif. a: A. Takacs, R. Napolitano, M. Purgel, A. C. Benyei, L. Zekany, E. Brucher, I. Toth, Z. Baranyai and S. Aime, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 2858-2872.

b: K. Kumar, C. A. Chang and M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 587-593.

c: W. P. Cacheris, S. K. Nickle and A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, 1987, **26**, 958-960.

d: K. Kumar, C. A. Chang, L. C. Francesconi, D. D. Dischino, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas and M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 3567-3575.

Per i complessi LnDO3A e LnDOTA, le costanti di stabilità per i complessi LnDOTAMA-En aumentano spostandosi da La (III) al Gd (III), rimanendo praticamente costante per più pesanti della serie. Le costanti di stabilità per i complessi LnDOTAMA-En (Ln = La, Ce, Gd, Lu) sono superiori a quelli dei corrispondenti complessi LnDO3A e inferiori a quelli dei LnDOTA, (Tabella 3), questo indica non solo che il gruppo ammidico è coinvolto nel coordinamento degli ioni Ln (III), ma anche che è un donatore più debole rispetto al gruppo carbossilato. Il valore più piccolo della costante di stabilità di GdL1 rispetto a quello di GdDOTAMA-En e GdDO3A può essere descritto sia a causa del valore inferiore della prima costante protonazione di L1 che dalla debole interazione tra l'ossigeno del carbossile dell'ammide e lo ione Gd<sup>3+</sup> associata alla formazione di un anello chelato a sei membri meno stabile. Pertanto, si può concludere che l'introduzione di un gruppo propionammide al posto di un gruppo acetammide in ligandi DOTA-monoammidici ha un marcato effetto sulla cinetica di scambio dell'acqua dei corrispondenti complessi con Gd(III) senza influire in modo netto sulla loro stabilità.

Infine, le costanti di protonazione del gruppo amminico terminale nei complessi LnDOTAMA-En e GdL1 (Tabella 3) sono comparabili con la terza costante protonazione del legante libero ( $\log K_3^H$ ), come previsto per un residuo laterale amminico libero, ovvero non coinvolto nel coordinamento del lantanidi (III).

### 2.3.2 Cinetica di dissociazione:

Come abbiamo già ampiamente detto nei capitoli precedenti, l'inerzia cinetica dei complessi lantanoidei rappresenta un requisito fondamentale per le loro applicazioni *in vivo*. La dissociazione di complessi LnDOTA-derivati è molto lenta e generalmente procede attraverso un percorso assistito dal protone, senza il coinvolgimento di ioni metallo endogeni come Zn (II) e Cu (II).<sup>149-152</sup>

Per ottenere informazioni sull'inerzia cinetica di Gd-DOTAMA-En e GdL1, i complessi sono stati studiati in presenza di un grande eccesso di H<sup>+</sup> ([HCl] = 0,05-1,0 M), per garantire una cinetica di pseudo-prim'ordine.

Considerando le costanti relativamente alte per la protonazione del gruppo amminoetil per i due complessi (logK<sub>GdHL</sub> = 9.24 e 8.40, rispettivamente; Tabella 3), il meccanismo proposto per la dissociazione del gadolinio è mostrato nella figura sottostante.

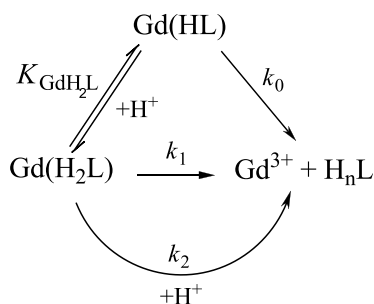


Fig. 30: schema proposto per la dissociazione tramite protonazione dei complessi Gd-DOTAMA-En e Gd-DOTAMAP-En

Nella tabella 4 sono riportate le costanti di velocità e di protonazione che caratterizzano la reazione di dissociazione dei complessi Gd-DOTAMA-En e GdL1 in confronto con i valori di GdDOTA e

GdDO3A riportati in letteratura.<sup>153-154</sup> Vi sono inoltre i tempi di semi-vita ( $t_{1/2}$ ) della dissociazione dei complessi di Gd(III) calcolati a pH=7.4.

	GdDOTAMA-En	GdL1	GdDOTA	GdDO3A
I	1.0 M KCl	1.0 M KCl	0.15 M NaCl	0.1 M KCl
$k_0$ ( $s^{-1}$ )	–	–	$6.74 \times 10^{-11}$	–
$k_1$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$1.83 \times 10^{-6}$	$2.3 \times 10^{-2}$
$k_2$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$(3.1 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	$(3.5 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	–	–
$K_{GdHL}^H$	$1.7 \times 10^9$ (pH-pot)	$2.5 \times 10^8$ (pH-pot)	14 <sup>c</sup>	115
$K_{GdH_2L}^H$	$3.1 \pm 0.5$	$15 \pm 3$	–	–
$k_d$ ( $s^{-1}$ ) pH=7.4	$1.0 \times 10^{-13}$	$8.4 \times 10^{-11}$	$7.3 \times 10^{-14}$	$9.2 \times 10^{-10}$
$t_{1/2}$ (h) pH=7.4	$1.9 \times 10^9$	$2.3 \times 10^6$	$2.6 \times 10^9$	$2.1 \times 10^5$

Tab. 4: costanti di velocità e di protonazione dei complessi studiati

I valori delle costanti di velocità  $k_0$  che descrivono la dissociazione spontanea di  $Gd^{3+}$  dai complessi sono estremamente bassi e caratterizzati da grandi errori; questo sta ad indicare l'irrelevanza della dissociazione spontanea per i complessi monoprotonati.

I valori di  $k_1$  e  $k_2$ , corrispondono alle costanti di dissociazione protone-assistita e differiscono notevolmente tra i complessi di Gd(III) con DOTAMA-En e L1. Il valore  $k_1$  per GdDOTAMA-En è paragonabile a quello di GdDOTA ed è 4 ordini di grandezza inferiore a quella di GdDO3A, a causa

della particolarmente forte coordinazione dell'atomo di ossigeno dell'ammide. D'altra parte, GdL1 mostra un valore di  $k_1$  di quasi tre ordini di grandezza superiore a quello di GdDOTAMA-En. Tuttavia, GdL1 è significativamente più inerte di GdDO3A a causa della coordinazione del braccio propionammidico.

La dissociazione protone-assistita di GdDOTAMA-En e GdL1 procede attraverso la protonazione dei gruppi carbossilati dei complessi. Tuttavia la molecola risultante protonata non è reattiva in quanto il passaggio protonazione / deprotonazione di un gruppo carbossilato è veloce e il gruppo  $\text{COO}^-$  può coordinare nuovamente.

La dissociazione probabilmente si verifica mediante il trasferimento protonico dall'acido carbossilico all'azoto dell'anello. In tale intermedio, il protone sposta lo ione  $\text{Gd}^{3+}$  dalla sua gabbia di coordinazione, provocando la dissociazione del complesso GdL. Le costanti di protonazione ( $K^{\text{H}}_{\text{GdH}_2\text{L}}$ ) di GdDOTAMA-En e GdL1 (Tabella 4) sono relativamente piccole e paragonabili al valore di  $K^{\text{H}}_{\text{GdHL}}$  di GdDOTA, indicando che probabilmente la protonazione avviene sul gruppo carbossilato. Infine, i valori  $t_{1/2}$  di GdDOTAMA-En e GdL1 sono un'ulteriore prova che l'inerzia cinetica dei complessi di Gd(III) è superiore a quella del GdDO3A (Tabella 4).

In conclusione, questi dati suggeriscono che sia GdDOTAMA-En e GdL1 potrebbero rappresentare buone basi per lo sviluppo di sistemi bioconiugati LnDOTA-derivati per le applicazioni di imaging molecolare.

## **2.4 Analisi rilassometriche e interazione con HSA:**

Le analisi rilassometriche su GdL1, con il relativo valore di rilassività è noto in letteratura<sup>131</sup> e i valori dei parametri più importanti sono riportati nella tabella sottostante.

Parameter	GdL1
$^{298}r_{1p}^a / \text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	4.9
$^{298}k_{ex} / \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	$81.2 \pm 1.1$
$\Delta H_M / \text{kJ mol}^{-1}$	$29.7 \pm 1.8$
$\Delta^2 / \times 10^{19} \text{ s}^{-2}$	$3.9 \pm 0.2$
$^{298}\tau_V / \text{ps}$	$15 \pm 3$
$^{298}\tau_{Rg} / \text{ps}$	$79 \pm 3$
$^{298}\tau_{R1} / \text{ns}$	—
$S^2$	—

Tab. 5: Parametri ottenuti dal fitting dei profili NMRD di GdL1. a: 20 MHz

La rilassività longitudinale di GdL2 a 20 MHz e 310 K è  $6.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , in linea con la presenza di un

legame tra il centro metallico e una molecola d'acqua ( $q = 1$ ) e in accordo con i valori di  $r_1$  misurati in identiche condizioni sperimentali per complessi di Gd con  $q = 1$  e di peso molecolare simile. Ad esempio, derivati del GdDOTA e GdDTPA legati all'acido colico, come un GdDTPA-colico ( $r_1 = 6.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>155</sup> e un GdDOTA-colico ( $r_1 \sim 5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>156</sup> Recentemente solo un complesso di Gd(III) formato da un derivato dell'acido desossicolico legato al chelante AAZTA (AAZTA = 6-ammino-6-methylperhydro-1,4-diazepina tetraacetico) ha mostrato un valore di  $r_1$  più elevato a causa della presenza di due molecole d'acqua.<sup>157</sup>

Per determinare i parametri molecolari che causano le proprietà rilassometriche di questo complesso, è necessario analizzare i profili  $^1\text{H}$  NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion).

E' stata misurata la dipendenza di  $r_1$  dal campo magnetico di una soluzione acquosa di GdL2 e dell'addotto supramolecolare con l'albumina di siero umano (HSA) a 298 K, nel range di frequenze 0.01-70 MHz, corrispondenti ad un'intensità del campo magnetico variabile tra i  $2.34 \cdot 10^{-4}$  e 1.64 Tesla (Figura 31).

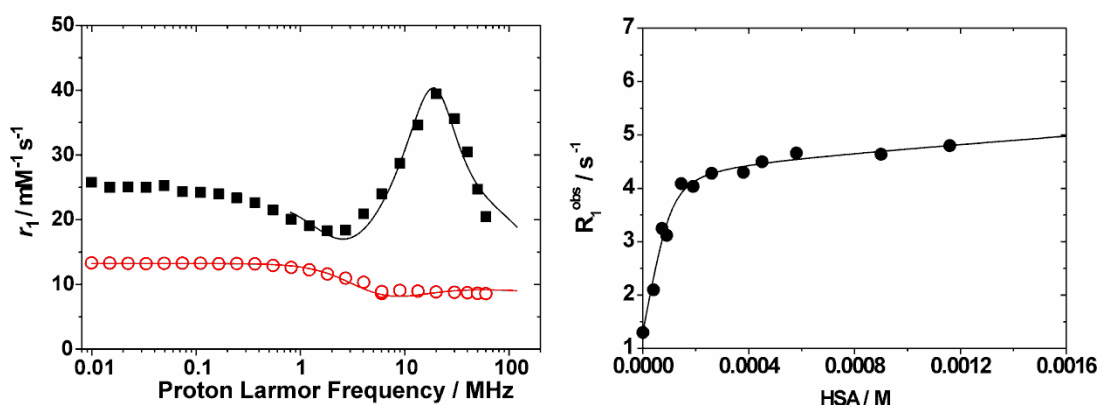


Fig. 31: Sinistra: profilo  $^1\text{H}$  NMRD di GdL2 (cerchi vuoti) e dell'addotto GdL2-HSA (quadrati pieni) a 298 K. Destra: velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua di una soluzione acquosa 0.1 mM di GdL2 in funzione della concentrazione di HSA (20 MHz, 298 K)

I profili mostrano la forma tipica dei complessi a basso peso molecolare, aventi una regione con  $r_1$  costanti a campi bassi, una dispersione intorno a 2-5 MHz e un altro plateau a frequenze più alte ( $> 10$  MHz). I valori inferiori della rilassività a 310 K su tutta la gamma di frequenze analizzate nel profilo, confermano che l' $r_1$  non è limitato dallo scambio dell'acqua, ma piuttosto dal moto di rotazione veloce del complesso. I dati sperimentali sono stati poi analizzati attraverso una procedura di fitting dei minimi quadrati stabilita dalla teoria del rilassamento paramagnetico come la ben nota equazione di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) e il modello di Freed per i contributi rispettivamente della sfera interna/esterna e la rilassività protonica.<sup>158</sup> Alcuni dei parametri coinvolti nella descrizione della dipendenza di  $r_1$  dal campo magnetico possono essere fissati ai valori standard tipici dei chelati GdDOTA-derivati. In particolare, il numero di molecole di acqua coordinate ( $q$ ) è

stato fissato a uno; la distanza di massimo avvicinamento delle molecole d'acqua esterne alla sfera a  $Gd^{3+}$  è stato fissato a  $4,0 \text{ \AA}$ ; il coefficiente di diffusione relativa ( $D$ ) è stato fissato a  $2,24 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (298 K) e alla distanza protonica Gd-acqua ( $r_{Gd-H}$ ) è stato attribuito il valore di  $3,0 \text{ \AA}$ . Inoltre, per la durata scambio ( $\tau_M$ ) abbiamo usato il valore di 12 ns. Abbiamo poi utilizzato  $\Delta^2$ ,  $\tau_V$ , e  $\tau_R$  come parametri regolabili ottenendo come risultati i valori riportati in Tabella 6.

Parameters	GdL2	GdL2-HSA	GdL1 <sup>a</sup>
$\Delta^2 / \times 10^{19} \text{ s}^{-2}$	$3.2 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	3.9
$^{298}\tau_V / \text{ps}$	$21.3 \pm 0.4$	$54.4 \pm 0.2$	15
$^{298}k_{ex} / \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	81.2 <sup>a</sup>	81.2 <sup>a</sup>	81.2
$^{298}\tau_{RG} / \text{ns}$	$0.20 \pm 0.01$	$40 \pm 5$	0.079
$^{298}\tau_{RL} / \text{ns}$	---	$0.64 \pm 0.02$	---
$r_{Gd-H} / \text{\AA}$	3.00*	3.00*	3.00*
$S^2$	---	$0.37 \pm 0.01$	---

Tab. 6: Parametri ottenuti con il fitting dei profili dell'analisi  $^1H$  NMRD di GdL2, GdL2/HSA comparati con GdL1.

<sup>[a]</sup> Per questi parametri sono stati usati rispettivamente i valori di  $q$ , e  $^{298}D$  pari a  $4.0 \text{ \AA}$  e  $2.24 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . \* Valori assunti durante il fitting

Il tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$  è più di due volte maggiore rispetto al valore ottenuto per GdL1 e questo semplicemente riflette il maggiore peso molecolare del derivato dell'acido colico. I parametri associati al rilassamento elettronico,  $\Delta^2$  e  $\tau_V$ , assumono valori piuttosto comparabili a quelli trovati per GdL1, che è un'ulteriore prova di una struttura di coordinazione molto simile. Come accennato in precedenza, l'acido desossicolico forma addotti host-guest con l'HSA con costanti di associazione molto elevate. Poiché l'HSA è una proteina di 66437 Da, la sua interazione reversibile con un complesso di Gd funzionalizzato induce un aumento del tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$  del sistema paramagnetico portando quindi ad un aumento della rilassività. La formazione dell'addotto tra GdL2 e l'HSA è stata studiata mediante la tecnica PRE (proton relaxation enhancement); ciò consiste nel misurare la variazione della velocità di rilassamento longitudinale  $r_1$ , di una soluzione diluita del guest paramagnetico per concentrazioni crescenti dell'host. Con questo metodo si possono determinare i parametri di legame  $K_A$ ,  $n$  (il numero di siti di legame indipendenti),



e  $r_1^b$  (la rilassività dell'addotto supramolecolare). A tal fine, una soluzione 0,1 mM di GdL2 è stata titolata con l'HSA, a 20 MHz e 298 K, e dal fitting dei minimi quadrati di  $R_1$  in funzione della concentrazione di HSA (Fig. 30, a destra) ci ha permesso di calcolare la costante di affinità [ $K_A = (7.8 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ] e la rilassività dell'addotto ( $R_1^b = 38.7 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Questo valore di  $r_1$  è 4.4 volte superiore a quello misurato per il complesso isolato e riflette il rallentamento della rotazione come indicato dalla presenza nel profilo NMRD di un picco stretto centrato intorno 30 MHz (Figura 31, a sinistra). Tuttavia, a differenza di molti dei casi riportati in letteratura, il rallentamento del movimento di rotazione del complesso comporta un grande aumento di  $r_1$  perché l'acqua coordinata scambia velocemente con l'acqua d bulk. Questo è il vantaggio principale del gruppo propionammidico: a partire dai minori effetti sulla stabilità termodinamica, all'effetto di livellamento del lungo  $\tau_M$ , fino al raggiungimento di elevati valori di rilassività. In realtà, si osserva che il valore di  $r_1$  supera quelli riportati per altre complessi di Gd(III) legati all'HSA con  $q = 1$ , recanti un residuo dell'acido colico. In particolare, un recente lavoro ha dimostrato che il sistema acido GdAAZTA-colico diminuisce il suo stato di idratazione (da 2 a 1) in seguito all'interazione con la proteina e l' $r_1$  dell'addotto host-guest è solo  $29.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (20 MHz, 298 K). Nello stesso articolo è stato riportato un valore di  $r_1$  di  $26,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con  $q = 1$  per un complesso GdDTPA-derivato che porta lo stesso residuo di acido colico, in condizioni sperimentali analoghe. L'analisi del profilo NMRD richiede l'uso del modello Lipari-Szabo incorporato nelle equazioni SBM per il meccanismo di rilassamento IS.<sup>159</sup>

Questo modello permette di tener conto del contributo di un moto locale più veloce ( $\tau_{RL}$ ) della gabbia di coordinazione sul gruppo legato sovrapposto alla rotazione complessiva dell'addotto supramolecolare paramagnetico ( $\tau_{RG}$ ). La correlazione dei due tipi di movimenti è descritto dal parametro  $S^2$ , il cui valore può variare tra zero (movimenti completamente indipendenti) ed uno (movimenti totalmente correlati). I parametri di best-fit, riportati in Tabella , indicano un grado di rotazione interna relativamente ristretto del gruppo deossicolico intorno al sito di legame. Allo stesso tempo, è chiaro che la rilassività ai campi dell'imaging biomedico (1.5 - 3 T) è dominata dalle rotazioni locali ( $\tau_{RL}$  e  $S^2$ ) piuttosto che dallo scambio della molecola d'acqua legata al complesso.

## **2.5 Conclusioni:**

I risultati più importanti riportati in questo capitolo sono i seguenti:

1) Il complesso Gd-DOTAMAP-En (GdL1) mostra una velocità di scambio dell'acqua coordinata quasi due ordini di grandezza maggiore rispetto al corrispettivo DOTA-monoacetammide derivato senza compromettere la buona stabilità termodinamica. GdL1 mostra tuttavia una minore inerzia cinetica in condizioni acide rispetto all'analogo Gd-DOTAMA-En.

2) Il legante L1 protetto o il legante 5 presentano rispettivamente una funzionalità amminica e una carbossilica libere. Queste permettono la loro facile coniugazione a vettori biologici o ad altri carrier permettendone l'uso come agenti chelanti bifunzionali in applicazioni di Imaging Molecolare. Le stesse molecole una volta complessate (i.e. GdL1), visto che i gruppi amminico e carbossilico rispettivamente di GdL1 e Gd5 (in realtà tale complesso non è stato preparato, ma in linea teorica potrebbe essere preparato facilmente), non partecipano alla complessazione dello ione lantanoideo.

3) Il legante 5 è stato coniugato ad un acido desossicolico, in quanto questo risulta essere uno dei migliori gruppi in grado di portare l'agente di contrasto dentro gli epatociti, con un'efficienza migliore dei corrispettivi colilglicina e colilaurina.<sup>160</sup> La presenza dell'acido colico nel complesso GdL2 permette l'interazione non covalente con i siti di legame idrofobici dell'albumina del siero umano (HSA). Il legame non covalente con le proteine del plasma permette da una parte di ottenere rilassività elevate a causa dell'aumento del  $\tau_R$ , e dall'altra mostra un incremento della permanenza dell'agente paramagnetico nel sistema vascolare per analisi angiografiche via MRI. Lo studio delle proprietà rilassometriche in soluzione acquosa dell'interazione supramolecolare fra GdL2 e HSA, ha mostrato un aumento del 430% della velocità di rilassamento rispetto a quella del complesso isolato. Quindi, l'effetto combinato della elevata velocità di scambio e dell'aumento di  $\tau_R$  ha portato ad ottenere valori di rilassività molto elevati rispetto ad altri sistemi  $q = 1$  interagenti con HSA.

## **2.6 Parte Sperimentale:**

### **2.6.1 Materiali e metodi:**

Tutti i reattivi sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione così come acquistati dal produttore, eccetto i casi specificati.

Le reazioni che richiedevano condizioni anidre sono state condotte sotto atmosfera di azoto.

Col termine "H<sub>2</sub>O" si intende acqua di elevata purezza con conduttività di 0.04  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , ottenuta tramite sistema di purificazione "MILLI-Q".

Le misure di pH sono state effettuate usando un pH-metro Hanna 211 e un elettrodo Aldrich Chemical Company micro-pH combinati, calibrati usando soluzioni tampone a pH 4, 7 e 10. Gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro JEOL ECP 400 ( $^1\text{H}$  a 399.968 MHz,  $^{13}\text{C}$  a 100.572 MHz).

Gli spettri di massa ESI (Electro-Spray Ionization) sono stati acquisiti con un 3100 Mass Detector (Waters), operante in modalità positiva o negativa, usando acido formico 1% v/v in metanolo come solvente vettore.

Le misure di velocità di rilassamento protonico ( $1/T_1$ ) ed i profili  $1/T_1$  NMRD sono stati ottenuti con un rilassometro a ciclo di campo rapido Stellar Smart Tracer che opera su campi magnetici compresi tra 0.01 e 10 MHz (0.00024 to 0.25 T). Il rilassometro è controllato da computer con un'incertezza assoluta in  $1/T_1$  del  $\pm 1\%$ . Data points aggiuntivi nel range 20-70 MHz (0.37-1.75 T) sono stati ottenuti con una console Stellar Spinmaster connessa ad un magnete WP-80 (80 MHz, 2 T).

In generale, per determinare i parametri rilassometrici correlati ad un complesso di Gd(III) è necessario acquisire alcuni dati e poi analizzarli in funzione di formule matematiche che permettano di estrapolare i parametri di interesse. In primo luogo è necessario misurare la variazione della velocità di rilassamento longitudinale dell'acqua (relattività,  $r_{1p}$ ) in presenza del complesso paramagnetico in funzione del campo magnetico applicato (intervallo 0.01-70 MHz, corrispondente a 0.00024 – 1.26 T) per ottenere il cosiddetto profilo di dispersione di risonanza magnetica nucleare (profilo NMRD). Tale profilo può essere analizzato in base alla teoria di Solomon-Bloembergen-Morgan (teoria SBM) del rilassamento paramagnetico. Tale teoria descrive la modulazione dell'interazione dipolare tra lo spin nucleare dei protoni dell'acqua e lo spin elettronico dello ione paramagnetico in termini di numerosi parametri, tra cui i più importanti sono il tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$ , il numero di molecole di acqua di sfera interna  $q$  ed la loro velocità di scambio  $k_{ex}$ .

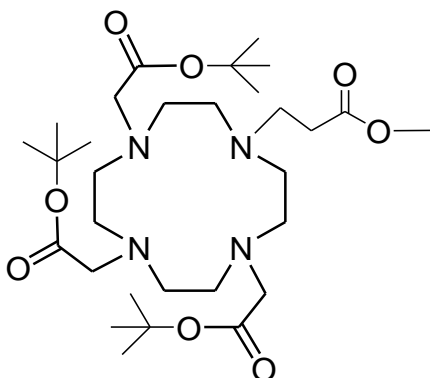
In parallelo, per determinare con accuratezza la velocità di scambio della molecola di acqua coordinata è necessario acquisire il cosiddetto profilo  $^{17}\text{O}$  NMR. Esso consiste nella misura dei tempi di rilassamento trasversali ( $R_2$ ) del nucleo  $^{17}\text{O}$  (di acqua marcata in  $^{17}\text{O}$ ) coordinato allo ione paramagnetico in funzione della temperatura (fra 275 e 345 K) di una soluzione circa 10 mM del complesso (in generale, tale misura viene effettuata ad alto campo magnetico, p.e. 500 MHz). I profili  $^{17}\text{O}$  NMR possono essere analizzati in base alle equazioni di Swift-Connick che danno conto della dipendenza di  $R_2$  dalla temperatura.

I profili NMRD delle soluzioni preparate sono stati misurati a 298 K e a 310 K nell'intervallo 0.01-70 MHz (corrispondente a 0.00024 – 1.26 T), mentre i profili  $^{17}\text{O}$  NMR sono stati ottenuti su soluzioni acquose concentrate dei complessi (circa 10 mM) contenenti circa il 2% di  $^{17}\text{OH}_2$ . I dati sono stati

analizzati simultaneamente secondo le teorie SBM e Swift-Connick ed i migliori parametri ottenuti sono riportati nei capitoli seguenti.

## 2.6.2 DOTAMAP-En:

- **DO3A(Ot-Bu)<sub>3</sub>-propionato di metile (2)**



1 eq di DO3A (1) (0.900 g, PM = 514.7 g/mol, n = 1.75\*10<sup>-3</sup> mol) e 3 eq di DIPEA (5.25\*10<sup>-3</sup> mol, PM= 129.25 g/mol, g= 0.678) sono sciolti in 5 mL di Metil Acrilato. La soluzione è stata agitata per 12 ore a 90°C. Il grezzo ottenuto è stato purificato attraverso una colonna cromatografica, utilizzando come eluente una miscela di ACN:NH<sub>3</sub> (98:2). Le frazioni contenenti il prodotto sono state seccate *in vacuo* ottenendo infine il DO3A(Ot-Bu)<sub>3</sub>-propionato di metile.

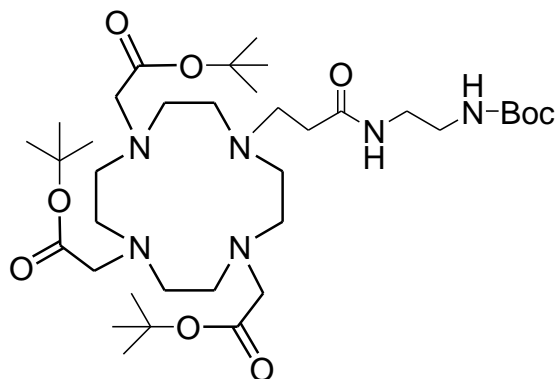
Resa: 450mg, P.M.=600.8 g/mol; resa = 43%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H<sup>+</sup>] = 601.41 ; trovata = 601.95

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.48 (s, 27H, CH<sub>3</sub>); 2.69-2.78 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.15-3.46 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.25-3.30 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.40 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO); 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 28.19 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 30.75 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 46.31 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 44.10 – 48.57 ( $\text{CH}_2$  ring); 51.98 ( $\text{OCH}_3$ ); 55.34 ( $\text{NCH}_2\text{CO}$ ); 79.81 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 171.11 ( $\text{COOCH}_3$ ); 175.55 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ )

• **DOTAMAP(Ot-Bu)<sub>3</sub>-En-Boc (3):**



1 eq del composto **2** (0.156 g, PM = 600.8 g/mol,  $n=2.60 \cdot 10^{-4}$  mol) sono stati messi a reagire con 1 mL di Etilen-diAmmino-monoBoc (PM=160.21 g/mol) per 12 ore ad una temperatura di 60 °C. Lo sviluppo della reazione è stato seguito attraverso l'analisi ESI-MS, e il prodotto così ottenuto è stato purificato con una colonna cromatografica di silica-gel, usando come miscela di eluenti DCM:MeOH 9:1. Il composto **3** dopo essere stato seccato al rotavapor è stato quindi caratterizzato via NMR.

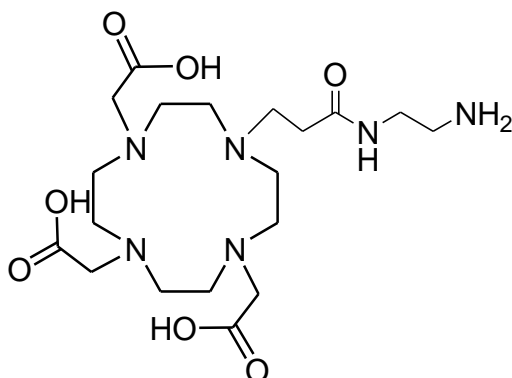
Resa: 50mg, P.M.=727.95 g/mol; resa = 26.5%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per  $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}^+] = 729.11$  ; trovata = 729.2

$^1\text{H}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 1.29 (s, 27H,  $\text{CH}_3$ ); 1.37 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc); 2.24-2.27 (m, 2H  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2.30-2.36 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2.35-2.40 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 3.10-3.31 (m, 16H,  $\text{CH}_2$  ring); 3.20-3.29 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 3.53 (s, 6H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 28.21 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 29.54 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  Boc); 30.75 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 39.41 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 44.45 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 44.99 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 46.85 – 48.71 ( $\text{CH}_2$  ring); 55.34 ( $\text{NCH}_2\text{CO}$ ); 78.50 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  Boc); 79.81 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 155.89 ( $\text{CO}$  Boc); 169.23 ( $\text{CONH}$ ); 173.37 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ );

- **DOTAMAP-En (L1):**



1 eq del legante protetto (0,100 g; PM=727.95 g/mol,  $n = 1.37 \cdot 10^{-4}$ ) sono stati sciolti in una miscela di TFA:DCM (3 mL: 3 mL) lasciando la reazione in agitazione una notte a temperatura ambiente. La reazione è stata successivamente seccata e ripresa con DiEtil Etere (3 mL). Il precipitato è stato separato dal surnatante, è stato sciolto in acqua e si portato il pH a circa 7 con NaOH 1M. La soluzione è stata liofilizzata e il legante è stato caratterizzato attraverso l'analisi NMR.

Resa: 60 mg, P.M.=460.53 g/mol; resa = 95%

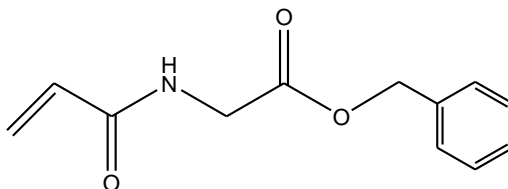
ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H<sup>+</sup>] = 461.27 ; trovata = 461.72

<sup>1</sup>H NMR, H<sub>2</sub>O,  $\delta$  (ppm): 2.57-2.61 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 2.75-2.81 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 2.99-3.01 (m, 2H NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3.02-3.15 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.25-3.28 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3.81 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO);

<sup>13</sup>C NMR, H<sub>2</sub>O,  $\delta$  (ppm): 32.58 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 39.27 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 44.15 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 46.87 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 47.01 – 48.71 (CH<sub>2</sub> ring); 56.01 (NCH<sub>2</sub>CO); 175.57 (CONH); 179,41 (COOH);

### 2.6.3 DOTAMAP-Cholic:

- **Benzil 2-(N' acrilammide)ammino acetato (4)**



Una soluzione di acriloil cloruro (300  $\mu$ L; 3.67 mmol), sciolto in DCM anidro (5 mL) è aggiunta lentamente a 0°C a una soluzione di 2-Ammino-Benzil Acetato (1,03 g; 7,23 mmol) sciolto anch'esso in DCM anidro (15 mL) con  $K_2CO_3$  (1,5 g; 11.01 mmol), sotto flusso di  $N_2$ . La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un'ora, dopo si è filtrato e poi si è rimosso il solvente mediante rotavapor.

Successivamente si è sciolto il grezzo con 10 mL di DCM e si è lavato con HCl 0,1 M (3 x 5mL), anidrificato con Solfato di Sodio, filtrato e seccato *in vacuo*, ottenendo così il Benzil 2-(N' acrilammide)ammino acetato.

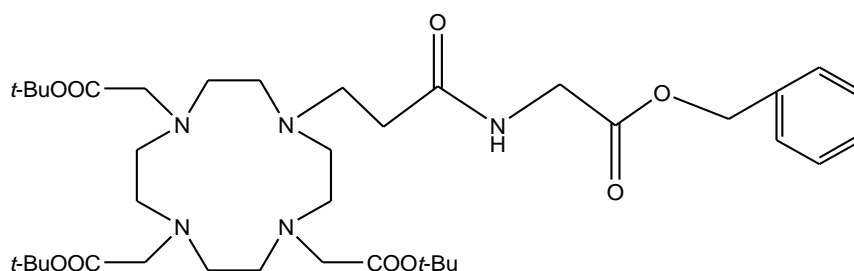
Resa: 439mg, P.M.=219.14 g/mol; resa=55%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per  $C_{12}H_{14}NO_3$   $[M+H]^+ = 220,24$ ; trovata = 220.12.

<sup>1</sup>H NMR,  $CDCl_3$   $\delta$  (ppm): 4.14 (s, 2H,  $NHCH_2CO$ ), 5.18 (s, 2H,  $CH_2$  benzyl); 5,64 - 5.67 (m, 2H,  $CH_2=CH$ ); 6.11 – 6.37 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 7.33 – 7.35 (m, 5H, CH benzyl).

<sup>13</sup>C NMR,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm): 41.53 ( $NHCH_2CO$ ), 67.38 ( $CH_2$  benzyl); 127.41 ( $CH_2=CH$ ); 128.27 (CH benzyl); 130.19 ( $CH_2=CH$ ); 135.18 (C benzyl), 165.71 ( $CONHCH_2$ ) 169.98 ( $COOBn$ )

- **DOTAMAP(OtBu)<sub>3</sub>-Gly-Bn (5)**



Una soluzione di DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (0.1 g; 0.19 mmol), DIPEA (99  $\mu$ L; 0.57 mmol) e di Benzil 2-(N' acrilammide)amino acetato (83 mg; 0.38 mmol), sciolti in ACN (5 mL) è agitata a refluxo per tutta la notte. Il prodotto così ottenuto è stato purificato con una colonna cromatografica di silica gel, utilizzando come eluente una miscela di DCM:MeOH 95:5 ottenendo così il DOTAMAP-Gly-Bn

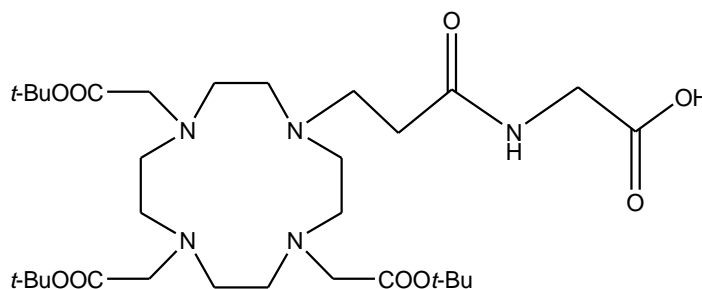
Resa: 55mg, P.M.=733.93 g/mol; resa=40%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 734.93; teorica = 735.04

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub>  $\delta$  (ppm): 1.42 (s, 27H, CH<sub>3</sub>); 2.66-2.74 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.05-3.26 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.28-3.30 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.36 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO); 4.66 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 5.23 (s, 2H, CH<sub>2</sub> benzyl); 7.25 – 7.34 (m, 5H, CH benzyl).

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  (ppm): 28.25 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 29.75 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 43.31 (NHCH<sub>2</sub>CO); 48.31 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 52.10-52.21 (CH<sub>2</sub> ring); 61.2 (NCH<sub>2</sub>CO); 65.23 (CH<sub>2</sub> benzyl); 81.24 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 127.76 (CH benzyl); 141.18 (C benzyl), 166.98 (CONHCH<sub>2</sub>); 170.88 (COOBn); 171.2 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

- **DOTAMAP(OtBu)<sub>3</sub>-Gly**





Ad una sospensione di DOTAMAP-Gly-Bn (730 mg, 1 mmol) in MeOH (15 mL), si è aggiunto Pd/C (10% p/p, 75 mg). La reazione è lasciata ad agitare per tre giorni sotto H<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Dopo si è aggiunto HCOONH<sub>4</sub> (189 mg, 3 mmol) e la reazione è scaldata a riflusso per un altro giorno.

La soluzione finale è stata filtrata su celite e concentrata al rotavapor.

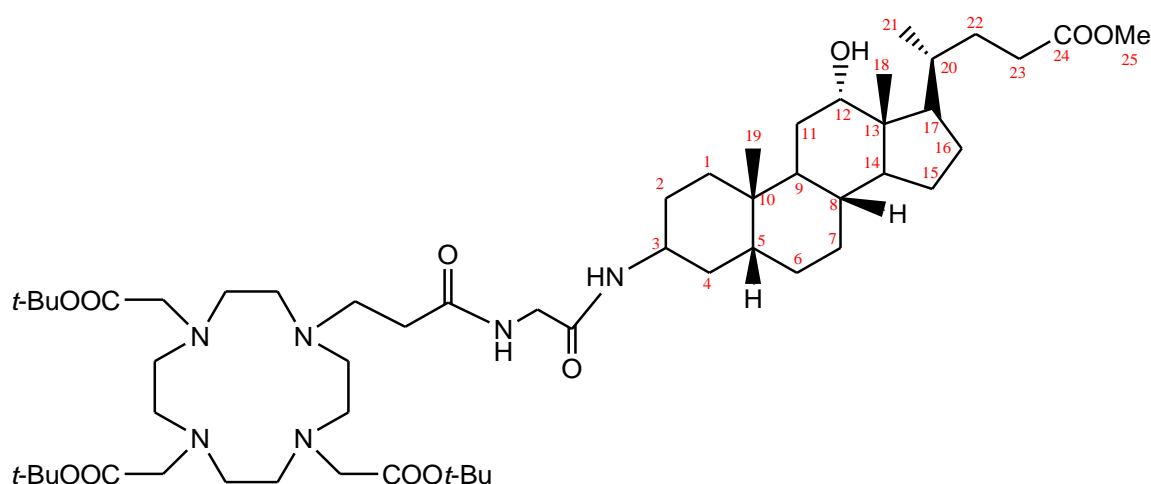
Resa: 643mg, P.M.=643,81 g/mol; resa=100%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>31</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 644,81; trovata = 645.12

<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 1.38 (s, 27H, CH<sub>3</sub>); 2.70-2.73 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.01-3.35 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.31-3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.43 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO); 4.71 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>COOH).

<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 28.38 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31.41 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 45.21 (NHCH<sub>2</sub>CO); 49.02 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 52.01-52.74 (CH<sub>2</sub> ring); 60,1 (NCH<sub>2</sub>CO); 81.75 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 166.98 (CONHCH<sub>2</sub>); 170,8 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 173.25 (COOH).

- **DOTAMAP(OtBu)<sub>3</sub>-Gly-Cholic-Me (6):**



Al composto DOTAMAP-Gly (302 mg, 0.47 mmol) disciolto in DMF (20 mL), si sono aggiunti 2 eq di 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU, 535 mg, 1.41 mmol) e DIPEA (163 μL, 0.94 mmol). Infine si è aggiunto l'acido (3β,5β,12α)-3-Ammino-12-idrossicolan-24-oico metil estere (198 mg, 0.47 mmol).

La reazione è scaldata a riflusso per una notte. Successivamente si è evaporato il solvente e il grezzo di reazione è stato purificato con una colonna cromatografica impaccata con silica gel ed usando come eluente la miscela DCM:MeOH (95:5), per ottenere il DOTAMAP(OtBu)<sub>3</sub>-Gly-Cholic-Me

Resa: 162mg, P.M.=1047.41 g/mol; resa=33%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>56</sub>H<sub>99</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1048,41; trovata = 1048.50

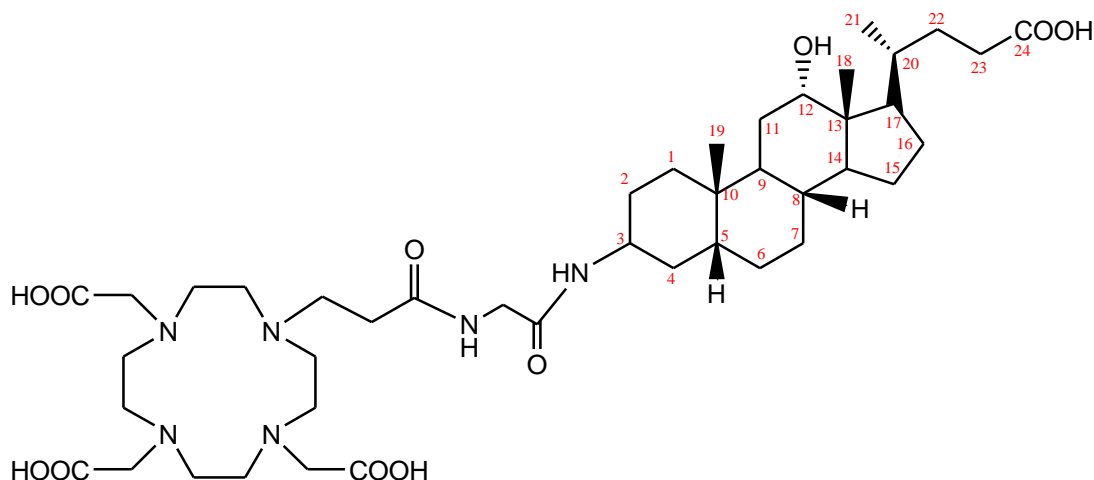
<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): cholic (valori riportati in tabella); 1.47 (s, 27H, CH<sub>3</sub>); 2.58-2.71 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.13-3.19 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.25-3.32 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.35 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO); 4.68 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>COOH)

<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): cholic (valori riportati in tabella); 28.10 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31.07 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 46.00 (NHCH<sub>2</sub>CO); 49.17 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 52.01-53.14 (CH<sub>2</sub> ring); 61,8 (NCH<sub>2</sub>CO); 81.91 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 164.78 (CONHCH<sub>2</sub>); 167.41 (CONHcholic); 169.5 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

TABELLA: Cholic <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm):

Carbon	Type	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	Carbon	Type	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)
<b>1</b>	CH <sub>2</sub>	37.69	0.99-1.80	<b>14</b>	CH	44.33	1.82
<b>2</b>	CH <sub>2</sub>	32.05	1.38-1.65	<b>15</b>	CH <sub>2</sub>	25.76	1.12-1.71
<b>3</b>	CH	74.65	3.25	<b>16</b>	CH <sub>2</sub>	30.06	1.31-1.95
<b>4</b>	CH <sub>2</sub>	41.18	1.70-2.07	<b>17</b>	CH	49.39	1.72
<b>5</b>	CH	43.93	1.44	<b>18</b>	CH <sub>3</sub>	14.94	0.71
<b>6</b>	CH <sub>2</sub>	36.67	1.55-1.97	<b>19</b>	CH <sub>3</sub>	24.92	0.90
<b>7</b>	CH	71.12	3.89	<b>20</b>	CH	38.32	1.41
<b>8</b>	CH	42.09	1.58	<b>21</b>	CH <sub>3</sub>	19.57	0.98
<b>9</b>	CH	29.17	2.13	<b>22</b>	CH <sub>2</sub>	35.11	1.28-1.68
<b>10</b>	C	37.19		<b>23</b>	CH <sub>2</sub>	37.30	1.91-2.14
<b>11</b>	CH <sub>2</sub>	30.52	1.59	<b>24</b>	C	169.35	
<b>12</b>	CH	75.98	4.05	<b>25</b>	CH <sub>3</sub>	51.9	3.67
<b>13</b>	C	48.93					

- **DOTAMAP-Gly-Cholic (L2):**



Il DOTAMAP(OtBu)<sub>3</sub>-Gly-Cholic-Me (160 mg, 0.15 mmol) è per prima cosa disciolto in DCM:TFA (1:1 v/v 2mL : 2mL) e lasciato in agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente. Dopo, la soluzione è stata evaporata *in vacuo*, si è aggiunto Et<sub>2</sub>O e si è notata la formazione di un precipitato. Si è filtrata la soluzione e il precipitato è stato lavato tre volte con Et<sub>2</sub>O. Successivamente si è ridisciolto in acqua (5 mL) e il pH è stato portato a circa 11 con NaOH 1M, lasciando la reazione in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente. Infine si è liofilizzato il tutto ottenendo il legante DOTAMAP-Gly-Cholic.

Resa: 136mg, P.M.=865.06 g/mol; resa = 99%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>43</sub>H<sub>73</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 866,06; trovata 866.20

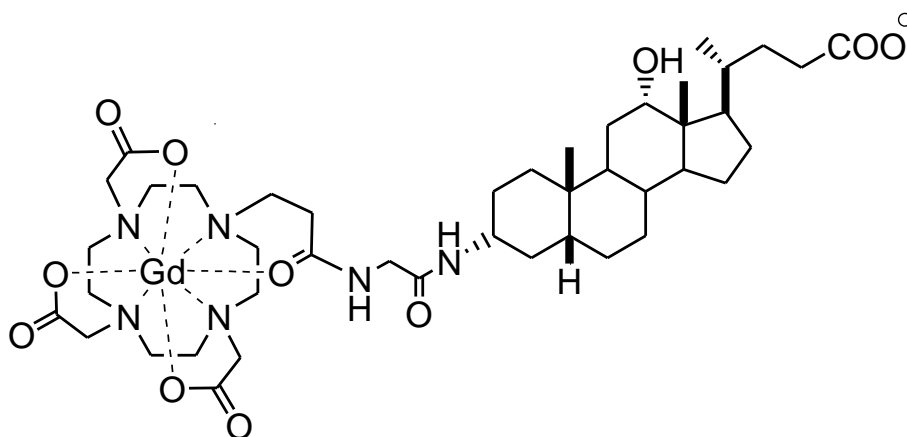
<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): cholic (tabella); 2.66-2.79 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.46-3.59 (m, 16H, CH<sub>2</sub> ring); 3.61-3.65 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 3.69 (s, 6H, NCH<sub>2</sub>CO); 4.88 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>COOH)

<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): cholic (tabella); 31.98 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 46.58 (NHCH<sub>2</sub>CO); 50.12 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 52.99-53.48 (CH<sub>2</sub> ring); 62.0 (NCH<sub>2</sub>CO); 170.41 (CONHcholic); 173.98 (CONHCH<sub>2</sub>);

TABELLA: Cholic  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm):

Carbon	Type	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)	Carbon	Type	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)
1	$\text{CH}_2$	37.69	0.99-1.80	13	C	48.93	
2	$\text{CH}_2$	32.05	1.38-1.65	14	CH	44.33	1.82
3	CH	74.41	3.48	15	$\text{CH}_2$	25.76	1.12-1.71
4	$\text{CH}_2$	41.18	1.70-2.07	16	$\text{CH}_2$	30.06	1.31-1.95
5	CH	43.93	1.44	17	CH	49.39	1.72
6	$\text{CH}_2$	36.67	1.55-1.97	18	$\text{CH}_3$	14.94	0.71
7	CH	71.12	3.89	19	$\text{CH}_3$	24.92	0.90
8	CH	42.09	1.58	20	CH	38.32	1.41
9	CH	29.17	2.13	21	$\text{CH}_3$	19.57	0.98
10	C	37.19		22	$\text{CH}_2$	35.11	1.36-1.72
11	$\text{CH}_2$	30.52	1.59	23	$\text{CH}_2$	37.30	2.09-2.23
12	CH	75.98	4.05	24	C	187.24	

- **Gd-DOTAMAP-cholic (Gd-L2):**



1 eq. di legante DOTAMAP-Gly-cholic (30 mg,  $\text{PM} = 1002.28$  g/mol, 0.03 mmol), è stato sciolto in 1 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  a cui sono stati aggiunti 1 eq. di  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ . Dopo aver portato il pH al valore di circa 7, la reazione è lasciata in agitazione una notte a temperatura ambiente. Successivamente si è portata a  $\text{pH} = 9$  per tre ore e poi filtrata. La soluzione è stata seccata mediante liofilizzazione.

Il complesso è stato infine caratterizzato per via rilassometrica.

# **Capitolo 3**

## **DOTMA-derivati**

### 3.1 Introduzione

Il DOTMA è l'analogo del DOTA avente quattro metili in posizione  $\alpha$  sulle braccia acetiche (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrametilacetic acid). In letteratura sono presenti pochi articoli riguardanti il DOTMA probabilmente perché più complicato da sintetizzare e perché si introducono nuovi centri chirali nel complesso.

Un esempio di DOTMA-derivato lo si può trovare in un lavoro di Parker,<sup>159</sup> dove si funzionalizzano le quattro braccia acetiche del DOTMA, invece che con un metile, con un braccio propil carbossi. L'estremità avente l'acido carbossilico libero e non coordinante è usata per ottenere dei dendrimeri. Tra i casi riportati di agenti bifunzionali DOTMA-derivati, possiamo trovare un recente lavoro di Wiener<sup>160</sup> in cui si funzionalizza in modo selettivo un solo atomo di azoto, come nei leganti discussi in questo capitolo, andando a creare così un legante avente un braccio laterale con la funzione di spaziatore e contenente un'azide o un'ammina terminale.

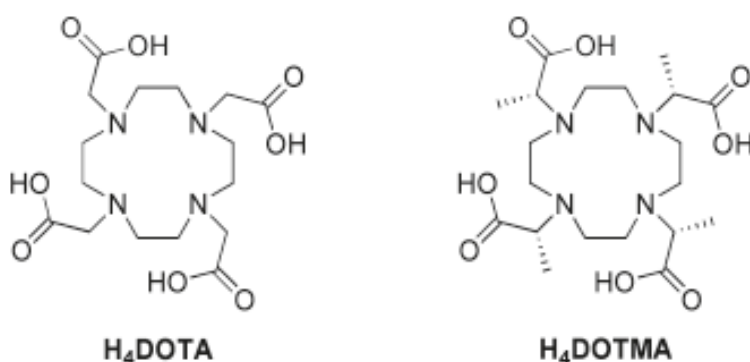


Fig. 32: A sinistra vi è il DOTA, a destra il DOTMA con i centri stereogenici in configurazione R.

Bisogna considerare che leganti a basso peso molecolare, in presenza di campi magnetici  $> 10$  MHz hanno un  $\tau_R$  così breve che la rilassività è influenzata solo dalla sfera interna, quindi sia i derivati Gd-DOTA che quelli Gd-DOTMA hanno una velocità di rilassamento molto simile. Questo succede a condizione che il  $\tau_R$  non sia elevato, ad esempio coniugando il complesso ad una macromolecola. A campi magnetici con intensità minore ( $< 1$  MHz) oltre che ad essere predominante la rotazione molecolare, si ha un notevole effetto anche del rilassamento dello spin elettronico; in questo caso il comportamento dei due complessi risulta essere un po' diverso, come si può vedere nei profili <sup>1</sup>H NMRD dei due complessi riportati nella figura sottostante.

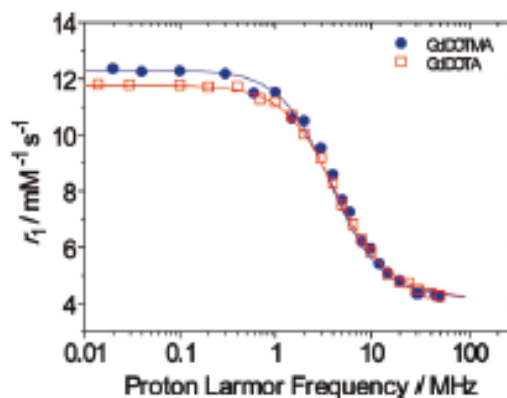


Fig.33: Profilo NMRD di GdDOTMA (cerchi blu) e GdDOTA (quadrati rossi) a 298 K e pH=7.2

Questo avviene nonostante le distribuzioni isomeriche dei due complessi siano molto diverse, con una predominanza dell'isomero TSAP per il GdDOTMA e dell'isomero SAP per il Gd-DOTA. La preferenza per lo stereoisomero TSAP ha anche un'ulteriore implicazione: la velocità di scambio della molecola d'acqua coordinata al centro paramagnetico è nettamente più elevata che nell'isomero SAP. (Figura 34)

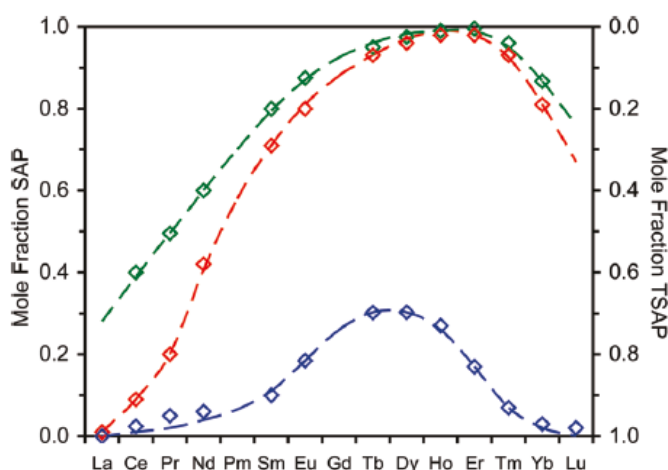


Fig. 34: Frazioni molari degli isomeri SAP e TSAP in funzione degli ioni  $Ln^{3+}$  dei complessi LnDOTMA (blu), LnDOTA (rosso) e LnNB-DOTA (verde).

Il complesso Gd-DOTMA è quindi di particolare interesse in quanto risulta avere una velocità di scambio ( $k_{ex}$ ) delle molecole d'acqua fino a 50 volte più veloce che il GdDOTA e quindi una rilassività leggermente più elevata. La  $k_{ex}$  è molto più elevata a causa della distanza più lunga della molecola d'acqua dal centro metallico nell'isomero TSAP, con conseguente indebolimento dell'interazione metallo- $H_2O$ .<sup>161</sup>

Inoltre l'inserimento di un sostituito metile sulle braccia acetiche laterali del legante, a causa del suo ingombro sterico, introduce un controllo sull'orientamento di tale catena, impedendone la

rotazione e quindi di assumere due delle quattro conformazioni possibili (paragrafo 1.2.4), come si può vedere nella figura sottostante.

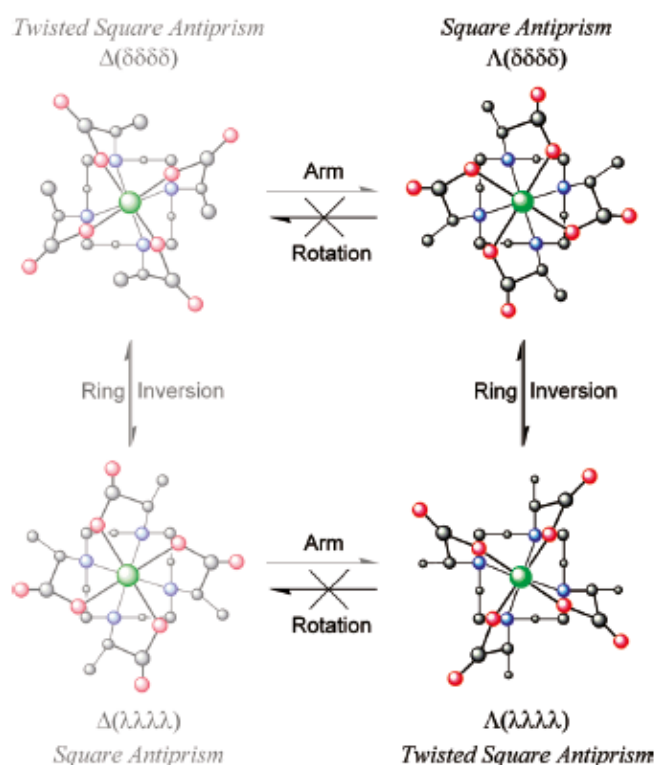


Fig.35: Quattro conformazioni del DOTMA; a sinistra i due stereoisomeri che non sono ammessi.

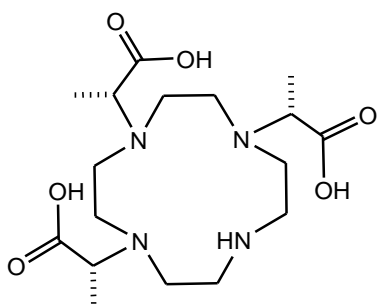
Sono quindi permessi un solo isomero SAP e uno TSAP, entrambi con differenti tempi di residenza della molecola d'acqua con conseguente leggera variazione di rilassività. L'isomero che avrà rilassività maggiore, sarà quello con una velocità di scambio maggiore.

I leganti che verranno descritti in questo capitolo sono collegati dall'aver tre braccia metilacetiche e diversi gruppi coordinanti e non sul rimanente quarto atomo di azoto del macrociclo.

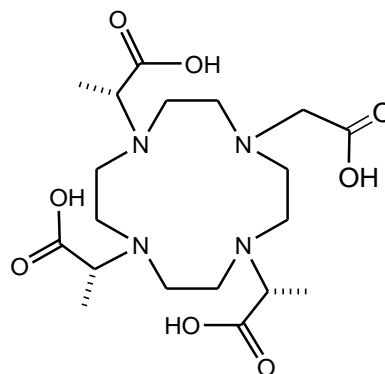
Si parte quindi dal semplice DO3MA (**L3**) per passare al legante DO3MAAc (**L4**) in cui è inserito un braccio acetico, al DO3MAMA-En (**L5**) in cui il quarto gruppo coordinante è un'ammine. Per finire poi con il legante HPDO3MA(**L6**) in cui il quarto braccio coordinante è costituito da un gruppo idrossipropilico come nel caso dell'HPDO3A. Da notare inoltre che i leganti **L4** ed **L5** sono fra i pochi agenti bifunzionali con struttura simile al DOTMA, il primo recante un acido carbossilico, il secondo un'ammina primaria.

Di seguito sono riportate le formule dei leganti discussi in questo capitolo.

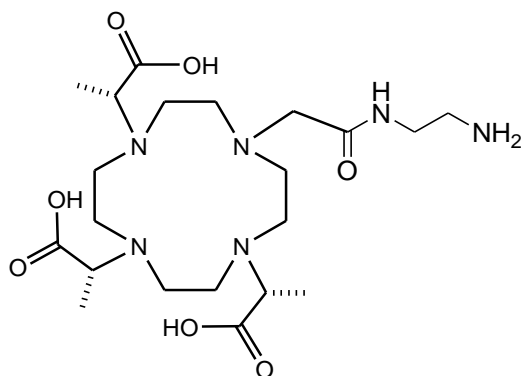




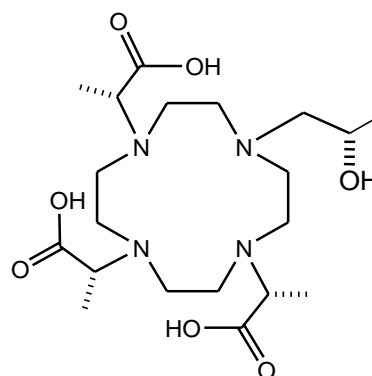
**DO3MA (L3)**



**DO3MA-Ac (L4)**



**DO3MA-MA (L5)**



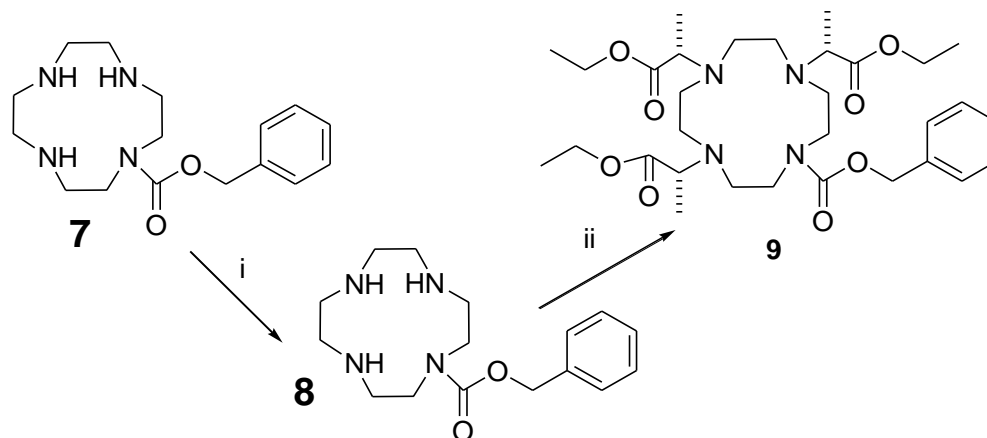
**HP-DO3MA (L6)**

### 3.2 Sintesi:

Per la sintesi di tutti e quattro i DOTMA-derivati si è partiti sempre dallo stesso precursore, il cyclen avente un gruppo benzilossicarbonil(Cbz) come gruppo protettore su una delle quattro ammine secondarie del cyclen (Cyclen-Cbz). Essendo presente sotto forma di sale di HCl, il primo step consiste nel far passare il nostro composto attraverso una resina a scambio ionico, per deprotonare le ammine secondarie. Dopo aver attivato la resina con NaOH e aver eluito acqua fino a pH neutro, si deposita il campione e si raccolgono le frazioni acquose fino a che il pH non sia tornato neutro.

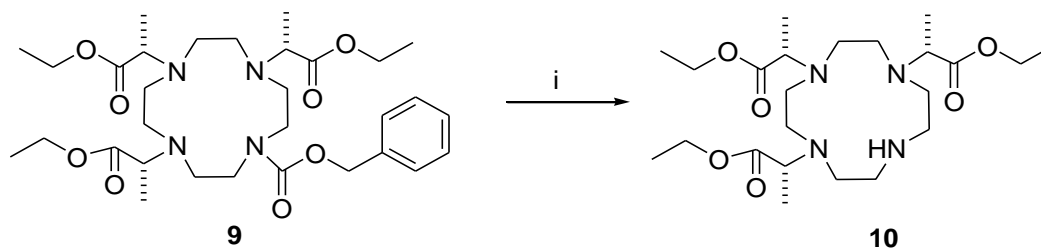
Il secondo passaggio invece prevede la trialchilazione del cyclen-Cbz con Etil-(S)-2-(trifluorometansulfilossi)propionato: si fa gocciolare il trifluorometansolfonato (triflato) dell'etil estere dell'acido lattico sciolto in CHCl<sub>3</sub> nella soluzione del composto **8** in CHCl<sub>3</sub> in presenza di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base e mantenendo la temperatura a 0 °C con un bagno di ghiaccio (Schema 8). Si utilizza il triflato in quanto risulta essere un gruppo più reattivo dei corrispondenti p-toluensolfonati

(tosilati) o metansolfonati (mesilati); la reazione viene effettuata in un ambiente anidro (sotto atmosfera di azoto) per evitare che il triflato si idrolizzi.



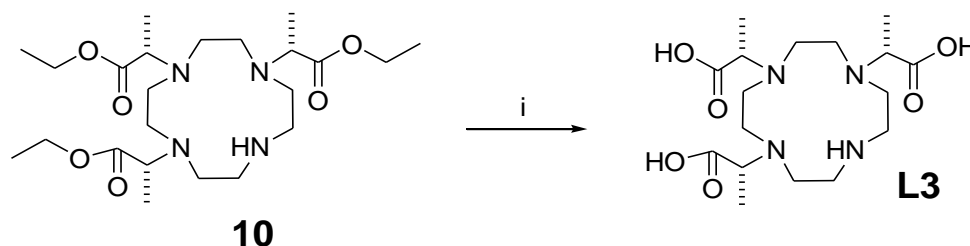
Schema 8: i: 1L NaOH 1M, eluisco con H<sub>2</sub>O fino a pH neutro, semina campione, eluizione con H<sub>2</sub>O fino a pH neutro.  
ii: di Etil-(S)-2-(trifluorometansulfilossi)propionato, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, flux N<sub>2</sub>, 72 h, 0°C -> 50 °C.

Il composto **9**, dopo essere stato purificato tramite colonna cromatografica, è deproteggato dal gruppo Cbz, per mezzo di un'idrogenazione catalizzata da Pd/C. Si è osservato che per favorire lo sviluppo della reazione e aiutare la rimozione del carbammato che si forma durante la reazione è necessario utilizzare un ambiente di reazione leggermente acido aggiungendo acido acetico (1% v/v) (Schema 9).



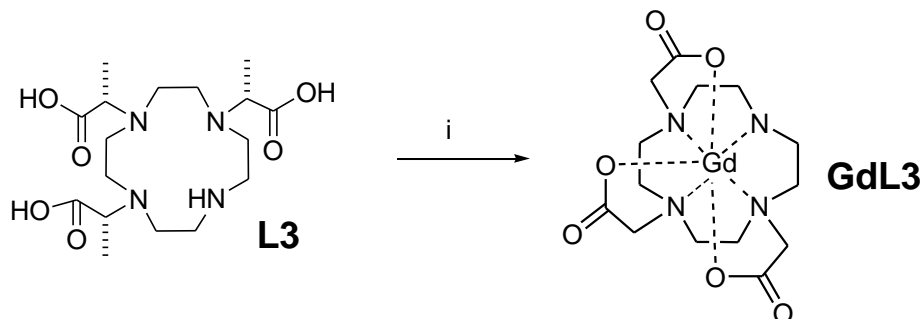
Schema 9: i: H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, AcOH, r.t., 4 h

Una prima frazione del composto **10** è stata deproteggata con HCl 6 M per ottenere il legante DO3MA (**L3**), come mostrato Nello schema 10.



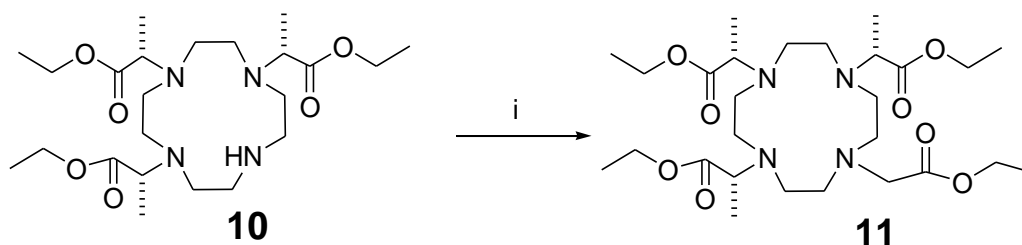
Schema 10: HCl 6M, reflux, o.n.

Il legante **L3** è stato poi complessato con il Gd(III) per effettuare le analisi rilassometriche. La presenza dei gruppi metilacetici fa sì che la complessazione risulti essere cineticamente lenta, per cui si è lasciata reagire con il GdCl<sub>3</sub> a pH 7 e a 70 °C per 3 giorni, come mostrato nello schema sottostante.



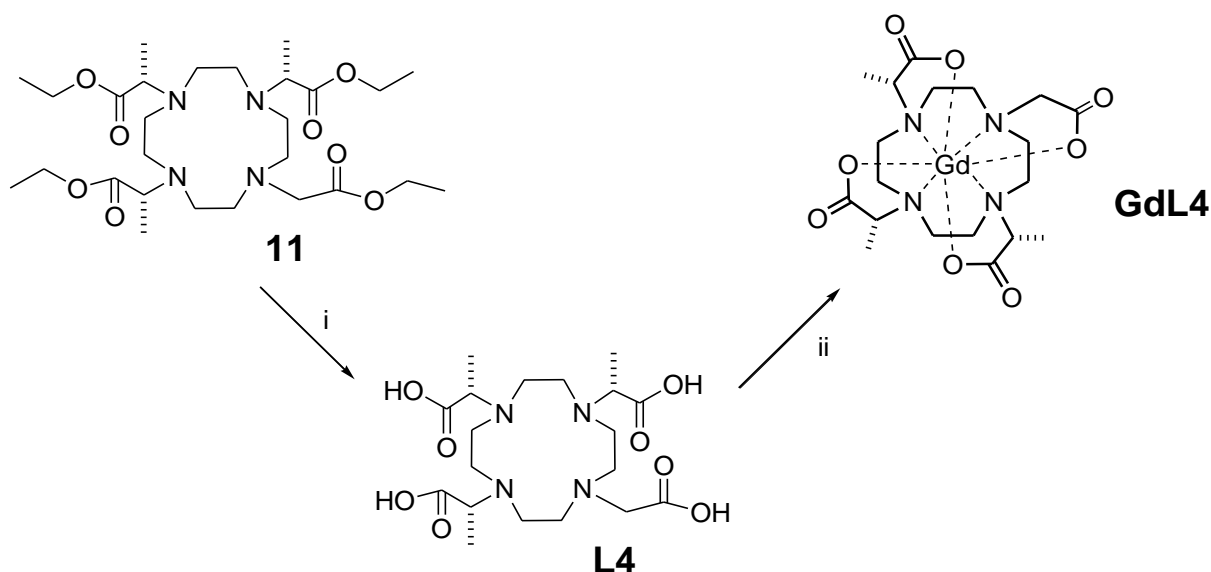
Schema 11: *i*: GdCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 70°C, 72 h

Una seconda aliquota di **10** è stata usata per preparare il DO3MA-Ac. Si è fatto reagire il DO3MA-trietil estere (**10**) con l'etil-2-bromoacetato in CH<sub>3</sub>CN ed in presenza di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base. La reazione è stata fatta procedere a circa 60 °C per una notte, ottenendo il composto **11** dopo purificazione cromatografica.



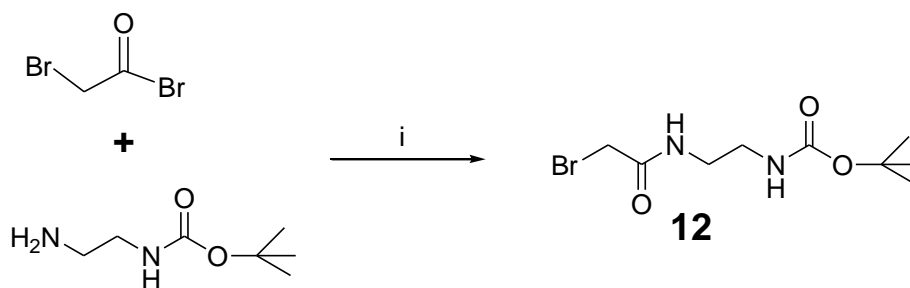
Schema 12: *i*: Etil-Bromo-Acetato, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ACN, 60°C, o.n.

Il composto **11** è quindi deprotetto tramite idrolisi acida dei quattro etil esteri, per ottenere il legante **L4**. Quest'ultimo è stato messo a reagire con il GdCl<sub>3</sub> in acqua a pH 7 e a 70 °C per tre giorni per ottenere il complesso Gd**L4**. (Schema 13)



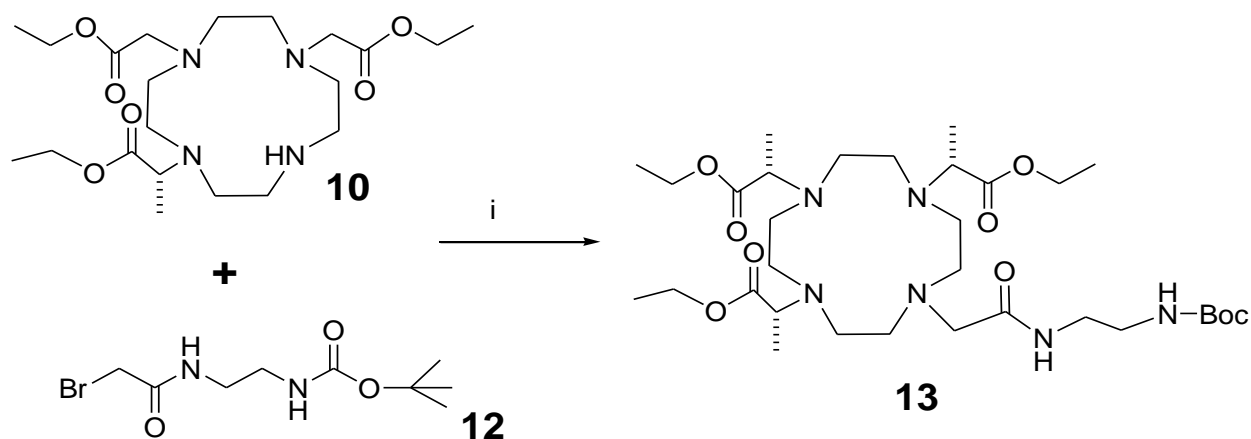
*Schema 13: i: HCl 6M, reflux, o.n.; ii: GdCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 70°C, 72 h.*

Per la sintesi del DO3MA-MA (**L5**), si è dovuto per prima cosa sintetizzare il braccio *N*-(2-*tert*-butossicarbonilamminoetil)-bromoacetammide (**12**). Si è fatto reagire in atmosfera di N<sub>2</sub> e a 0 °C il bromoacetilbromuro con l'etilendiammina monoBoc in una miscela bifasica di DCM/NaOH 1M agitata vigorosamente. (Schema 14).



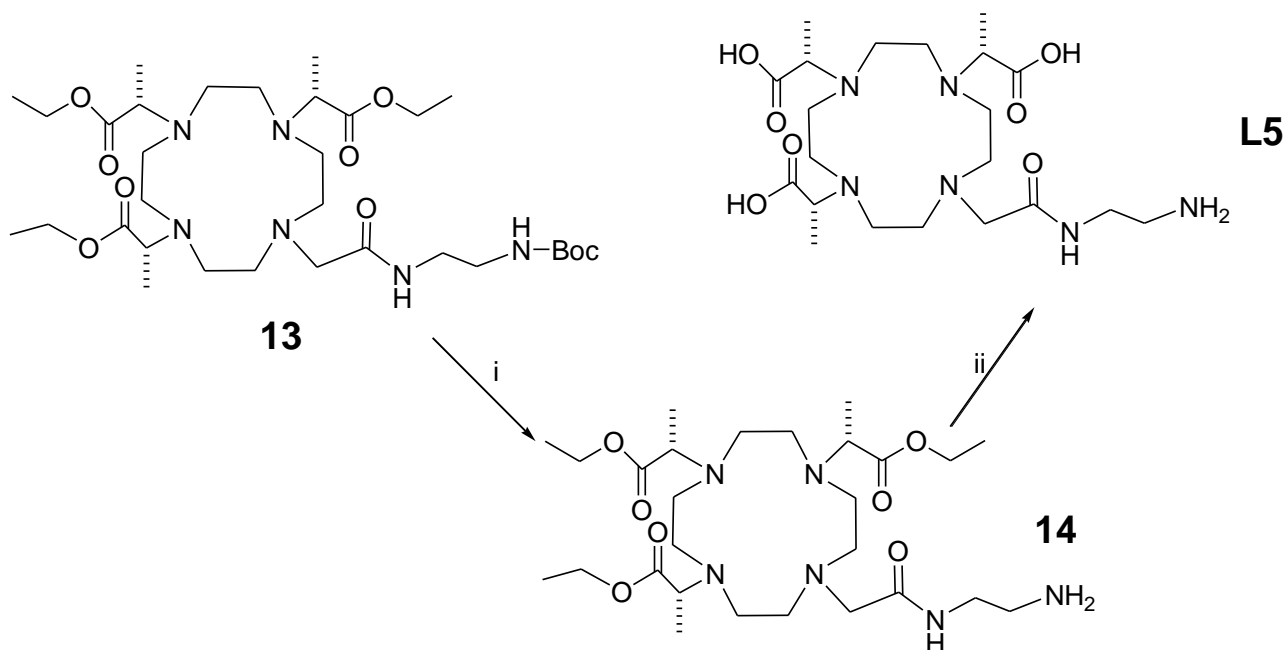
*Schema 14: i: DCM/NaOH 1M; 0°C → r.t., o.n.*

Il composto **12** è stato poi fatto reagire con il DO3MA-trietil estere (**10**) in presenza di una base, come mostrato nello schema 15.



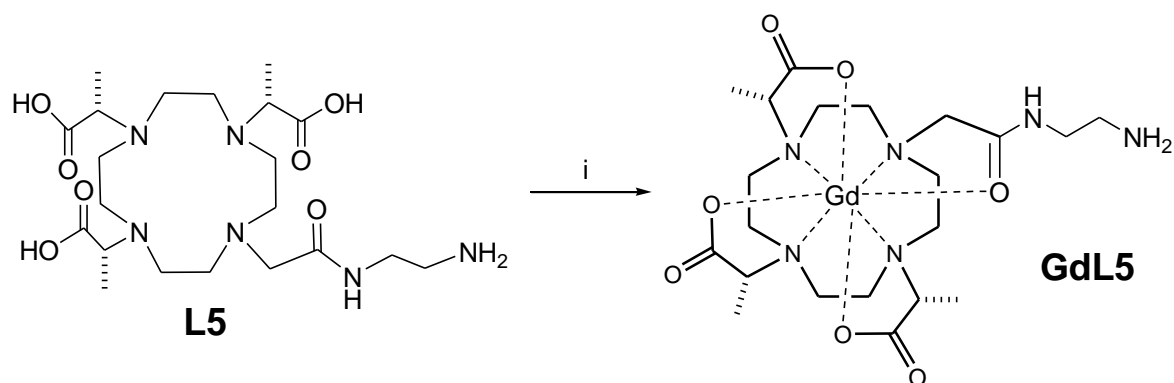
Schema 15: i:  $K_2CO_3$ , ACN,  $70^\circ C$ , o.n.

Il composto **13**, dopo essere stato purificato attraverso una colonna cromatografica di silica gel, è stato deprotetto in due passaggi: per prima cosa è stato eliminato il gruppo protettore Boc sull'ammina in DCM/TFA 1:1 per ottenere il chelante bifunzionale **14**; successivamente si sono deprotetti gli esteri etilici per mezzo di idrolisi acida con 6 M HCl per ottenere il legante **L5** (Schema 16).



Schema 16: i: TFA:DCM, r.t., 6 h. ii: HCl, 6M, reflux, o.n.

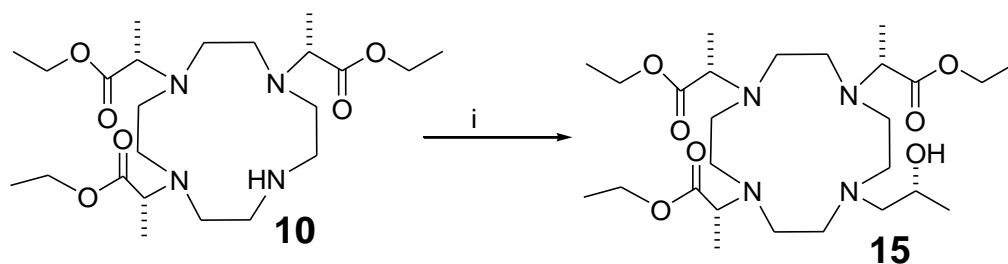
Il legante **L5** è stato infine complessato con un sale del Gd(III) con la procedura utilizzata anche nei casi precedenti (Schema 17)



Schema 17: *i*:  $GdCl_3$ ,  $H_2O$ ,  $70^\circ C$ , 72 h

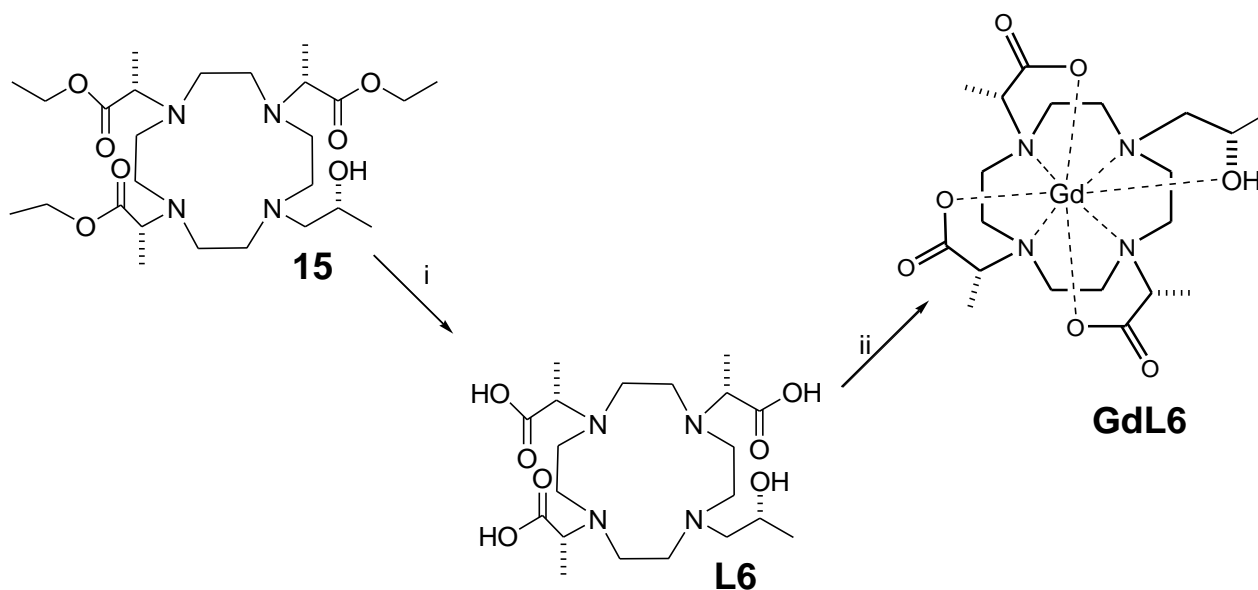
L'ultimo legante sintetizzato, **L6**, in realtà risulta essere una via di mezzo tra i DOTMA-derivati e gli HPDO3A-derivati, in quanto presenta sia un gruppo metilico su tre braccia acetiche, come nei leganti **L3-L5**, sia un gruppo idrossipropilico sul restante braccio laterale come nel caso del legante HPDO3A. Si è deciso di inserirlo in questo capitolo, in quanto il relativo complesso di Gd(III) ha caratteristiche che derivano in buona parte dalla presenza dei tre gruppi metilacetici come nel caso degli altri complessi Gd**L3**-Gd**L5**. Inoltre, la via sintetica per la preparazione di **L6** è analoga a quella usata per ottenere i leganti DO3MA-derivati.

Come verrà spiegato più in dettaglio nel capitolo seguente, la reazione di alchilazione del DO3MA trietil estere **10** per ottenere l'HPDO3MA viene effettuata per apertura del 2-(S) ossido di propilene utilizzando condizioni di riscaldamento con MicroOnde (MO). Sono stati utilizzati un contenitore sigillato e le MO sia per incrementare la resa sia a causa della grande volatilità del reagente (Schema 18).



Schema 18: *i*: 2-(S)-ossido di propilene, EtOH, MO (70 Watt),  $140^\circ C$ , 0.5 h.

Dopo essere stato purificato, si sono idrolizzati gli esteri etilici in ambiente acido come nei casi precedenti (Schema 19). Il legante **L6** è stato infine complessato con il  $GdCl_3$ .



Schema 19: i: HCl, 6M, reflux, o.n. ii: GdCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 70°C, 72 h,

### **3.4 Spettri ad alta risoluzione:**

Allo scopo di determinare approssimativamente il rapporto tra gli isomeri TSAP e SAP dei complessi di Gd(III) con i leganti **L4**, **L5** e **L6**, si sono preparati i complessi tra questi chelanti e due ioni lantanoidei, Eu (III) e Yb (III). Essi sono in grado di shiftare in modo selettivo i segnali dei protoni del complesso grazie alle loro proprietà paramagnetiche. In generale, la presenza di un centro paramagnetico influenza lo spettro NMR dei nuclei di una molecola attraverso l'interazione tra gli elettroni non accoppiati del centro paramagnetico e i nuclei stessi. Tali interazioni comportano per i diversi nuclei spostamenti iperfini isotropici, variazioni dei tempi di rilassamento *spin-spin* e *spin-reticolo* e polarizzazione degli *spins* nucleari. Dallo studio di tali effetti possono essere ricavate informazioni sulla distribuzione elettronica in complessi metallici, sulla loro struttura, sulla formazione di coppie di ioni in soluzione, su fenomeni di solvatazione, ecc. La frequenza di risonanza di un nucleo in un composto contenente un centro paramagnetico è spostata rispetto a un ipotetico analogo composto diamagnetico. Questo spostamento dipende dall'interazione con gli elettroni spaiati ed è riconducibile a due diversi meccanismi:

- 1) spostamento di contatto, dovuto alla delocalizzazione della densità degli spins elettronici spaiati sul nucleo che risuona (l'effetto usualmente si trasmette attraverso i legami chimici);
- 2) spostamento di pseudocontatto o spostamento dipolare, risultante dall'interazione dipolare tra gli spins elettronici e gli spins nucleari (è il solo contributo osservato quando il campo prodotto dagli

elettroni spaiati è anisotropo). Nel nostro caso si origina dalle interazioni spaziali, dipolari del momento magnetico del Ln(III) e il legante.

La scelta dell'Eu(III) e dell'Yb(III) è dovuta a due motivi principali:

- l'Yb(III) è lo ione paramagnetico che genera uno shift maggiore grazie all'elevato valore del contributo di pseudo-contatto.
- l'Eu(III) è lo ione lantanoideo più simile al Gd(III) come raggio ionico ( $r_{\text{ion\_Gd(III)}} = 0.938 \text{ \AA}$ ;  $r_{\text{ion\_Eu(III)}} = 0.947 \text{ \AA}$ ) e quindi permette di determinare con buona approssimazione il rapporto fra gli isomeri SAP e TSAP presente nel complesso di Gd(III) corrispondente.

Ricordiamo che i complessi LnDOTA-derivati, e quindi anche i complessi appartenenti alla famiglia dei DOTMA, in soluzione possono assumere due forme isomeriche diverse, quella TSAP e quella SAP, in cui i carboni dell'anello differiscono per la posizione in cui si trovano (Figura 36). Ci saranno quindi un protone assiale ed uno equatoriale legati all'atomo di carbonio situato nell'angolo (corner) dell'anello ( $ax^C$  e  $eq^C$ ) ed un protone assiale ed uno equatoriale legati all'atomo di carbonio nel mezzo (side) ( $ax^S$  e  $eq^S$ ). Come si può vedere dalla figura 36, negli isomeri SAP e TSAP vi è una diversa rotazione delle braccia acetate che quindi comporta un diverso intorno chimico per i protoni del macrociclo.

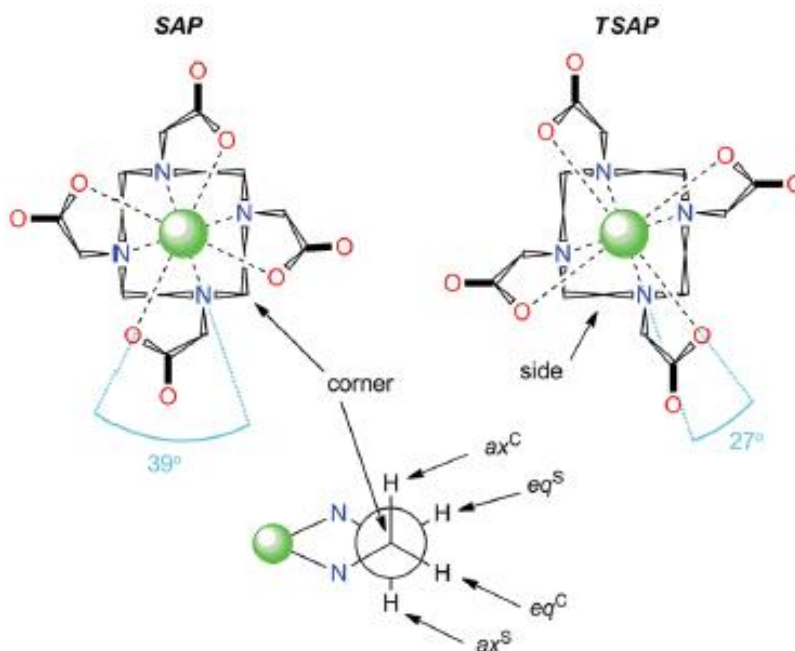


Fig. 36: I due isomeri dei DOTA-derivati con i rispettivi angoli torsionali

Nel caso dei protoni assiali dei carboni centrali ( $ax^S$ ) si osserva uno shift a campi più bassi, in una regione in cui non vi sono altri segnali e quindi l'assegnazione tramite analisi  $^1\text{H}$  NMR dei segnali corrispondenti risulta in linea teorica abbastanza semplice.<sup>162,163</sup>



Si sono quindi studiati, attraverso un'analisi  $^1\text{H}$  NMR, gli spettri a diverse temperature (280 K, 290 K, 300 K, 310 K) dei complessi EuL4 e YbL4 e EuL5 e YbL5 (Figure 37-41).

La presenza in questi spettri di coppie di segnali differenti (una intorno ai 15 ppm e 20 ppm, l'altra tra i 35 ppm e 40 ppm), sta ad indicare la presenza di due specie isomeriche in lento scambio tra loro (per la scala dei tempi NMR) e quindi ben visibili separatamente. Con l'aumentare della temperatura questi segnali risultano essere meno definiti a causa dei moti del complesso, quindi per la determinazione del rapporto SAP/TSAP si considerano gli spettri registrati a 280 K.

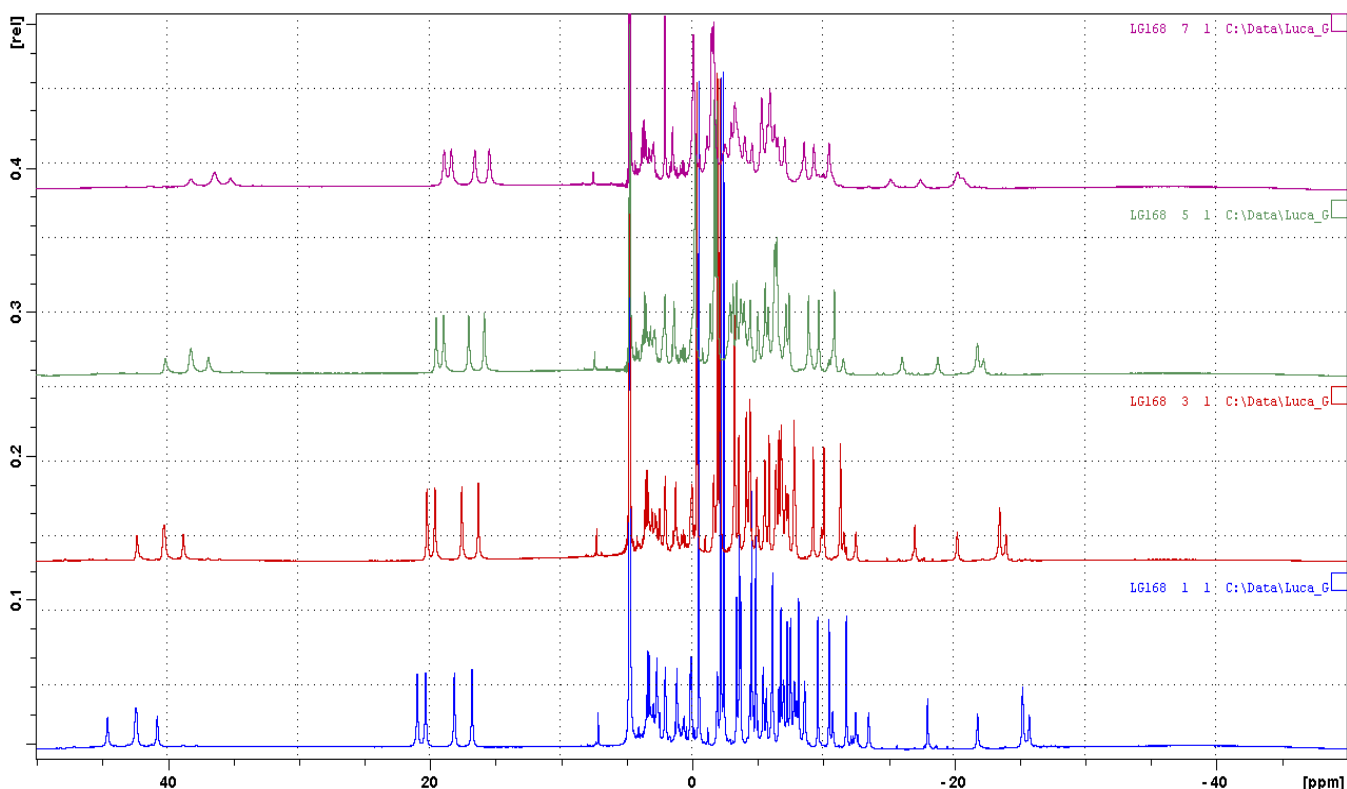


Fig. 37: Spettri  $^1\text{H}$  NMR di EuL4 acquisiti a varie temperature, 280 K (blu), 290 K (rosso), 300 K (verde), 310 K (viola).

Nel caso di EuL4 (Figura 37), si possono osservare nella regione sinistra dello spettro i segnali relativi ai protoni assiali degli isomeri TSAP e SAP. In particolare, intorno a circa 20 ppm abbiamo i segnali più intensi dovuti ai protoni assiali dell'isomero TSAP, mentre tra 40 e 45 ppm si possono notare i picchi dell'isomero SAP. Andando a misurare l'area di ciascun segnale si può determinare la percentuale di uno e dell'altro isomero: in questo caso si ha che l'isomero TSAP rappresenta circa il 66%, mentre quello SAP è il 34%.

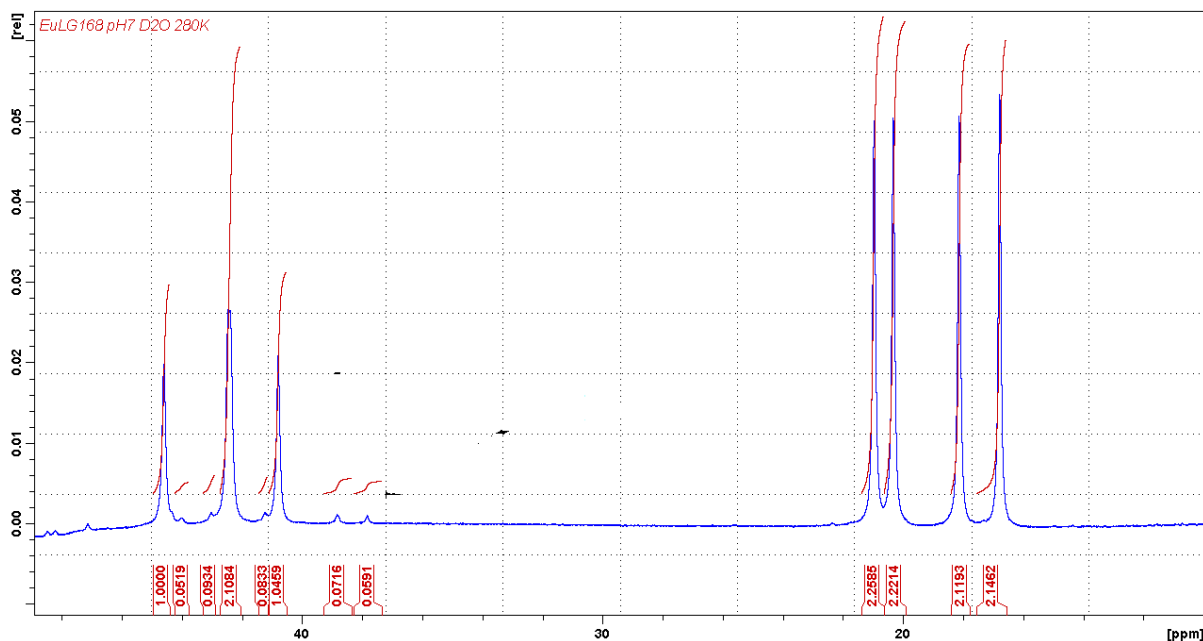


Fig. 38: Porzione di spettro  $^1\text{H}$  NMR di  $\text{EuLA}$  a 280 K.

A 280 K (Figura 38) si notano picchi molto meno intensi tra 49 e 37 ppm che sono probabilmente da assegnare ad altre specie isomeriche. Tendenzialmente si può pensare che altri possibili isomeri possono essere generati dai diversi possibili riarrangiamenti delle braccia metilacetiche. Comunque la popolazione di queste specie secondarie è molto inferiore al 5% e quindi trascurabile.

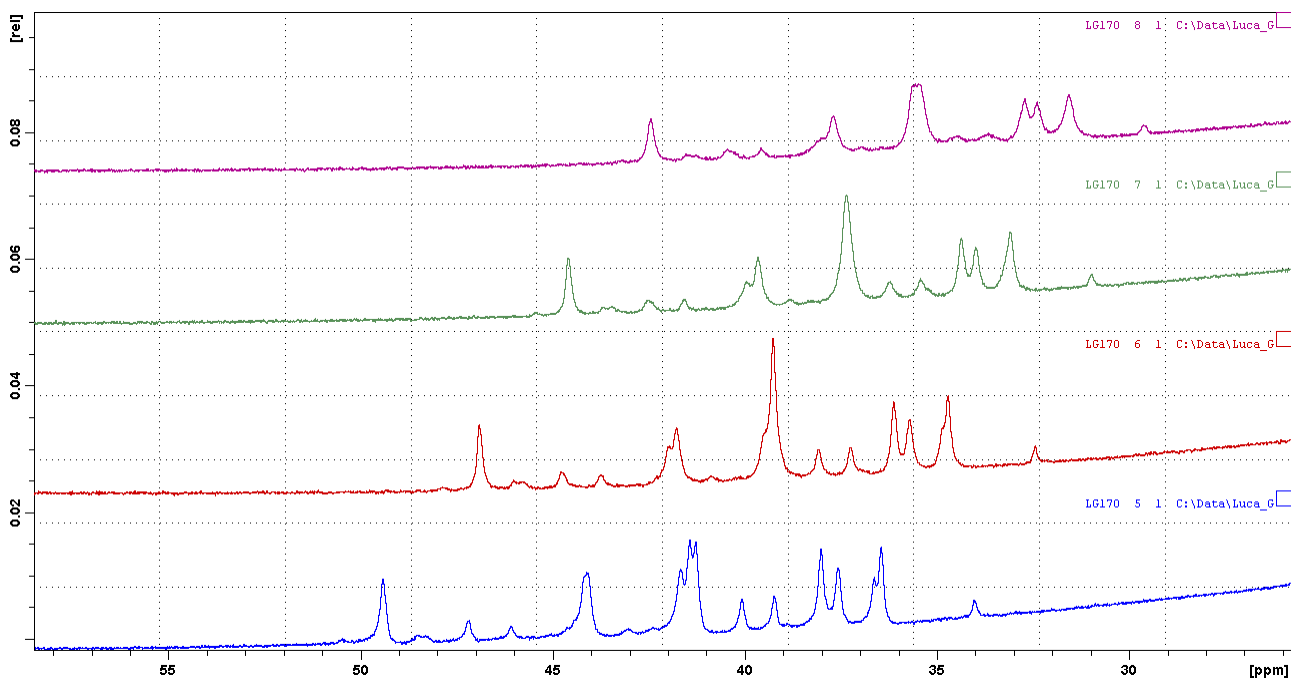


Fig. 39: Porzione degli spettri  $^1\text{H}$  NMR di  $\text{YbLA}$  acquisiti a varie temperature, 280 K (blu), 290 (rosso), 300 (verde), 310 (viola).

Per quanto riguarda il complesso YbL4 (Figura 39), lo spettro risulta essere di più difficile compressione, ma si notano sempre due specie isomeriche prevalenti che difficilmente possono essere assegnate senza ulteriori esperimenti. E' da notare che, i picchi dei segnali dovuti ai protoni assiali di YbDOTMA sono a 94 e 110 ppm per l'isomero prevalente e a 160 e 180 ppm per l'isomero minore.<sup>167</sup> Anche in questo caso con l'aumentare della temperatura si nota una coalescenza dei segnali causati dal moto delle molecole.

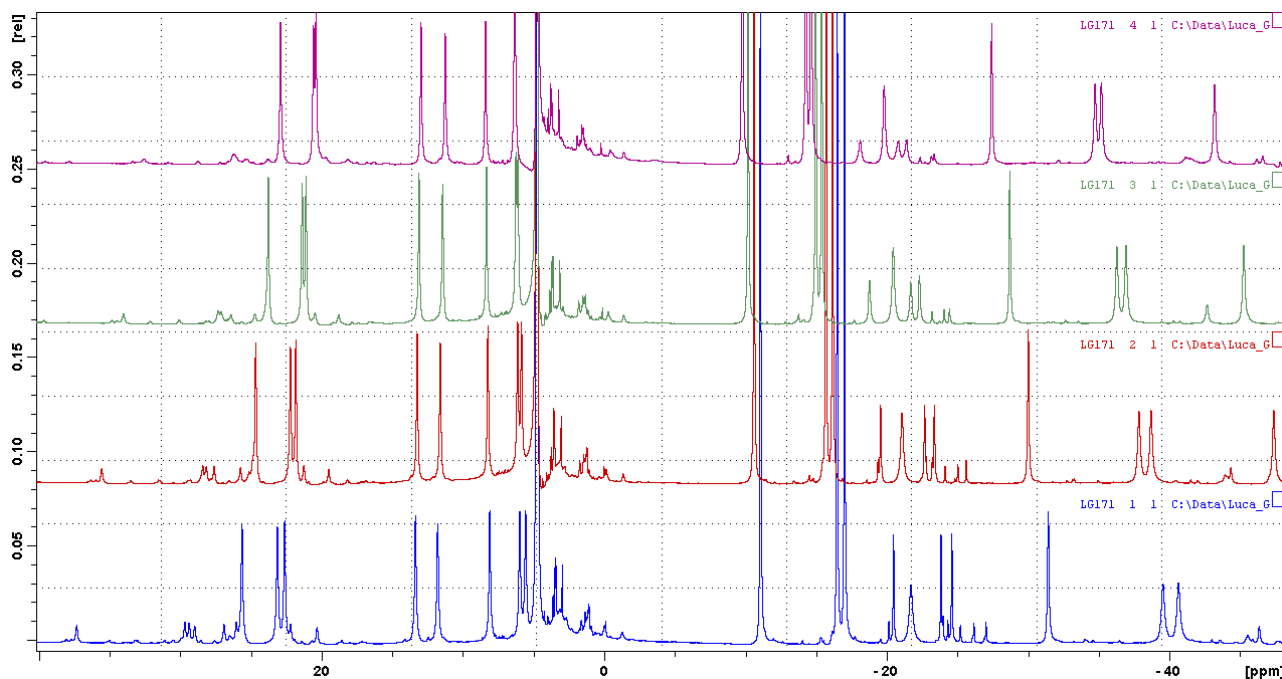


Fig. 40: Spettri  $^1\text{H}$  NMR di EuL5 acquisiti a varie temperature, 280 K (blu), 290 K (rosso), 300 K (verde), 310 K (viola).

Negli spettri di EuL5 a diverse temperature (Figura 40), si possono vedere due famiglie di segnali di intensità comparabile tra 5 e 15 ppm e tra 20 ppm e 25 ppm. Si può ipotizzare che quindi ci sia pressochè una equivalente popolazione degli isomeri TSAP e SAP. A frequenze più alte (intorno ai 40 ppm) vi sono i altri picchi molto meno intensi (inferiori al 10%) che potrebbero, anche in questo caso, appartenere ad un isomero minore in cui c'è stata rotazione delle braccia metilacetiche.

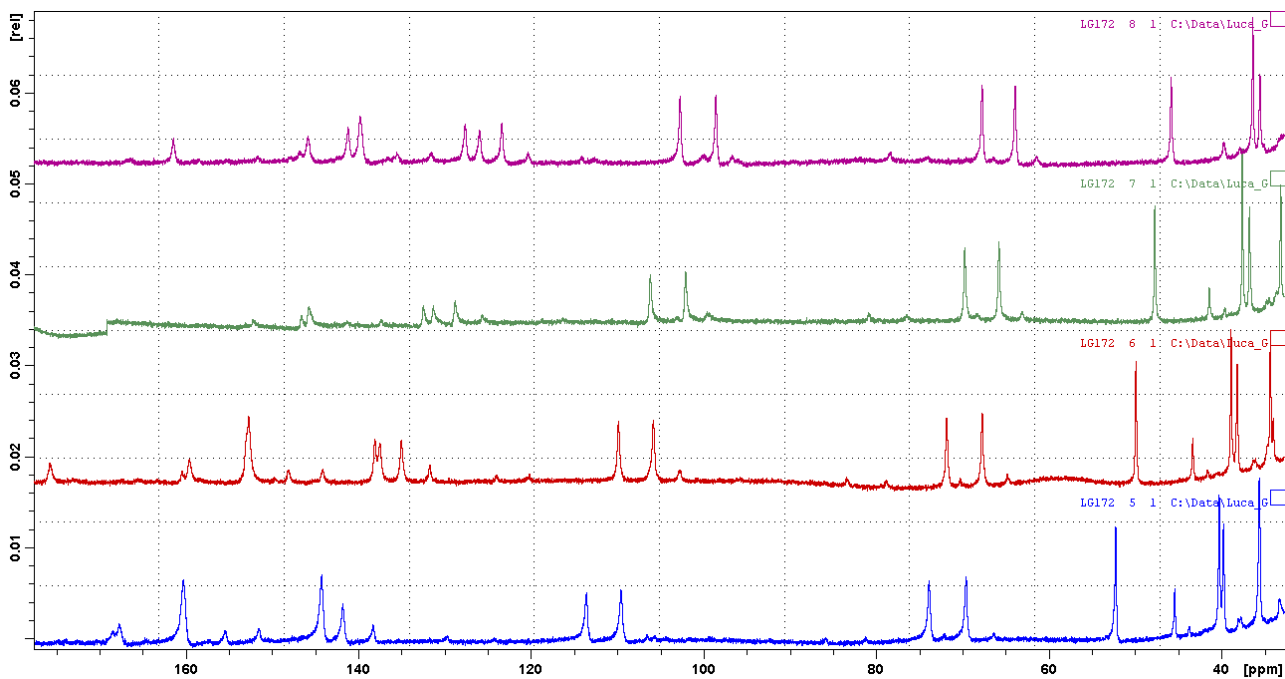


Fig.41: Porzione degli spettri  $^1\text{H}$  NMR di YbL5 acquisiti a varie temperature, 280 K (blu), 290 K (rosso), 300 k (verde), 310 K (viola).

Dall'analisi degli spettri  $^1\text{H}$  NMR di YbL5 (Figura 41) si possono notare due gruppi di picchi: tra 60 ppm e 80 ppm vi sono i segnali relativi all'isomero TSAP, mentre tra 110 ppm e 160 quelli dello SAP. Confrontando le aree relative ai segnali, si deduce che l'isomero più abbondante sia quello SAP, con una popolazione doppia rispetto all'isomero TSAP. In quella stessa zona, si possono vedere dei picchi a minor intensità che rappresentano l'altra possibile orientazione delle braccia acetiche dell'isomero SAP. Essi tuttavia risultano avere una popolazione inferiore al 10% rispetto agli altri due isomeri principali.

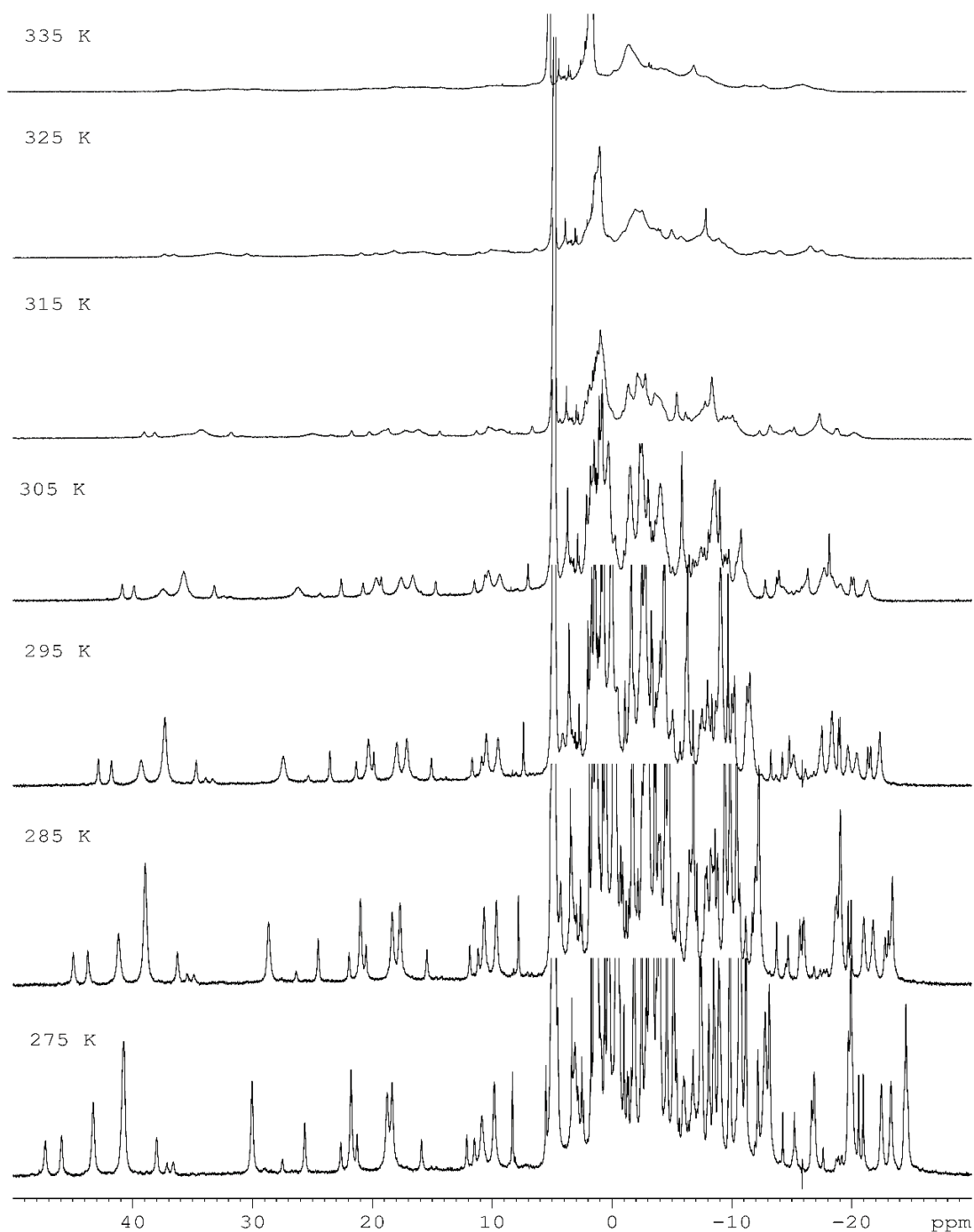


Fig. 42: Spettri  $^1\text{H}$  NMR di **EuL6** registrati a varie temperature.

Per quanto riguarda i complessi con il legante **L6**, gli spettri  $^1\text{H}$  NMR essi sono stati misurati a diverse temperature per **EuL6** (275, 285, 295, 305, 315 e 325 K) e a diversi pH per **YbL6** (pH 4.51 e pH 8.47). Lo spettro che meglio evidenzia il rapporto isomerico TSAP/SAP della specie **EuL6** è quello registrato a 275 K (Figura 42), si notano i picchi intorno a 20 ppm e quelli intorno a 40 ppm che rappresentano rispettivamente l'isomero TSAP e quello SAP che hanno la stessa intensità e quindi la stessa popolazione. Vi sono anche questa volta dei segnali meno intensi sempre intorno a 20 ppm e 40 ppm che rappresentano gli isomeri meno abbondanti del complesso **EuL6**.

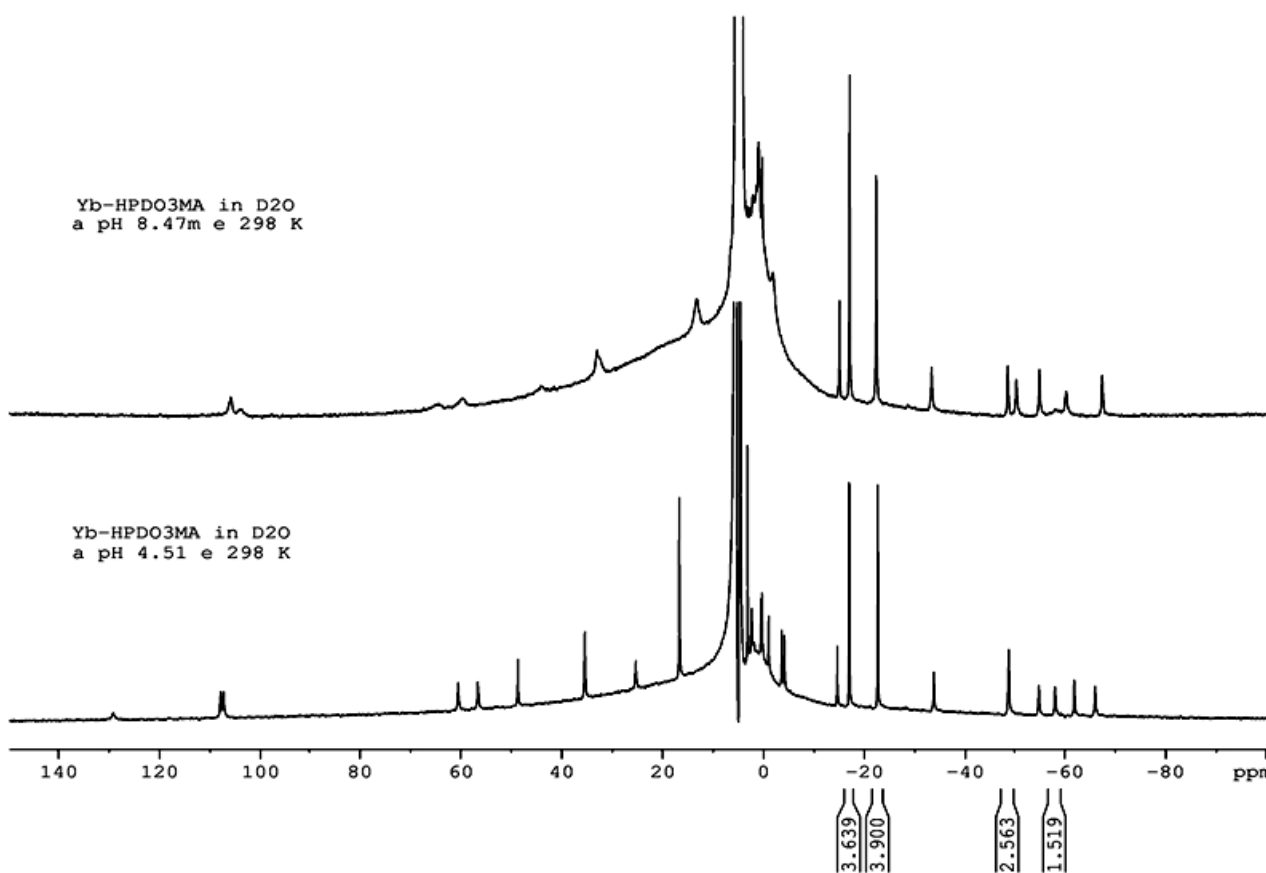


Fig. 43: Spettri  $^1\text{H-NMR}$  ad alta risoluzione di una soluzione di YbL6 - 20 mM in D2O a 298 K e a (in basso) pH 4.51 e a (in alto) pH 8.47 (Bruker Avance 600 MHz).

I due spettri  $^1\text{H NMR}$  di YbL6 a pH 4.51 e pH 8.47 (Figura 43) mostrano un numero e una forma dei segnali che evidenziano la presenza del solo isomero TSAP. Si notano molto bene i singoletti dei metili, tra i quali il più shiftato dovrebbe rappresentare quello posto sul braccio idrossipropilico che risente di un intorno diverso dagli altri.

### **3.3 Analisi Rilassometriche:**

La rilassività del complesso Gd-DO3MA (L3) a 20 MHz e 25 °C è di  $6.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , valore che risulta leggermente più elevato del rispettivo complesso senza i gruppi metilici sulle braccia acetiche (GdDO3A),<sup>164</sup> come si può vedere nella tabella sottostante.

Parametri	GdL3	GdDO3A
$^{298}r_{1p}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>20 MHz</sup>	6.5 ± 0.1	6.0
$q$	1.9	1.9
$^{298}\tau_M$ (ns)	170 ± 1	160
$\Delta H_M$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	40.0 ± 0.5	44.0
$\Delta^2$ (10 <sup>19</sup> ; s <sup>-2</sup> )	25.0 ± 0.5	4.6
$^{298}\tau_V$ (ps)	11.0 ± 0.2	14.0
$^{298}\tau_R$ (ns)	70 ± 2	66

Tab. 7: Confronto tra i principali parametri rilassometrici di GdL3 e GdDO3A

I profili NMRD di GdL3 a 298 e 310 K (Figura 36) sono tipici di un complesso avente un basso molecolare, con un iniziale plateau a bassi campi, una dispersione fra 3 e 15 MHz e un nuovo plateau a campi alti. Invece il profilo che riporta la dipendenza dalla temperatura della velocità di rilassamento trasversale ( $R_2$ ) del nucleo  $^{17}\text{O}$  dell'acqua coordinata permette di estrarre i parametri chiave dello scambio della molecola di acqua con l'acqua di bulk.

I dati sperimentali di GdL3, sia i profili NMRD che il profilo  $^{17}\text{O}$  NMR, sono stati quindi analizzati simultaneamente in accordo con la teoria del rilassamento paramagnetico espressa dalla ben nota equazione di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) per il contributo della sfera interna e dal modello di Freed per quella esterna accoppiati con la teoria di Swift-Connick per il rilassamento del nucleo  $^{17}\text{O}$ .<sup>163,164</sup> Alcuni dei parametri coinvolti nella descrizione della dipendenza di  $r_1$  dal campo magnetico possono essere fissati ai valori standard tipici dei chelati DO3A-derivati, in questo caso il GdDO3A. In particolare, il numero di molecole di acqua coordinate ( $q$ ) è stato fissato a 1.9 per entrambi i complessi, in quanto, nel caso di GdDO3A è stato dimostrato che il complesso bis-acquo è in equilibrio con una piccola percentuale di complesso  $q = 1$ .<sup>165,166</sup>

Il  $\tau_V$  risulta essere molto simile, questo significa che la struttura di coordinazione è praticamente identica, anche se il valore di  $\Delta^2$  è sostanzialmente diverso. La velocità di scambio delle molecole d'acqua legate al complesso risulta essere leggermente maggiore per il complesso sintetizzato in questo lavoro, anche se i valori sono paragonabili. Infine, dato che sia la struttura che il peso molecolare dei due complessi risultano simili, ne consegue che anche il  $\tau_R$  risulta essere simile.

Osservando l'andamento della rilassività in funzione del pH (Figura 44) si può osservare che c'è una sensibile diminuzione di  $r_1$  a  $\text{pH} < 8$ . Questo comportamento è analogo a quanto osservato nel caso

del GdDO3A dove, in presenza di ione carbonato disciolto in soluzione, si ha la perdita di una molecola di acqua coordinata spiazzata dallo ione bidentato.<sup>163,164</sup>

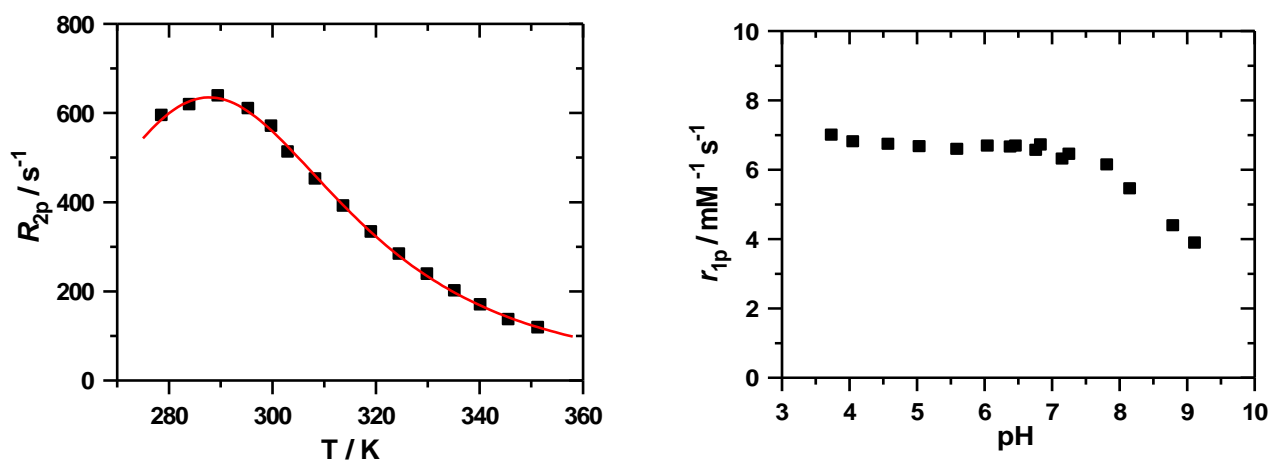


Fig. 44: A sinistra vi è il profilo  $^{17}O$ , a destra il pH variabile del complesso GdDO3MA

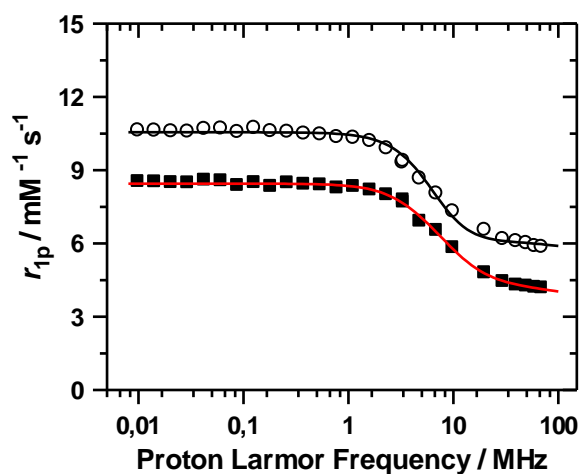


Fig. 45: Profilo NMRD di GdL3 a 25°C (cerchi bianchi) e 37°C (quadrati neri).

Nella tabella sottostante, sono riportati alcuni parametri selezionati ottenuti dall'analisi dei profili  $1/T_1$  NMRD (298 K) e  $^{17}O$  NMR di GdL4, GdL5 e GdL6 paragonati con i parametri ottenuti per GdDOTMA.<sup>161</sup>



Parametri	GdL4	GdL5 <i>Isomero TSAP</i>	GdL5 <i>Isomero SAP</i>	GdL6	GdDOTMA
$^{298}r_{1p}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>20 MHz</sup>	5.0 ± 0.1	4.7 (valore medio)	4.7 (valore medio)	5.1 ± 0.1	4.8
$^{298}\tau_M$ (ns)	90 ± 1	5.0 ± 0.5	530 ± 4	30.0 ± 0.8	85
$\Delta H_M$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	72.8 ± 0.5	44.1 ± 0.6	67.5 ± 0.4	74 ± 1	44.5
$\Delta^2$ (10 <sup>19</sup> ; s <sup>-2</sup> )	6.3 ± 0.2	10.0 ± 0.4	7.7 ± 0.3	10.6 ± 0.4	1.7
$^{298}\tau_V$ (ps)	8.8 ± 0.1	29.0 ± 0.4	5.9 ± 0.2	20.9 ± 0.4	7.9
$^{298}\tau_R$ (ns)	80 ± 2	65 ± 1	80 ± 1	77 ± 2	81

Tab. 8: Parametri rilassometrici di GdL4, GdL5, GdL6 e GdDOTMA.

Come indicato in precedenza, il parametro più importante da prendere in considerazione è la velocità di scambio dell'acqua  $k_{ex} = 1/\tau_M$  che è quello che in questo lavoro di tesi si è cercato di ottimizzare. Il fitting simultaneo dei profili NMRD e <sup>17</sup>O NMR per i complessi GdL4-L6, effettuato come in precedenza in accordo con la teoria del rilassamento paramagnetico (SBM, Freed and Swift-Connick theories for the inner, outer spheres and for the <sup>17</sup>O nucleus, respectively) ha permesso di ricavare i dati riportati in Tabella 8. Alcuni parametri quali il numero di molecole di acqua coordinate al centro paramagnetico ( $q = 1$ ), e la distanza della molecola di acqua dal centro paramagnetico  $r_{Gd-H} = 3.0 \text{ \AA}$ , sono state mantenute fisse durante la procedura di fitting.

Come si può vedere dalla Tabella 8, i valori di  $r_{1p}$  e di  $\tau_R$  dei tre complessi confrontati non variano molto, mentre più sostanziali sono le variazioni di  $\tau_M$ . In particolare, nel caso di GdL4 il  $\tau_M$  è abbastanza simile a quello di GdDOTMA (come si può osservare anche solo qualitativamente dal confronto con profili <sup>17</sup>O NMR di GdDOTMA e GdL4 riportati nelle figure 46 e 47 dove si vede che il valore massimo di R2 per entrambi i complessi si trova intorno a 290 K) evidenziando che la modifica di un braccio da metilacetico ad acetico non cambia in maniera sostanziale le proprietà rilassometriche del complesso. In figura 47 è mostrato anche il profilo <sup>17</sup>O NMR di GdDOTA per far vedere che in questo complesso, in cui c'è prevalenza dell'isomero SAP, il massimo è spostato a temperature un po' più elevate, indicazione qualitativa di una più lenta velocità di scambio dell'acqua coordinata ( $\tau_M = 261 \text{ ns}$ ).

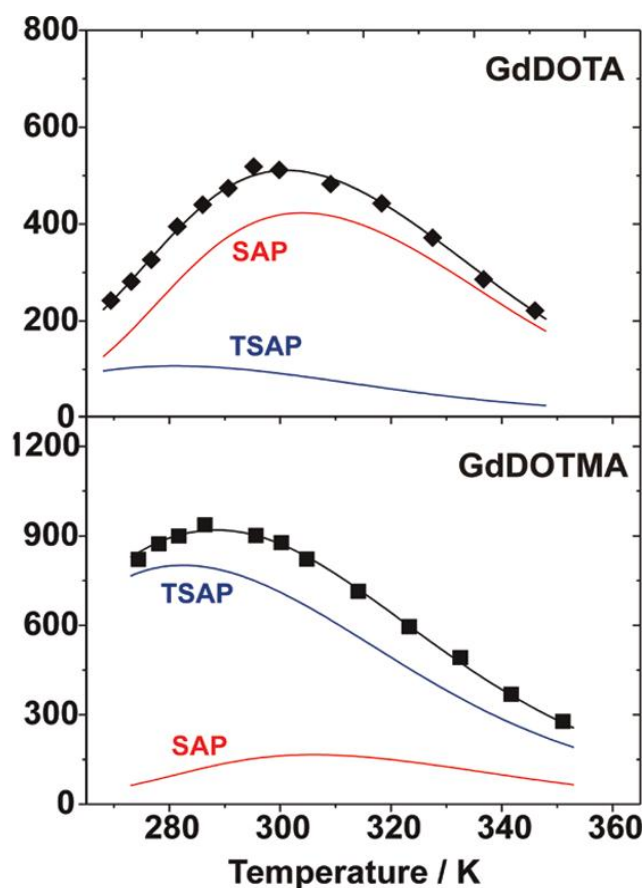


Fig. 46: Profili  $^{17}\text{O}$  NMR di GdDOTA e GdDOTMA fittati secondo un singolo modello di complesso e secondo una miscela di un isomero a scambio veloce (TSAP, linea blu) ed uno a scambio lento (SAP, linea rossa). In questo caso le linee relative ai due isomeri sono pesate rispetto alla quantità dei due isomeri presenti nella soluzione dei complessi.

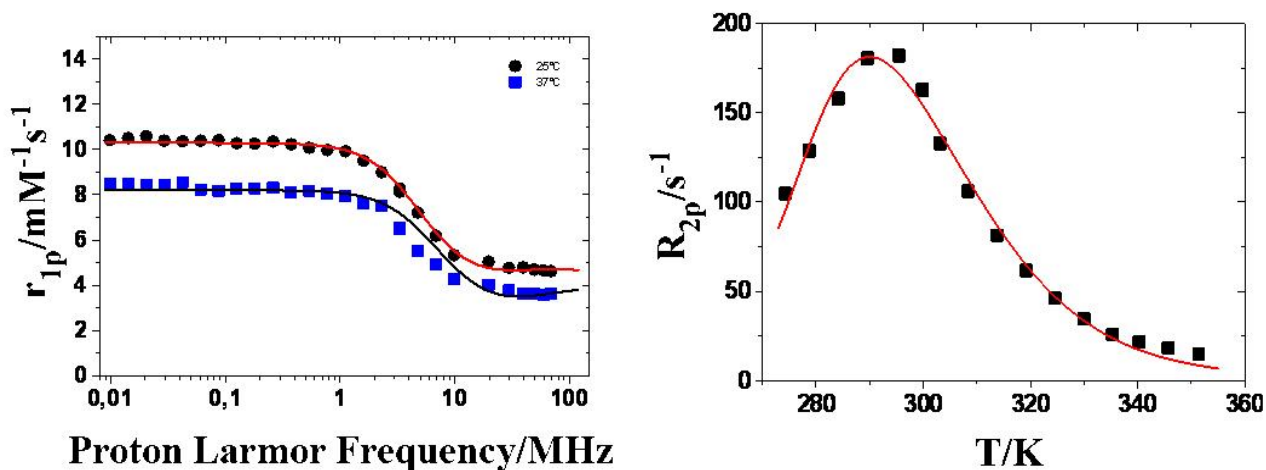


Fig. 47: Sinistra: profili  $1/T_1$  NMRD di GdL4 a 298 K (quadrati neri) e 310 K (cerchi vuoti); destra: dipendenza dalla temperatura della velocità di rilassamento trasversale ( $R_2$ ) del nucleo  $^{17}\text{O}$  di una soluzione 9.0 mM di GdL4 misurata a 11.7 T.

Nel caso di GdL5, si nota invece un interessante cambiamento nella forma del profilo  $^{17}\text{O}$  NMR che evidenzia la presenza di due specie che scambiano la molecola di acqua coordinata con velocità molto diverse fra loro. È da notare che, in generale, il passaggio da complessi di GdDOTA a GdDOTAMA

comporta una notevole riduzione della  $k_{ex}$  ( $1/\tau_M$ ) (da circa  $5$  a  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) a causa della coordinazione dell'ossigeno ammidico e della formazione di un complesso neutro. In questo caso il profilo  $^{17}\text{O}$  è stato fittato come somma di due specie, gli isomeri TSAP e SAP, dopo che la distribuzione di ciascuno di essi è stata determinata dagli spettri  $^1\text{H}$  NMR del complesso EuL5. Questa procedura di fitting ha premesso di determinare i valori di  $\tau_M$  per entrambi gli isomeri, uno (l'isomero TSAP) che ha un tempo medio di residenza della molecola di acqua coordinata molto breve (solo 5 ns) ed l'altro (isomero SAP), con scambio molto più lento ( $\tau_M = 530 \text{ ns}$ ). Quindi, il valore medio di  $\tau_M$  che può essere usato per il fitting dei profili NMRD è comunque di 3-4 volte più basso rispetto ai valori solitamente utilizzati per i complessi GdDOTAMA.

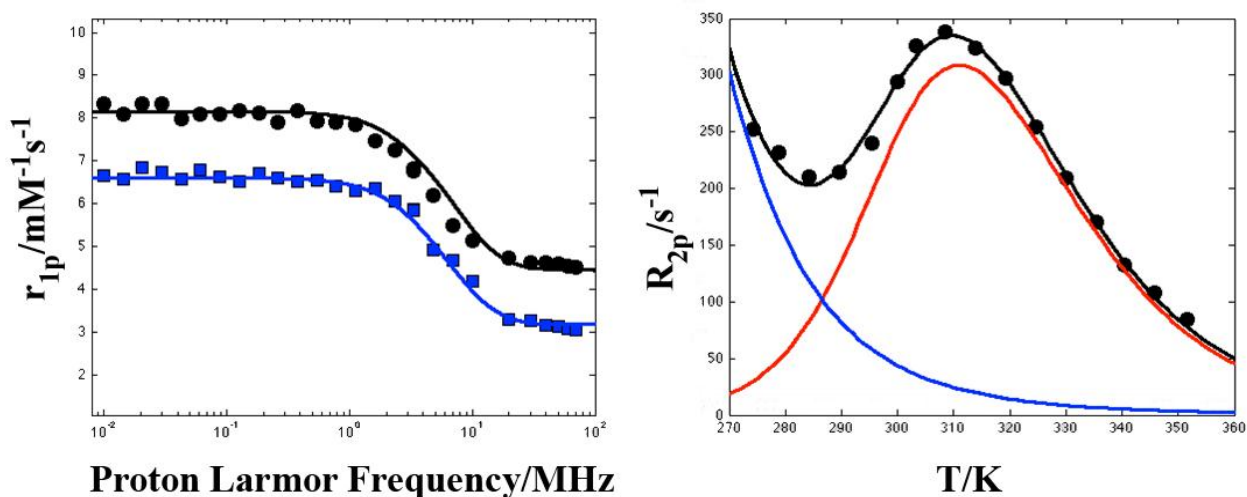


Fig. 48: Sinistra: profili  $1/T_1$  NMRD di GdL5 a 298 K (cerchi neri) e 310 K (quadrati blu); destra: dipendenza della velocità di rilassamento trasversale del nucleo  $^{17}\text{O}$  dalla temperatura di una soluzione 7.8 mM di GdL5 misurata a 11.7 T. I profili sono fittati secondo un singolo modello di complesso e secondo una miscela di un isomero a scambio veloce (TSAP, linea blu) ed uno a scambio lento (SAP, linea rossa).

Il complesso GdL6 può essere visto come una via di mezzo fra il complesso GdHPDO3A e GdDOTMA avendo tre braccia metilacetiche ed una idrossipropilica. Per GdL6 è stato misurato un valore di rilassività di  $5.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , il valore più elevato di tutto il gruppo di complessi di Gd  $q = 1$  studiati in questo lavoro di tesi. La velocità di scambio delle molecole d'acqua è generalmente determinata dal fitting del profilo  $^{17}\text{O}$  NMR (Figura 49) che, in questo caso, mostra un accenno di aumento di  $R_2$  a temperature più basse di 276 K e un valore massimo leggermente spostato verso sinistra, quindi indicativo di un'elevata  $k_{ex}$ . Questo comportamento può essere associato alla presenza in soluzione acquosa di una specie isomerica con una velocità di scambio significativamente diversa. Per questo motivo il profilo non è stato fittato per evitare di ottenere parametri non affidabili. Il fitting

dei profili NMRD permette di ottenere un valore di  $\tau_M$  molto basso, come confermato dalla forma del profilo  $^{17}\text{O}$ . Invece, sia i valori riferiti al rilassamento elettronico sia il valore di  $\tau_R$  sono simili a quelli ottenuti per gli altri complessi visti in questo capitolo.

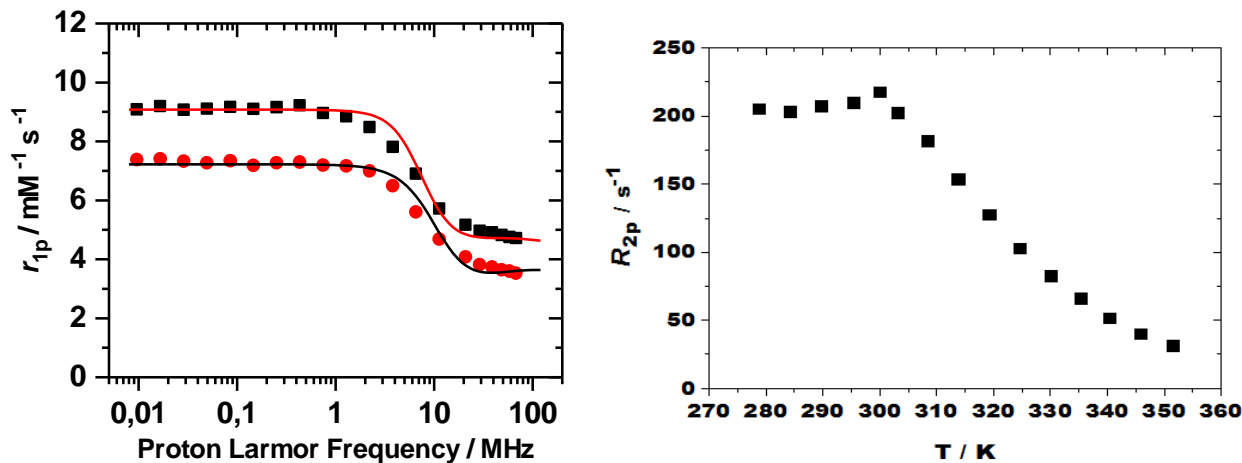


Fig. 49: Sinistra: Profili NMRD per una soluzione di GdL6, in PBS a pH 7.2 a 25°C (cerchi neri) e 37°C (quadrati rossi); Destra: Andamento di  $R_{2p}$  del nucleo  $^{17}\text{O}$  in funzione della temperatura del complesso.

Nella figura 50 sono riportati gli andamenti della rilassività, misurata a 20 MHz e a 25 °C, dei complessi GdL4-L5 in funzione del pH.

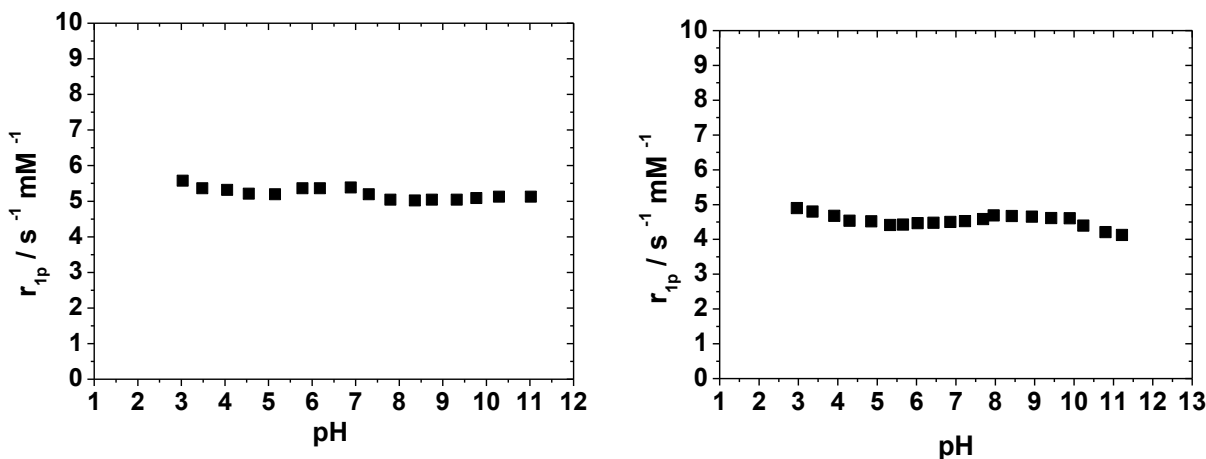


Fig. 50: A sinistra il profilo di  $r_{1p}$  ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) in funzione del pH di GdL4, a destra quello di GdL5, entrambi a 25°C e 20 MHz.

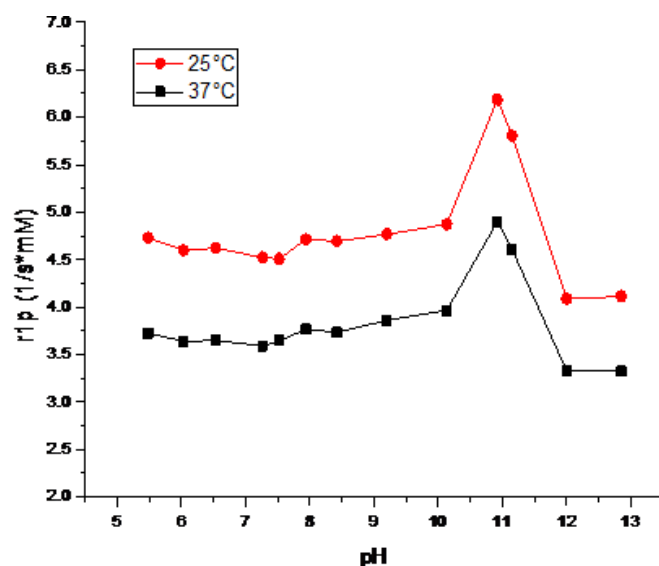


Fig. 51: Grafico  $r_{1p}$  in funzione del pH per una soluzione di GdL6, a due temperature differenti e a 20 MHz.

Mentre si può considerare costante l'andamento della rilassività con il pH per GdL4 e GdL5, nel caso di GdL6 si può osservare un andamento più o meno costante fino a pH = 10 e poi un picco di rilassività ad pH intorno a 11. A pH = 12, l' $r_{1p}$  è già calato di due 2.5 punti e si trova ad un livello inferiore rispetto al plateau iniziale. Questo comportamento anomalo è tipico dei complessi GdHPDO3A derivati ed è dovuto alla aumento della velocità di scambio del protone del gruppo ossidrilico che quindi va a contribuire in maniera sostanziale alla rilassività. A pH > 12 invece, probabilmente avviene la deprotonazione del gruppo ossidrilico che quindi fa tornare la rilassività quasi al valore iniziale.

### 3.5 Conclusioni

Gli aspetti fondamentali che emergono da questo capitolo sono:

- 1) Data la presenza di quasi due molecole d'acqua nella prima sfera di coordinazione ( $q = 1.9$ ), il complesso con la rilassività più elevata risulta essere GdL3 ( $r_{1p} = 6.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a 20 MHz e 298 K). Esso risulta essere un agente di contrasto leggermente più performante del suo corrispettivo con braccia acetiche (GdDO3A), tuttavia, come nel caso di GdDO3A, anche per GdL3 almeno una delle molecole di acqua coordinate viene spiazzata dallo ione carbonato a pH > 8 causando un sensibile decremento di  $r_{1p}$ .
- 2) Il complesso GdL4 risulta avere proprietà rilassometriche molto simili al GdDOTMA; quindi, la rimozione di un metile su di un braccio acetico non altera in maniera sostanziale le proprietà del

chelato. Studi di  $^1\text{H}$  NMR in alta risoluzione dei complessi **EuL4** hanno permesso di dimostrare l'esistenza di entrambi gli isomeri TSAP e SAP in percentuale di circa il 66% per l'isomero TSAP e del 34% di quello SAP. Inoltre, la presenza in piccola quantità ( $< 5\%$ ) altre due specie isomeriche, oltre agli stereoisomeri SAP e TSAP, dimostra che non è più impedita, come invece nel caso di GdDOTMA, l'inversione dell'orientazione delle braccia. Per quanto riguarda invece il complesso **YbL4** sono necessari ulteriori studi per determinare quale tipo di specie sono presenti in soluzione.

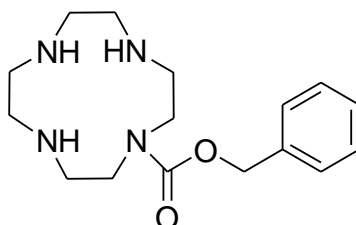
3) Dall'analisi del profilo  $^{17}\text{O}$  NMR si può notare che il complesso **GdL5** risulta essere presente in due forme, una a scambio veloce (TSAP) e l'altra a scambio lento (SAP). La percentuale di questi due isomeri è stata determinata attraverso l'analisi  $^1\text{H}$  NMR, per il complesso **EuL5**, risultando che gli isomeri SAP e TSAP possiedono approssimativamente la stessa popolazione, mentre predomina quest'ultima conformazione per **YbL5**. La velocità di rilassamento di **GdL5** risulta essere la più bassa fra i complessi studiati in questo capitolo ( $r_{1p} = 4.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 20 MHz e 298 K), ma questo complesso risulta molto interessante in quanto grazie alla presenza di un'ammina primaria libera può essere coniugato a biomolecole o a vettori che permettano di veicolare la sonda verso determinati target biologici.

4) La presenza di un gruppo ossidrilico nel legante **L6** che partecipa alla complessazione del Gd(III) causa un comportamento anomalo del complesso al variare del pH (risultati simili si troveranno anche nel capitolo successivo, dove si discuteranno più nel dettaglio i complessi HPDO3A-derivati). La rilassività, per i complessi aventi  $q = 1$ , risulta essere la più elevata della famiglia, anche se di poco. Il complesso possiede una velocità di scambio molto elevata, paragonabile a quella dell'isomero TSAP del complesso **GdL5**. Per quanto riguarda lo studio  $^1\text{H}$  NMR del complesso **EuL6** si nota la presenza di almeno tre specie isomeriche, non soltanto gli isomeri TSAP e SAP, pertanto necessitano ulteriori studi per una definizione dell'effettiva popolazione degli isomeri nel complesso. Invece, nel caso di **YbL6** si osserva solo la presenza dell'isomero TSAP.

## 3.6 Parte Sperimentale:

### 3.6.1 DO3MA:

- **Cyclen-Cbz (8):**



Il cyclen monoCbz è inizialmente presente sotto forma di sale di HCl. Per rendere le basi libere dallo ione Cl<sup>-</sup> dal cyclen-Cbz è stata utilizzata una colonna impaccata con resina a scambio ionico Amberlite® IRA-410 attivata in forma ossidrilica con un litro di soluzione di NaOH 1M. Successivamente si è eluito con H<sub>2</sub>O fino a che il pH non sia tornato neutro.

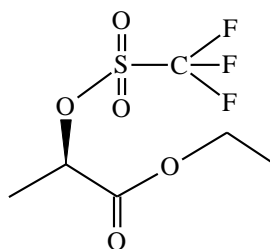
Sono stati sciolti 603 mg di cyclen-Cbz\*HCl (P.M.= 415g/mol; 1,4mmol) in 2ml di H<sub>2</sub>O e la soluzione ottenuta è stata seminata in colonna.

Si è eluito con acqua fino a quando il pH non è diventato di nuovo neutro tenendo tutte le frazioni eluite, in quanto non vi erano altre specie presenti.

Una volta raggiunto il pH neutro la soluzione è stata portata a secco al rotovapor.

Resa: 375mg, P.M.=306,4 g/mol; resa=85%

- **Etil-(S)-Trifluoro Lattato:**



1 eq. di etil (S)-lattato (104 mg; P.M.= 118,13 g/mol; 0,88mmol) sono stati sciolti in 10 ml di DCM anidro. Alla soluzione si sono aggiunti gocciolando lentamente 1.1 eq. di anidride triflica (0,97 mmol; P.M.= 282,14 g/mol; 270mg; d=1,677 g/ml; l=0,16), sciolti in 10 ml di DCM anidro, a 0°C e sotto flusso di N<sub>2</sub>.

Dopo dieci minuti, si sono aggiunti goccia a goccia, 1.3 eq. di piridina (1,14 mmol, P.M.= 79,1 g/mol, 91 mg.), sciolti in 3 ml di DCM anidro, il tutto a 0 °C e sempre sotto flusso di N<sub>2</sub>.

Dopo altri 10 minuti la soluzione è stata portata a secco al rotovapor per eliminare il solvente. Successivamente sono stati aggiunti 20ml di esano e la soluzione è stata lavata due volte con acqua deionizzata (2 x 15ml).

In seguito le fasi acquose sono state riunite e estratte due volte con esano (2x15ml). Una volta riunite le fasi organiche, si sono anidrificate con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la soluzione è stata filtrata e portata a secco al rotovapor.

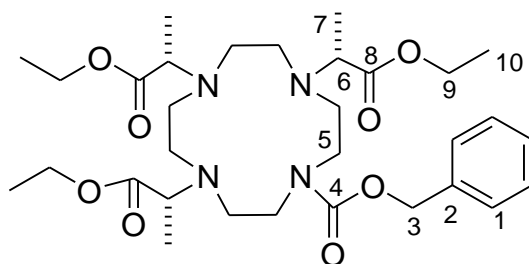
Si è ottenuto un olio di colore rosso-arancione, il quale è stato immediatamente usato per lo step successivo a causa dell'instabilità dei triflati.

Resa: 123 mg; P.M. = 250,19 g/mol; resa=55,6%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 251.01; trovata 251.19



• **DO3MA-Cbz (9):**



1 eq. di cyclen-Cbz ( 67 mg, P.M.= 306,4 g/mol; 0,22 mmol) e 10 eq. di  $K_2CO_3$  (2.2 mmol; P.M.=138,21 g/mol; 304 mg) sono stati sciolti in 20 mL di  $CHCl_3$ . 4 equivalenti dell'Etil-(S)-Trifluoro Lattato (0,88 mmol; P.M.=250,19 g/mol; 220 mg), sciolti in 10mL di  $CHCl_3$  sono stati aggiunti lentamente mediante gocciolamento alla soluzione in un bagno di ghiaccio (0 °C) e sotto flusso di azoto. Una volta terminato il gocciolamento la reazione è stata lasciata andare per 72h alla temperatura di 50°C.

A reazione avvenuta la soluzione è stata filtrata per eliminare il  $K_2CO_3$  ed è stata portata a secco al rotovapor.

Successivamente è stata eseguita una colonna cromatografica (impaccata con gel di silice) per isolare il nostro prodotto dai sottoprodotti di mono e disostituzione. Come eluente si è utilizzata una miscela DCM:MeOH 99:1.

Le frazioni contenenti il prodotto sono state unite e seccate al rotovapor, ottenendo così un olio giallo-bruno, che successivamente è stato caratterizzato attraverso l'analisi di massa e NMR.

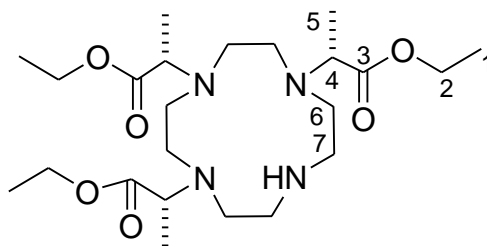
Resa: 38mg; P.M.= 606,75 g/mol; resa=28,4%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per  $C_{31}H_{50}N_4O_8$  [M+H]<sup>+</sup>: 607.37; trovata 607.75

<sup>1</sup>H NMR,  $CDCl_3$   $\delta$  (ppm): 1,17 (H<sub>9</sub>, m, 9H); 1,22 (H<sub>6</sub>, m, 9H); 2,43-2,99 (H<sub>5</sub>ring, m, 16H); 3,45 (H<sub>10</sub>, m, 3H); 3,50 (H<sub>7</sub>, m, 6H); 5,11 (H<sub>3</sub>, m, 2H); 7,31 (H<sub>1</sub>, m, 5H)

<sup>13</sup>C NMR,  $CDCl_3$   $\delta$  (ppm): 14,47 (C<sub>9</sub>-C<sub>6</sub>); 47,03-51,23 (C<sub>5</sub> ring); 59,29 (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>); 60,05 (C<sub>3</sub>); 127,73 (C<sub>1</sub>); 137,17 (C<sub>2</sub>); 156,31 (C<sub>4</sub>); 173,34 (C<sub>8</sub>)

- **DO3MA-triEtil estere (10):**



1 eq. DO3MA-Cbz (270 mg, P.M.=606,75 g/mol, 0,445mmol) sono stati sciolti in 10 ml di metanolo. A questa soluzione sono stati aggiunti circa 30 mg di Pd/C (10% p/p), e qualche goccia (1% v/v) di acido Acetico che ha la funzione di catalizzatore.

Successivamente è stato fatto gorgogliare H<sub>2</sub> nella soluzione e la reazione è stata lasciata procedere, sotto vigorosa agitazione meccanica, per circa 4h a temperatura ambiente.

La soluzione è stata poi filtrata su celite per eliminare il catalizzatore e il grezzo di colore giallo/bruno è portato al rotovapor per rimuovere il solvente.

Per purificare il prodotto è stata eseguita una colonna cromatografica (impaccata con gel di silice) usando come eluente la miscela tra DCM: MeOH 9:1.

Le frazioni contenenti il prodotto sono state unite e successivamente caratterizzate.

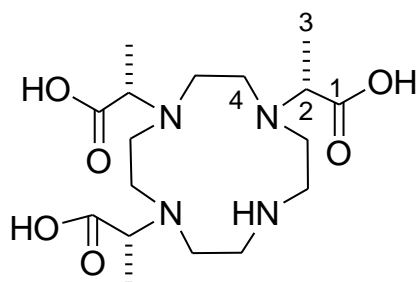
Resa: 105 mg; P.M.= 472,62g/mol; resa %= 50%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 472.33; trovata 473.62

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1,08-1,18 (H<sub>1</sub>, m, 9H; H<sub>5</sub>, m, 6H; H<sub>5'</sub>, m, 3H); 2,33-2,91 (H<sub>6</sub>-H<sub>7</sub> ring, m, 16H); 3,36-3,56(H<sub>4</sub>, m, 2H; H<sub>4'</sub>, m, 1H); 3,95-4,00 (H<sub>2</sub>, m, 6H).

<sup>13</sup>CNMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 14,28 (C<sub>1</sub>); 14,32 (C<sub>5</sub>); 14,83 (C<sub>5'</sub>); 46,72-50,16 (C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>); 54,90 (C<sub>4</sub>); 58,59 (C<sub>4'</sub>); 60,20 (C<sub>2</sub>); 172,89 (C<sub>3</sub>).

- **DO3MA (L3):**



1 eq di DO3MA-triEtil (140 mg, P.M.= 472,7 g/mol; 0,29mmol) sono stati sciolti in HCl 6 M e portati a riflusso per una notte.

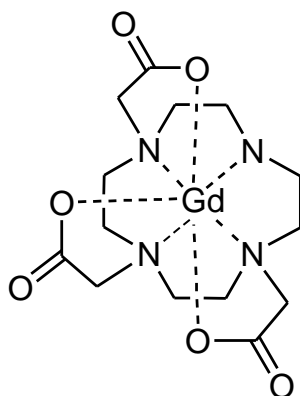
Successivamente si è neutralizzata la soluzione, e poi si trattata con Et<sub>2</sub>O. Il precipitato che si è formato, dopo esser stato isolato dalla soluzione, è stato seccato, ottenendo un solido bianco.

Resa: 53 mg; P.M.=388,5g/mol; resa % = 49 %

<sup>1</sup>H NMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 1,53 (H<sub>3</sub>, m, 9H); 3,14-3,51 (H<sub>4</sub> ring, m, 16H); 3,62 (H<sub>2</sub>, m, 3H);

<sup>13</sup>C NMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 7,87-9,06 (C<sub>3</sub>); 45,12-50,74 (C<sub>4</sub> ring); 59,90 (C<sub>2</sub>); 173,08 (C<sub>1</sub>);

- **Gd-DO3MA (GdL5):**



1 eq. di  $\text{GdCl}_3$  (P.M.=371g/mol; 14,3 mg) è stato aggiunto a 1 eq. di DO3MA (**L5**) (15 mg, P.M.=388,5g/mol) sciolti in 5ml di  $\text{H}_2\text{O}$ .

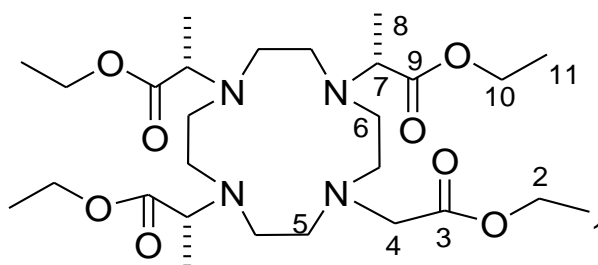
La reazione è stata fatta andare per 72h alla temperatura di  $50^\circ\text{C}$ , controllando che il pH sia al valore di circa 7.

La soluzione è stata portata a pH 9 e lasciata per 5 ore a temperatura ambiente.

Successivamente filtrata per eliminare l'idrossido di gadolinio e liofilizzata

### 3.6.2 DO3MA-Ac:

- **DO3MA-Ac-tetraEtile (11):**



1 eq di DO3MA-triEtil (**10**) (0.215 mg; P.M.= 472,6g/mol; 0,45mmol) e 3 equivalenti di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,36mmol; P.M.=138,21g/mol; 189mg) sono stati sciolti in 20 ml di ACN.

A questa soluzione si sono aggiunti mediante gocciolamento, 1.3 equivalenti di Etil-Br-Acetato (0,59 mmol; P.M.=167,01g/mol ; 99 mg).

La reazione è stata lasciata sotto agitazione a 60°C per la notte. Successivamente la soluzione è stata filtrata per eliminare K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ed il solvente è stato rimosso al rotovapor.

Per purificare il prodotto è stata eseguita una colonna cromatografica (impaccata con gel di silice) usando come eluente DCM:MeOH 95:5. Le frazioni contenenti il prodotto sono state seccate al rotovapor ottenendo un olio denso di color bruno.

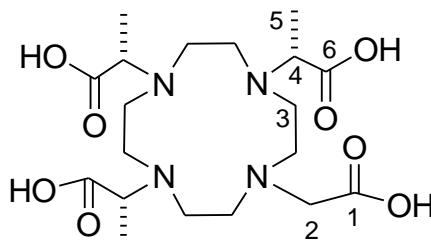
Resa: 100mg; P.M.= 558,71g/mol; 0,18 mmol; resa%=40%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 472.33; trovata 473.62

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1,26-1,33 (H<sub>1</sub>, m, 3H, H<sub>8</sub>, m, 9H, H<sub>11</sub>, m, 9H); 2,23-2,65 (H<sub>6</sub>, m, 10H); 2,94-2,98 (H<sub>4</sub>, m, 1H); 3,17-3,38 (H<sub>5</sub>, m, 6H); 3,49-3,53 (H<sub>4</sub>, m, 1H); 3,70-3,75 (H<sub>7</sub>, m, 3H); 4,12-4,22 (H<sub>2</sub>, m, 2H, H<sub>10</sub>, m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 7.64-7.75 (C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub>); 14,06 (C<sub>8</sub>); 44,72-48.78 (C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>); 52,83 (C<sub>4</sub>); 55,18 (C<sub>7</sub>); 61,16-61,39 (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>); 173,56 (C<sub>3</sub>); 175,97 (C<sub>9</sub>).

- **DO3MA-Ac (L4):**



1 eq di DO3MA-Ac-tetraEtile (100 mg; P.M.=558,71g/mol; 0,17mmol) sono stati trattati con 20ml di una soluzione di HCl 6M.

La reazione è stata lasciata in agitazione per tutta la notte mantenendo una temperatura di circa 50°C.

La soluzione è stata poi portata a secco al rotovapor.

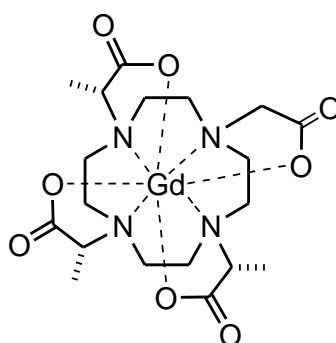
In seguito sono stati aggiunti 20ml di dietilere per precipitare il legante che successivamente è stato caratterizzato.

Resa: 6.7mg; P.M.=371g/mol; resa%=10.5%

$^1\text{H}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta$  (ppm): 1,00 ( $\text{H}_5$ , s, 3H); 1,31-1,33 ( $\text{H}_5$ , m, 6H); 2,34-2,97 ( $\text{H}_3$ , m, 16H); 3,01-3,55 ( $\text{H}_2$ , m, 1H,  $\text{H}_2'$ , m, 1H); 4,12-4,31 ( $\text{H}_4$ , m, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta$  (ppm): 8,98 ( $\text{C}_5$ ); 42,62-52,29 ( $\text{C}_3$ ring); 54,46 ( $\text{C}_2$ ); 59,09 ( $\text{C}_4$ ); 168,36-176,72 ( $\text{C}_1$ ).

- **Gd-DO3MA-Ac (GdL4):**



1 eq. di  $\text{GdCl}_3$  (P.M.=371g/mol; 12,4mg) è stato aggiunto a 1 eq. di DO3MA-Ac (15 mg, P.M.=446,5g/mol) sciolti in 2ml di  $\text{H}_2\text{O}$ .

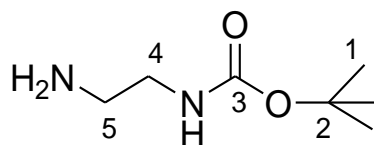
La reazione è stata fatta andare per 72h alla temperatura di  $50^\circ\text{C}$ .

La soluzione è stata portata a pH 9 e lasciata per 5 ore a temperatura ambiente.

Successivamente, filtrata per eliminare l'idrossido di gadolinio ( $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ) e liofilizzata.

### 3.6.3 DO3MA-MA:

- **Etilen-diAmmino-MonoBoc:**



1 eq etilendiammina (1,24 g; P.M.=60,10g/mol; 0,02mol) è stato sciolto in 10ml di THF.

0,11 equivalenti di ditez-butildicarbonato (P.M.=218,25 g/mol; 500mg), sciolti in 20 ml di THF, sono stati fatti gocciolare a 0 °C nella soluzione.

A questo punto la reazione è stata lasciata andare in agitazione a temperatura ambiente per 48h.

Una volta terminata, la soluzione è stata filtrata per eliminare il precipitato ed è stata portata a secco al rotovapor per rimuovere l'eccesso di THF.

L'olio di colore giallo ottenuto è stato sciolto in 20 ml di acqua saturata con cloruro di sodio ed è stato eliminato il prodotto disostituito mediante filtrazione.

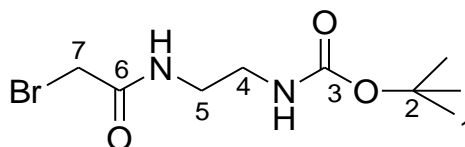
A questo punto il prodotto è stato estratto dalla soluzione acquosa con DCM (4x15 ml), quindi la fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e portata a secco al rotovapor. Si è ottenuto un olio di colore giallo.

Resa: 153mg, P.M. = 160,21 g/mol; resa % = 43%

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1,42 (H<sub>1</sub>, s, 9H); 2,77 (H<sub>5</sub>, m, 2H); 3,15 (H<sub>4</sub>, m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 28,38 (C<sub>1</sub>); 41,86 (C<sub>3</sub>); 43,41 (C<sub>4</sub>); 79,10 (C<sub>2</sub>); 156,22 (C<sub>5</sub>)

- ***N*-(2-terz-butossicarbonilamminoetil)bromoacetamide (12):**



1 eq. di etilendiammina mono-Boc (191 mg, P.M.=160,21g/mol; 1,2mmol) sono stati sciolti in 2ml di DCM. A questa soluzione sono stati successivamente aggiunti 4 ml di una soluzione 1M di NaOH in H<sub>2</sub>O.

1.1 eq. di 2-bromoacetilbromuro (1,3 mmol; P.M.=201,84g/mol; 265mg; d=2,317g/ml; ml=0,114) sono stati sciolti in 10 ml di DCM e gocciolati, sotto azoto, nella soluzione di etilendiammina mono-Boc immersa in un bagno di ghiaccio.

La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 15h.

Successivamente sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata e il prodotto è stato estratto tre volte con DCM (3x15ml).

Quindi la fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata ed evaporata al rotovapor ottenendo un solido di colore bianco.

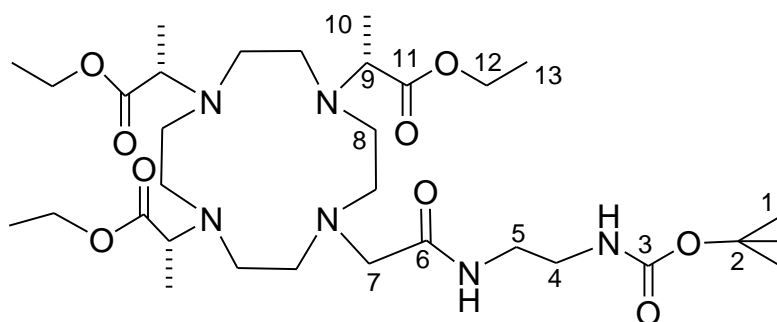
Resa: 258mg, P.M.= 281 g/mol, resa %= 75%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 281.15; trovata 281.04

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1,36 (H<sub>1</sub>, s, 9H); 3,22 (H<sub>4</sub>, m, 2H); 3,32 (H<sub>5</sub>, m, 2H); 3,79 (H<sub>7</sub>, s, 2H)

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 28,34 (C<sub>1</sub>); 28,76 (C<sub>7</sub>); 39,69 (C<sub>4</sub>); 41,00 (C<sub>5</sub>); 79,49 (C<sub>2</sub>); 156,79 (C<sub>3</sub>); 167,05 (C<sub>6</sub>)

- **DO3MA-triEtil-MA-Boc (13):**



1 eq di DO3MA-triEtil (**10**) (150 mg, P.M.=472,62g/mol) e 3 equivalenti di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,95mmol; P.M.=138,21g/mol; 131mg) sono stati sciolti in 20 ml di ACN.

Alla soluzione si sono aggiunti mediante gocciolamento 1.1 eq del composto **12** (0,34mmol; P.M.=281g/mol; 98mg), sciolto in 10ml di ACN, La reazione è stata lasciata sotto agitazione a 60°C per la notte.

Successivamente la miscela è stata filtrata ed il solvente rimosso al rotovapor. Per purificare il prodotto è stata eseguita una colonna cromatografica (impaccata con gel di silice) usando come eluente ACN:NH<sub>3</sub> 95:5. Le frazioni con il prodotto sono state riunite ottenendo un solido bianco.

Resa: 165mg; P.M.=672,85g/mol; resa%=75%

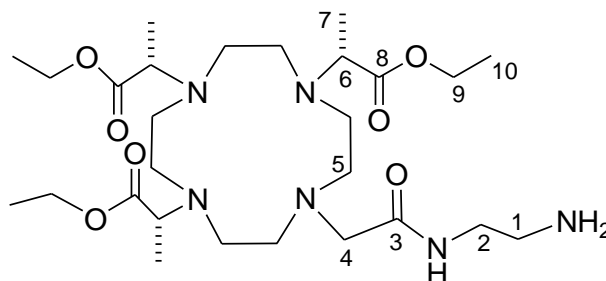
ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 673.85; trovata 673.44



$^1\text{H}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 1.14-1.37 ( $\text{H}_5$ , m, 2H;  $\text{H}_{13}$ , m, 9H); 1,22 ( $\text{H}_1$ , m, 9H); 2,27-2,36 ( $\text{H}_4$ , m, 2H;  $\text{H}_5$ , m, 2H); 2,53-3,12 ( $\text{H}_8$ , m, 12H); 3,26-3,48 ( $\text{H}_7$ , m, 2H;  $\text{H}_8$ , m, 4H); 3,63-3,68 ( $\text{H}_9$ , m, 3H); 4,03-4,17 ( $\text{H}_{12}$ , m, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 7.56 ( $\text{C}_{10}$ ); 14,09 ( $\text{C}_{13}$ ); 28,35 ( $\text{C}_1$ ); 39,83 ( $\text{C}_8$ ); 44,44-48,70 ( $\text{C}_8$ : ring,  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_5$ ); 51,85 ( $\text{C}_7$ - $\text{C}_9$ ); 56,11 ( $\text{C}_{12}$ ); 78,50 ( $\text{C}_2$ ); 156,31 ( $\text{C}_3$ ); 172,14 ( $\text{C}_6$ ); 175.55 ( $\text{C}_{11}$ )

- **DO3MA-triEtil-MA (14):**



Una miscela di acido trifluoroacetico e DCM in rapporto stechiometrico 1:1 (3mL : 3 mL) è stata aggiunta ad 1 eq di DO3MA-triEtil-MA-Boc (165 mg, P.M.=672,85 g/mol; 0,24mmol).

La reazione è stata fatta reagire tutta la notte, sotto agitazione, a 60 °C a temperatura ambiente.

Dopodichè è stata seccata e all'olio incolore ottenuto, sono stati aggiunti 15ml di una soluzione 0,1 M di carbonato di sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); la soluzione è stata estratta con DCM (3x15 ml), anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrata e portata a secco al rotovapor.

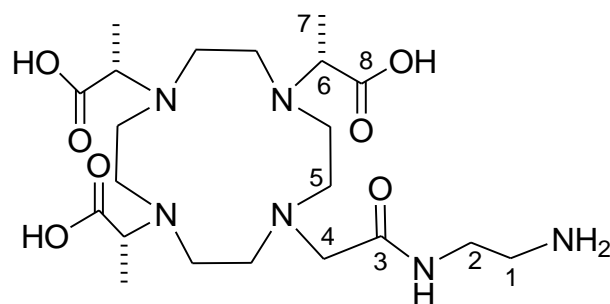
Resa: 140mg; P.M.=572,7g/mol; 0,24mmol; resa%=100%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per  $\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 573.39; trovata 573.74

$^1\text{H}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 1.33-1.37 ( $\text{H}_7$ , m, 9H,  $\text{H}_{10}$ ; m, 9H); 2.66-2,94 ( $\text{H}_1$ , m, 2H,  $\text{H}_5$  ring, m, 16H); 2,94-2,96 ( $\text{H}_4$ , m, 2H); 3,05 ( $\text{H}_2$ , m, 2H); 3,09-3,12 ( $\text{H}_6$ , m, 3H); 3,60-3,63 ( $\text{H}_9$ , m, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 13,36 ( $\text{C}_{10}$ ); 13,40 ( $\text{C}_7$ ); 40,88 ( $\text{C}_1$ ); 41,49 ( $\text{C}_2$ ); 48,53-54,92 ( $\text{C}_5$  ring); 57,70 ( $\text{C}_4$ ); 58,20 ( $\text{C}_6$ ); 60,05 ( $\text{C}_9$ ); 173,89 ( $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$ )

- **DO3MA-MA (L5):**



1 eq di DO3MA-triEtil-MA (140 mg, P.M.=572,7g/mol; 0,24mmol) sono stati trattati con 20ml di una soluzione di HCl 6M.

La reazione è stata lasciata in agitazione per tutta la notte mantenendo una temperatura di circa 50°C.

La soluzione è stata poi portata a secco al rotovapor.

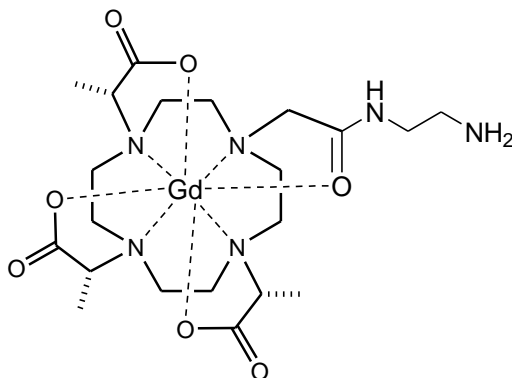
In seguito sono stati aggiunti 20ml di dietiletere per precipitare il composto (**L5**) che successivamente è stato caratterizzato.

Resa: 53mg; P.M.=446,5g/mol; resa%=50%

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1,53 (H<sub>6</sub>, m, 9H); 2,87 (H<sub>1</sub>, m, 2H); 3,14-3,51 (H<sub>3</sub>, m, 2H; H<sub>4</sub>ring, m, 16H); 3,62 (H<sub>5</sub>, m, 3H); 3,83 (H<sub>2</sub>, m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 7,87-9,06 (C<sub>6</sub>); 36,55 (C<sub>2</sub>); 36,71 (C<sub>1</sub>); 45,12-50,74 (C<sub>4</sub> ring); 54,99 (C<sub>3</sub>); 59,90 (C<sub>5</sub>); 173,08 (C<sub>7</sub>); 176,81 (C<sub>7</sub>).

- **Gd-DO3MA-MA (Gd-L5):**



1 equivalente di cloruro di gadolinio ( $\text{GdCl}_3$ ) (0,027mmol; P.M.=371g/mol; 10mg) è stato aggiunto a 1 eq. di DO3MA-MA (**L5**) (13 mg, P.M.=488,58g/mol; 0,027mmol) sciolti in 5ml di  $\text{H}_2\text{O}$ .

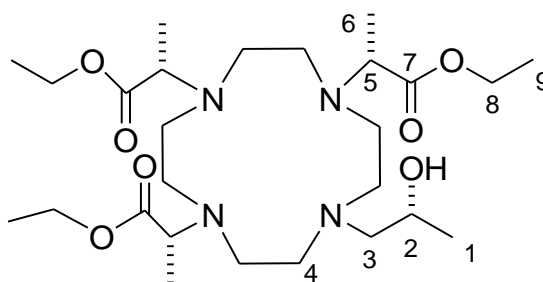
La reazione è stata fatta andare per 72h alla temperatura di  $50^\circ\text{C}$ .

La soluzione è stata portata a pH 9 e lasciata per 5 ore a temperatura ambiente.

Successivamente, filtrata per eliminare l'idrossido di gadolinio ( $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ) e liofilizzata.

### 3.6.4 HP-DO3MA:

- **HP-DO3MA-triEtil (15):**



1 eq di composto **10** (0.1 g, PM = 472.62 g/mol, n= 0.212 mmol) sono stati sciolti in etanolo nell'apposito contenitore per MicroOnde. Sono stati aggiunti 10 eq di 2-(S)-Ossido di Propilene (2.21 mmol, 0.184 g) e si è avviata la reazione catalizzata dalle microonde (70 Watt,  $140^\circ\text{C}$ , 0,5 ore)

Il grezzo di reazione è stato purificato tramite colonna cromatografica utilizzando come eluenti DCM:MeOH 9:1. Le frazioni contenenti il prodotto sono state unite, seccate mediante l'utilizzo di rotavapor e caratterizzate per via NMR.

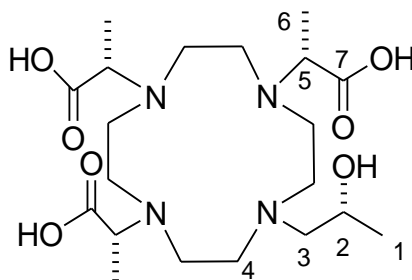
Resa: 25 mg; P.M.=530,7g/mol; resa% = 22%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 531.38; trovata 531.68

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.14-1.24 (H<sub>9</sub>, m, 9H – H<sub>6</sub>, m, 9H – H<sub>1</sub>, m, 3H); 2.53-2.95 (H<sub>4</sub> ring, m, 16H); 3.32- 3.41 (H<sub>3</sub>, m, 2H); 3.63-3.68 (H<sub>5</sub>, m, 3H); 4.03-4.17 (H<sub>8</sub>, m, 6H); 4.20-4.24 (H<sub>2</sub>, m, 1H)

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 8.34 (C<sub>9</sub>); 9.80 (C<sub>6</sub>); 25.84 (C<sub>1</sub>); 34.92-42.93 (C<sub>4</sub> ring); 51.61 (C<sub>5</sub>); 54.72 (C<sub>3</sub>); 57.42 (C<sub>2</sub>); 62.00 (C<sub>8</sub>); 171.73 (C<sub>7</sub>).

• **HP-DO3MA (L6):**



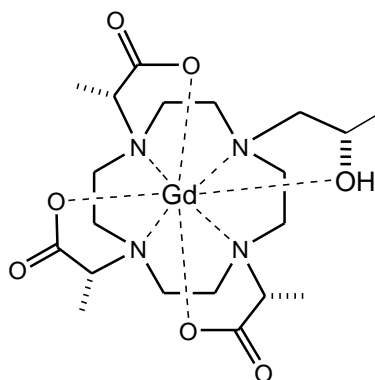
1 eq di composto **15** (PM=530.6 g/mol, 50 mg) sono stati sciolti in HCl 6 M. La reazione è portata a riflusso per una notte. Dopo aver portato il pH al valore di neutralità si è sciolto il legante in Et<sub>2</sub>O e il precipitato dopo essere stato recuperato è liofilizzato.

Resa: 12 mg; P.M.= 446.53g/mol; resa% = 29%

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.22-1.27 (H<sub>6</sub>, m, 9H – H<sub>1</sub>, m, 3H); 2.58-3.24 (H<sub>4</sub> ring, m, 16H); 3.47-3.52 (H<sub>3</sub>, m, 2H); 3.88-4.05 (H<sub>5</sub>, m, 3H); 4.44-4.47 (H<sub>2</sub>, m, 1H)

<sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 20.02 (C<sub>6</sub>); 25.95 (C<sub>1</sub>); 45.09-48.40 (C<sub>4</sub> ring); 59.53 (C<sub>5</sub>); 59.78 (C<sub>3</sub>); 60.09 (C<sub>2</sub>); 176.97 (C<sub>7</sub>).

- **Gd-HP-DO3MA (Gd-L6):**



Ad 1 equivalente de legante **L6** (8 mg, PM=446.53 g/mol) sono stati aggiunti 1 eq. GdCl<sub>3</sub> (P.M.=371g/mol; 7 mg) sciolti in 5ml di H<sub>2</sub>O.

La reazione è stata fatta andare per 72h alla temperatura di 50°C. Successivamente la soluzione è stata portata a pH di circa 9 e lasciata a reagire per 5 ore a temperatura ambiente.

Infine la si è filtrata per eliminare l'idrossido di gadolinio (Gd(OH)<sub>3</sub>) e liofilizzata. Il complesso così ottenuto è stato caratterizzato per via rilassometrica.

# **Capitolo 4**

## **HPDO3A-derivati**

## 4.1 Introduzione

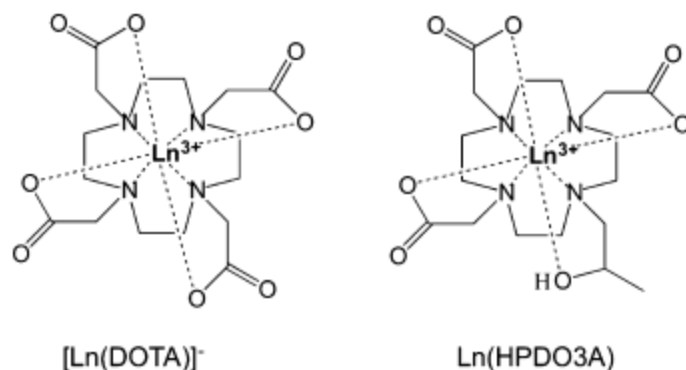


Fig 52: A sinistra il complesso LnDOTA, a destra quello LnHPDO3A

Il GdHPDO3A è un agente di contrasto molto usato in ambito clinico con il nome di Prohance, e possiede una rilassività, misurata a 20 MHz e 298 K, ( $r_{1p} = 4,60 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) leggermente inferiore sia rispetto quella del GdDTPA ( $r_{1p} = 4,80 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e GdDOTA ( $r_{1p} = 4,70 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), nonostante il loro peso molecolare sia praticamente identico.<sup>167</sup>

E' ben noto che a campi magnetici  $> 0.2 \text{ T}$  la rilassività di piccoli complessi a base di Gd(III) è determinata prevalentemente dal tempo di correlazione rotazionale ( $\tau_R$ ), parametro che è strettamente legato al peso molecolare. Le piccole differenze però potrebbero essere dipendenti da altri fattori, quali i parametri elettronici o lo scambio dell'acqua, che pur essendo poco rilevanti possono dare piccole variazioni al valore di rilassività.

Inoltre la velocità di rilassamento trasversale  $r_2$  ha un andamento diverso da quello tipicamente osservato per i complessi GdDTPA e GdDOTA: si ha infatti un incremento abbassando le temperature a valori inferiori a 280 K. Tale comportamento suggerisce l'esistenza di più specie isomeriche presenti in soluzione, con diverse velocità di scambio delle molecole d'acqua legate al sito metallico. Come abbiamo già detto nei capitoli precedenti, il complesso GdDOTA può esistere in due diverse geometrie di coordinazione, SAP e TSAP le quali, a loro volta, possono avere due diverse rotazioni delle braccia acetiche per un totale di quattro isomeri:  $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)/\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$  (SAP) e  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)/\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$  (TSAP). La sostituzione di un gruppo acetico determina una ancora minore simmetria del complesso causando così una più difficile analisi degli spettri NMR ottenuti.

In linea di principio, i macrociclici LnHPDO3A possono essere presenti in soluzione in otto forme isomeriche differenti, dipendenti dalla disposizione delle braccia acetiche ( $\Delta$  o  $\Lambda$ ), dalla conformazione dell'anello macrociclico ( $\delta\delta\delta\delta$  o  $\lambda\lambda\lambda\lambda$ ) e dalla configurazione del centro chirale (R o S) del braccio idrossipropilico. Tra queste otto strutture, quelle che differiscono per disposizione delle

braccia, dell'anello e del centro chirale sono coppie enantiomeriche, mentre le altre formano diastereoisomeri (Figure 53-54)

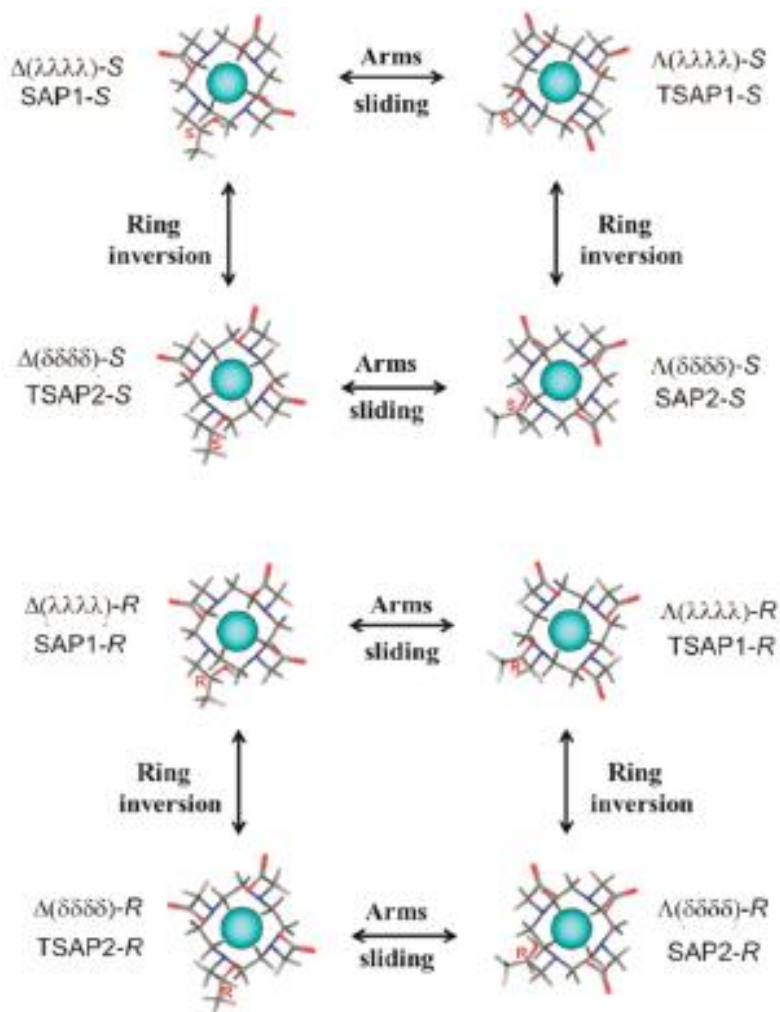


Fig. 53: Interconversioni per ottenere gli otto stereoisomeri



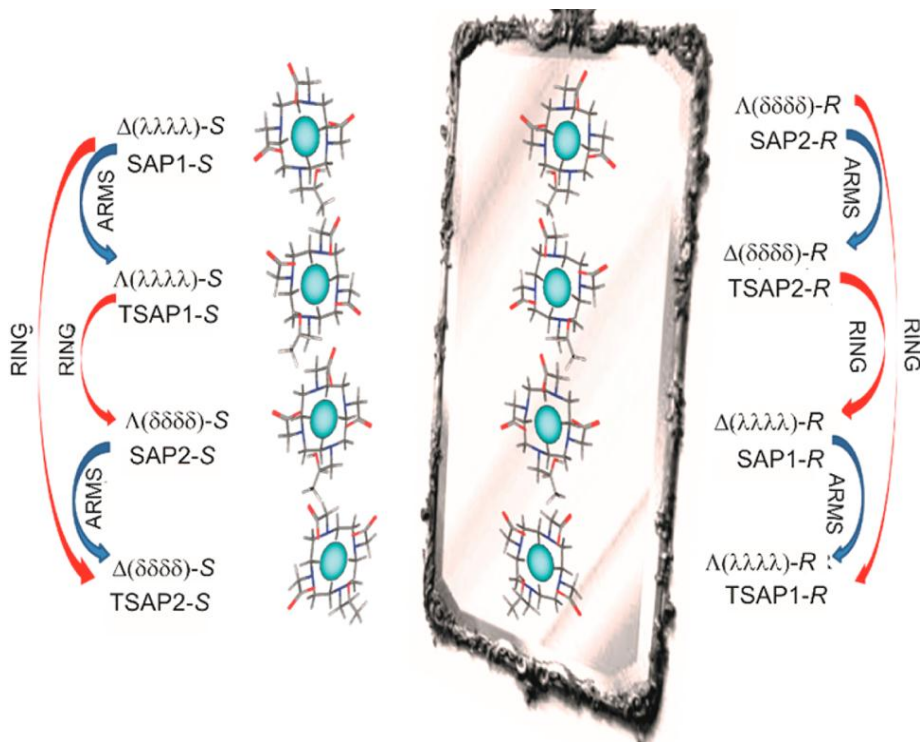


Fig.54: Quattro coppie di enantiomeri del GdHPDO3A

Due di queste coppie enantiomeriche però sono trascurabili in quanto le molecole di complesso che assumono questa conformazione sono irrilevanti, e la loro presenza è solo stata dedotta dall'interconversione degli altri isomeri. (Figura 55)

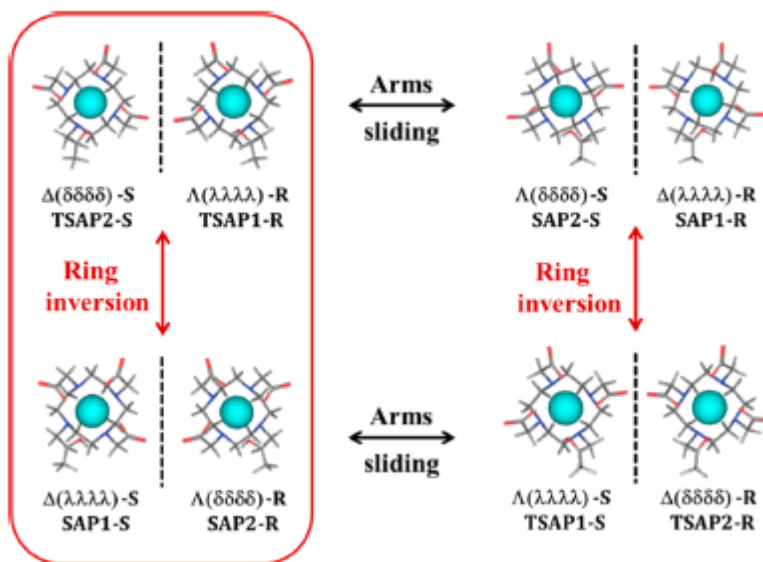


Fig. 55: A sinistra sono evidenziati i due stereoisomeri più abbondanti.

Come succede con i chelati DOTA-derivati, la geometria TSAP è preferita per i complessi che possiedono ioni lantanoidei all'inizio della serie, perché questa struttura fornisce una cavità più grande per accogliere meglio il grande raggio ionico dei primi ioni lantanoidei trivalenti. D'altra parte,

l'isomero SAP diventa sempre più abbondante fino a raggiungere un massimo per lo ione Ho (III). Per cationi più pesanti la frazione molare dello stereoisomero SAP diminuisce con il decrescere del raggio ionico.

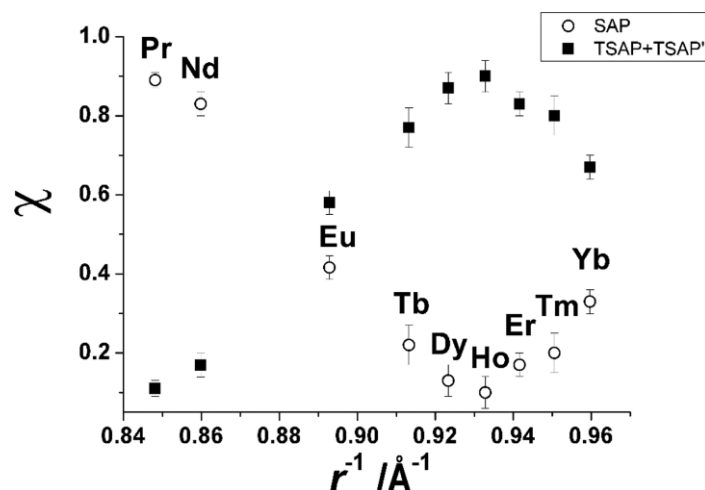
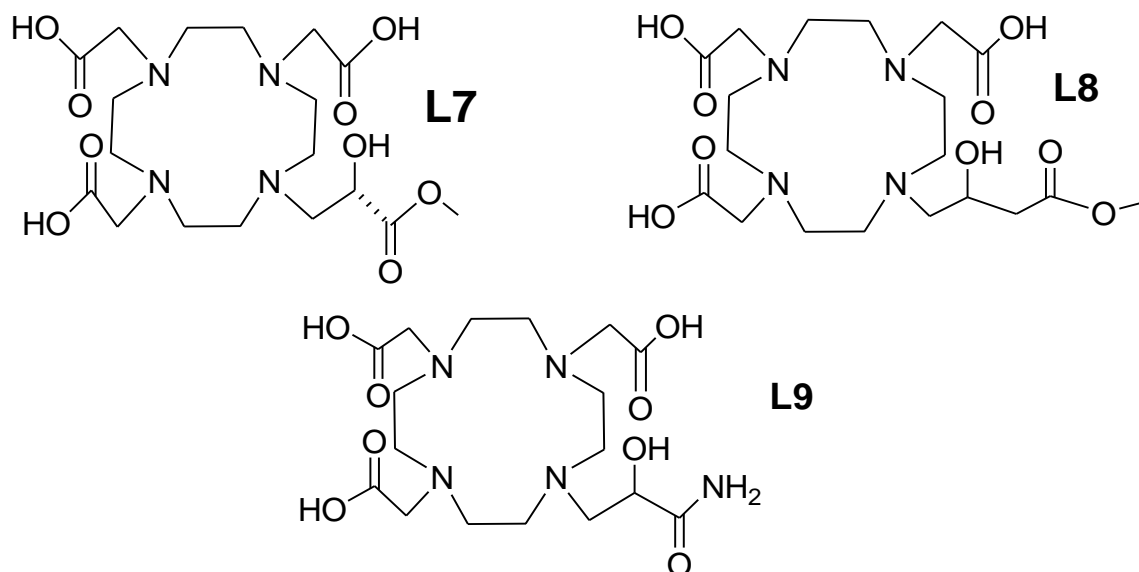


Fig. 56: Frazione molare degli isomeri LnHPDO3A, misurati a 298 K.

I complessi dei lantanidi con HPDO3A mostrano delle proprietà molto interessanti anche come sonde diagnostiche tramite CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer). Ad esempio, l'YbHPDO3A è stato recentemente proposto come agente paramagnetico sensibile alle variazioni di pH.<sup>140</sup> La stretta somiglianza tra l'YbHPDO3A e il ProHance sia in termini di stabilità che di biodistribuzione, rende il YbHPDO3A un ottimo candidato per diventare una sonda paraCEST per determinare il pH. Sono stati sviluppati altri sistemi LnHPDO3A che hanno applicazioni nel campo della risonanza magnetica come ad esempio possibili agenti- $T_2$  quando incapsulati nei liposomi (nel caso di DyHPDO3A)<sup>141</sup> o sistemi lipoCEST.<sup>168,169</sup>

Lo scopo del lavoro riportato in questo capitolo è stato quello di sintetizzare nuovi leganti HPDO3A-derivati che avessero diversi gruppi funzionali al posto del metile adiacente al gruppo ossidrilico. Per questo al posto del metile sono stati inseriti un gruppo ammidico (**L9**), un metilestere (**L7**) e un metilenmetilestere (**L8**). Questi gruppi funzionali hanno il duplice scopo di aumentare l'effetto elettron-attrattore sul gruppo ossidrilico rendendolo così più acido e di rendere possibile la presenza di una o più molecole di acqua di seconda sfera strutturate e quindi in grado di dare un effetto sulla rilassività.

Di seguito sono riportate le formule di struttura dei tre leganti sintetizzati.



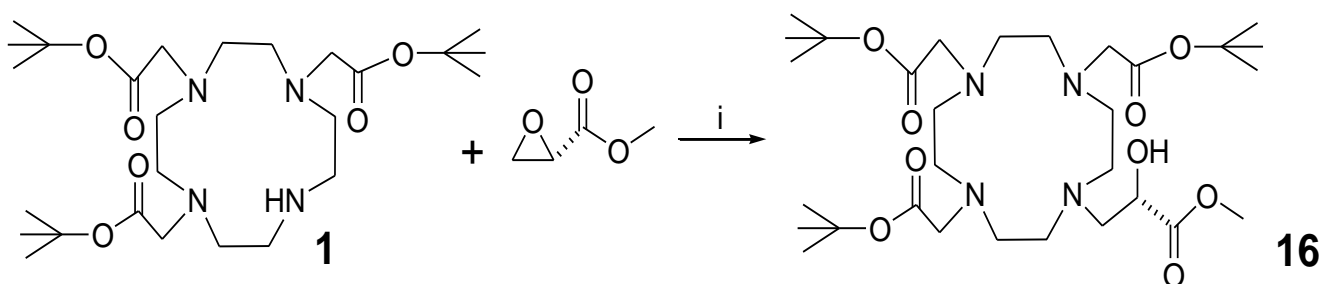
## 4.2 Sintesi:

Gli HP-DO3A-derivati sono leganti macrociclici poliamminocarbossilici che differiscono dal DOTA per la sostituzione di un braccio acetico con uno idrossipropilico. Come precursore per la sintesi si è quindi deciso di utilizzare dal DO3A(OtBu)<sub>3</sub>, che è stato fatto reagire con diversi epossidi al fine di ottenere un braccio avente una funzione idrossilica in posizione 2.

Si è deciso di investigare leganti aventi un gruppo metil 2-idrossipropanoato (**L7**) o 2-idrossipropanammide (**L9**), e metil 2-idrossibutanoato (**L8**).

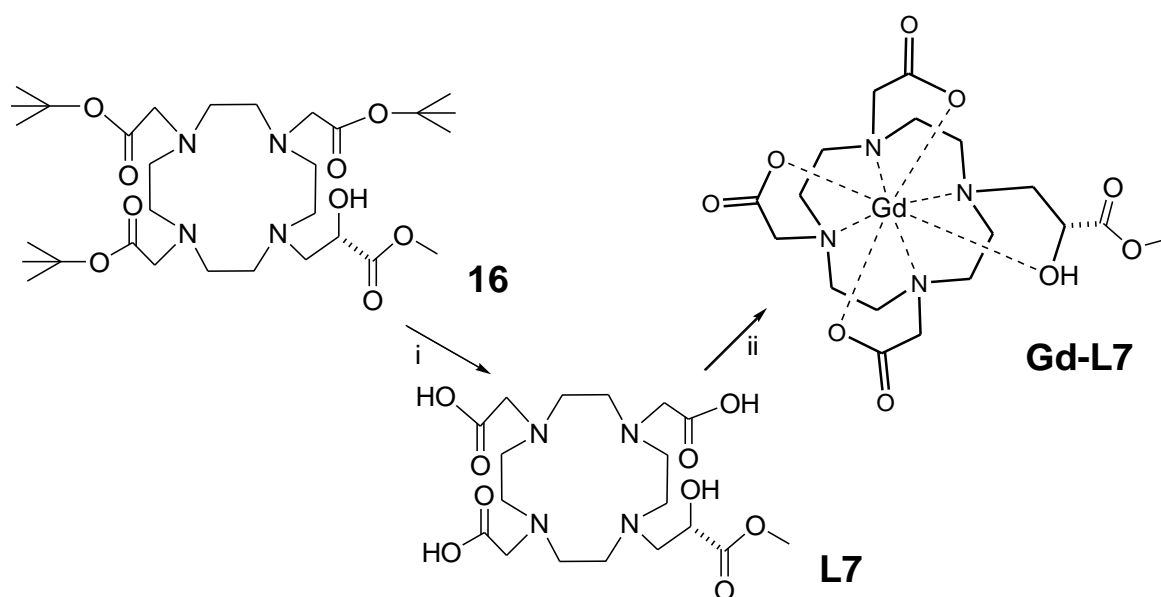
Gli epossidi utilizzati sono o commerciali (come quelli usati per i leganti **L7** e **L9**) o preparati in laboratorio (per ottenere il legante **L8**).

Sia a causa dell'estrema volatilità degli epossidi utilizzati che per cercare di aumentare le rese delle reazioni (nello step di apertura dell'eossido non superano mai il 50%), per tutte le reazioni di epossidazione si è reso necessario l'utilizzo di contenitori chiusi resistenti ad elevate pressioni e delle MicroOnde. Inizialmente si era cercato di cambiare solvente, durata e temperatura delle reazioni, ma solo con le MO si sono ottenuti dei risultati soddisfacenti. E' infatti ben consolidato che le MO velocizzano reazioni di sostituzione nucleofila e di apertura di epossidi attraverso un riscaldamento rapido ed efficiente della miscela di reazione e/o attraverso la stabilizzazione degli stati di transizione polari.<sup>164-165</sup> Per ottenere il legante MHP-DO3A (**L7**) si è fatto reagire il Metil 2(R)-glicidato (prodotto commerciale) con il DO3A(OtBu)<sub>3</sub>, secondo lo schema riportato di seguito.



Schema 20: i: Metil 2(R)Glicidato,  $Et_3N$ , MO (130 °C, 70 W, 0.5 h),  $CHCl_3$

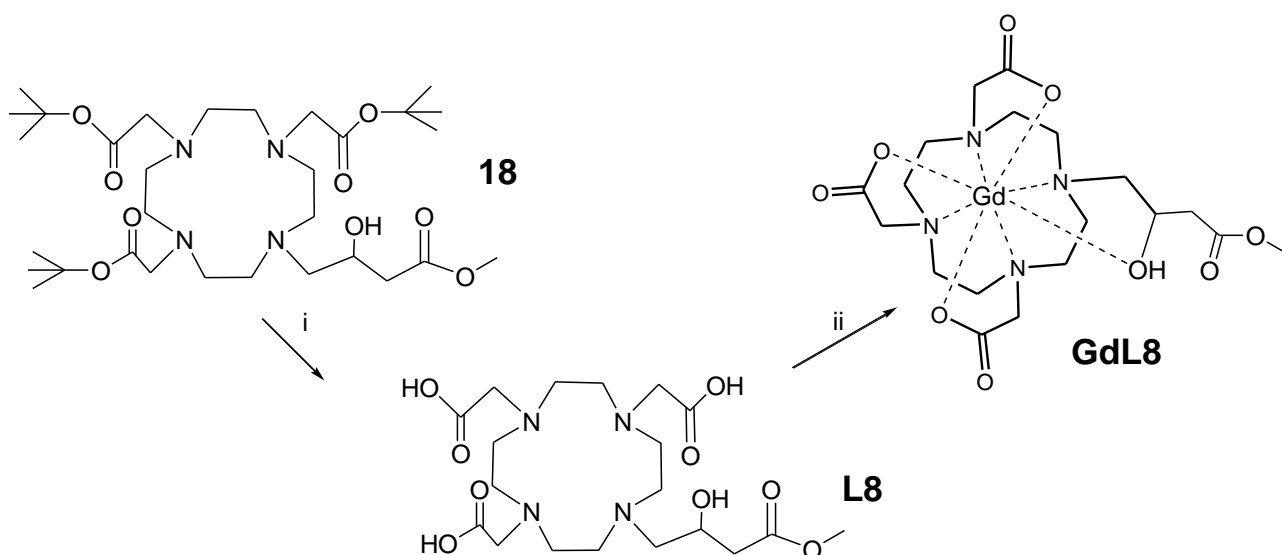
Dopo essere stato purificato tramite colonna cromatografica, il composto **16** è stato poi deproteetto dai *terz*-butil esteri utilizzando una miscela 1:1 di TFA:DCM e successivamente complessato con un sale di Gd(III) per poi poter essere caratterizzato per via rilassometrica (Schema 21).



Schema 21: i: TFA:DCM, r.t., o.n.; ii :  $GdCl_3$ ,  $H_2O$ , r.t. 4 h.

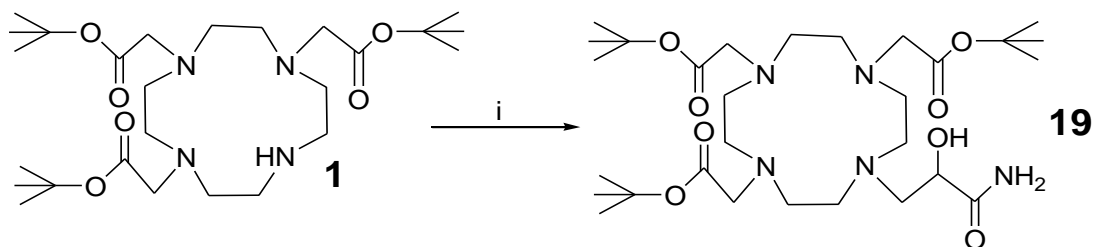
Per la sintesi del legante **L8** si è preparato in laboratorio l'epossido utilizzato per funzionalizzare il  $DO3A(OtBu)_3$ . In letteratura si trovano molti esempi per la preparazione dei epossidi a partire dall'alchene corrispondente, mediante l'utilizzo di perossidi. Nel nostro caso come ossidante si è utilizzato l'acido 3-cloro perbenzoico che è stato fatto reagire con il metil 3-butenato, secondo la reazione riportata nello schema sottostante.





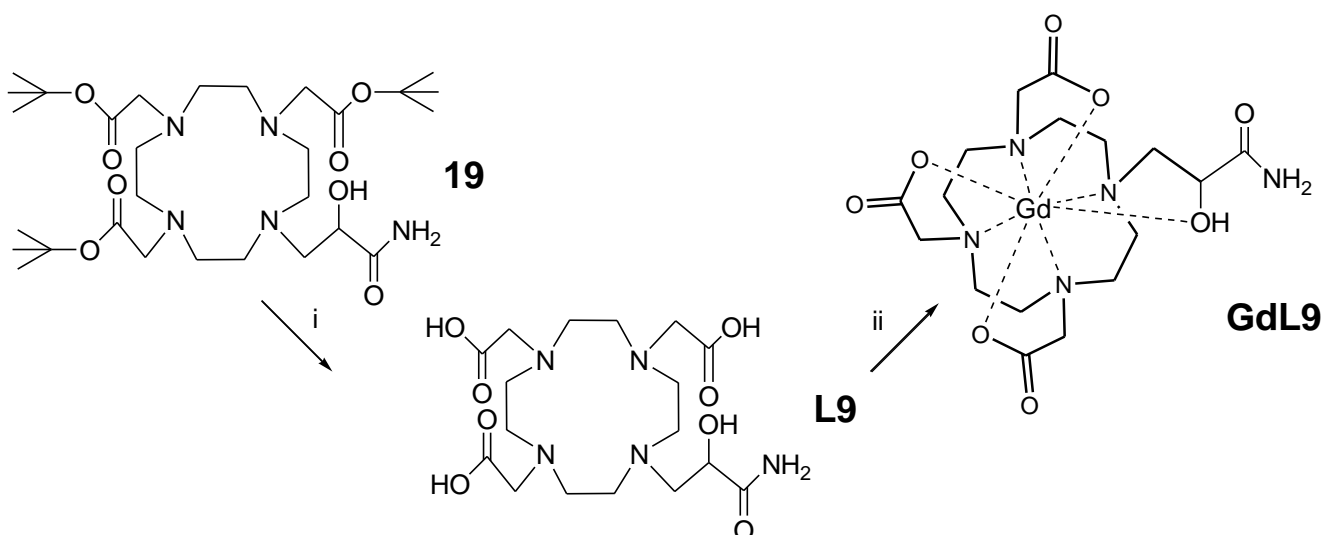
Schema 24: i: TFA:DCM, r.t., o.n.; ii : GdCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, r.t. 4 h.

L'ultimo legante appartenente a questa famiglia che è stato sintetizzato è il legante **L9**. Si è partiti come nei casi precedenti dal DO3A(OtBu)<sub>3</sub> che è stato alchilato con la Glicidammide attraverso una reazione assistita dalle microonde (Schema 25).



Schema 25: i: Glicidammide, Et<sub>3</sub>N, MO (130 °C, 70 W, 0.5 ore), Toluene

Il prodotto **19**, dopo essere stato purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice, è stato deproteetto dagli esteri *terz*-butilici utilizzando una miscela 1:1 di TFA/DCM e poi complessato con GdCl<sub>3</sub> (Schema 26).



Schema 26: i: TFA:DCM, r.t., o.n.; ii : GdCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, r.t. 4 h.

### 4.3 Analisi Rilassometrica:

Dato che i complessi di Gd(III) discussi in questo capitolo hanno una rilassività potenzialmente dipendente dal pH, prima della misura dei profili NMRD e <sup>17</sup>O NMR, è stata misurata la rilassività in funzione del pH di GdL7, GdL8 e GdL9 a 20 MHz e 298 K. Si è notato che, in effetti, i complessi GdL7 e GdL9 possiedono una rilassività dipendente dal pH con valori di  $r_1$  molto differenti passando da pH acidi a pH basici (Figura 57). L'andamento di  $r_1$  con il pH è comunque molto diverso per i due complessi GdL7 e GdL9: mentre nel caso di GdL7 si passa in maniera pressoché lineare da un valore di  $r_{1p}$  di 11.1 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a 4.4 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> fra pH 4 e 9, nel caso di GdL9 c'è un brusco cambio di rilassività fra pH 6 e 7 (da  $r_{1p} = 9.3$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a pH < 5 a  $r_{1p} = 4.2$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a pH > 8), tipico di un cambiamento di idratazione del complesso di Gd(III) a seguito di un equilibrio acido-base. Il complesso GdL8, invece, risulta stabile nell'intervallo di pH analizzato con una rilassività di 7.0 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (20 MHz e 298 K, Figura 58). Importante far notare che l'andamento della rilassività con il pH è perfettamente reversibile per tutti i complessi studiati.

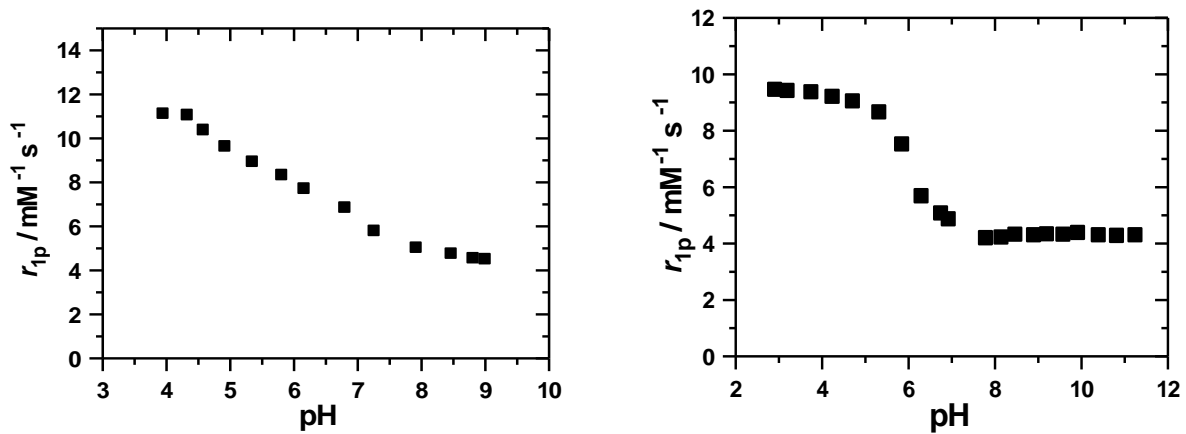


Fig. 57: A sinistra il grafico i valori di relassività a pH variabile di GdL7; a destra quello di GdL9.

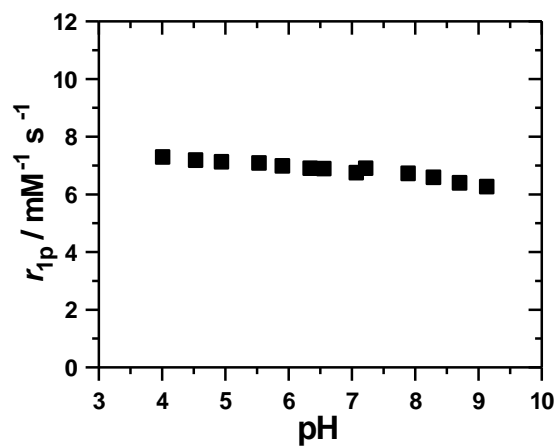


Fig. 58: Dipendenza della relassività in funzione del pH di GdL8

In letteratura possiamo trovare molti esempi anche recenti di sonde MRI pH-sensibili.<sup>173-176</sup>

Nella tabella sottostante si può vedere la differenza di relassività ( $\Delta r_1$ ), il range di pH in cui avviene il cambio di relassività e il parametro che lo causa.



Complex	$\Delta r_1/\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20 MHz 25 °C)	pH sensitivity	Responsive parameter
GdDO3AM	5.3	6–8	$q$
GdDO3A-SA	5.5	5.5–8.5	$q$
Gd(NP-DO3A)	2.9	5–9	$q$
GdDOTA-4AMP	2	6.3–9	$\tau_M/r^{SS}$

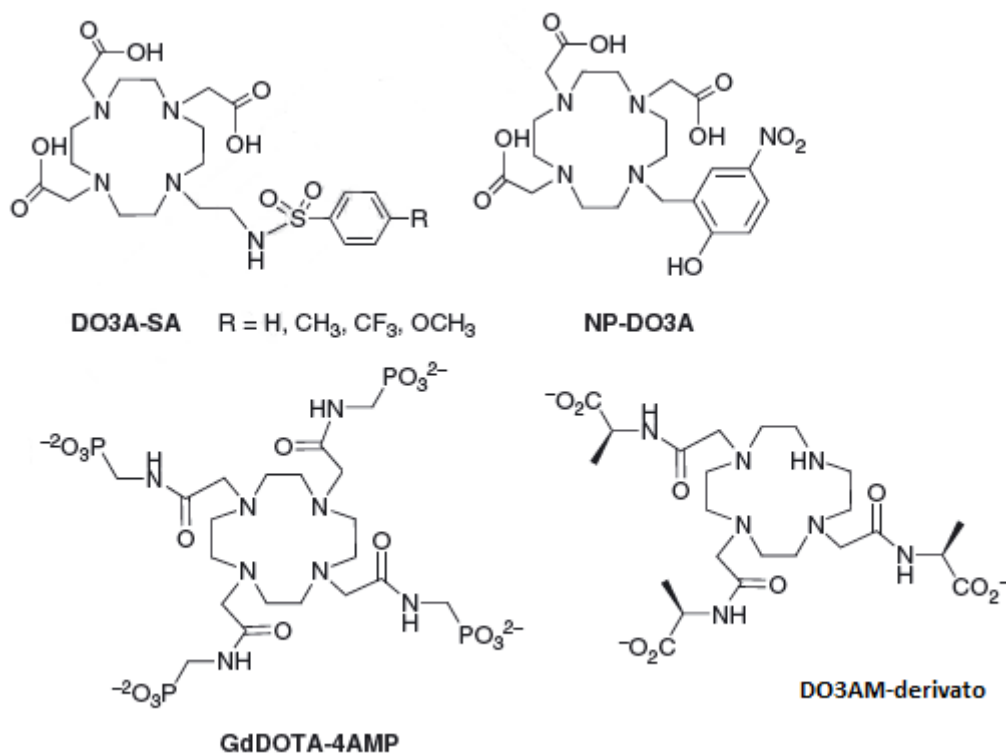


Fig. 59: Esempi di sistemi pH-sensibili

I complessi DO3A-SA, NP-DO3A e DO3AM-derivato devono il loro cambiamento di rilassività alla perdita/acquisizione di una o più molecole d'acqua ( $\Delta q$ ) direttamente legate al centro metallico. È noto che alcuni complessi di Gd(III) aventi un  $q = 2$  possono formare dei composti ternari con ossoanioni (come gli anioni carbonato) che spiazzano gradualmente le molecole d'acqua legate allo ione lantanoideo fino ad arrivare ad avere  $q = 0$ . Questo può succedere ad esempio con gli ioni carbonato che sostituiscono in modo reversibile a pH basici, le molecole d'acqua legate al metallo. A pH basici, abbiamo rilassività più basse,  $q = 0$  e la velocità di rilassamento dipenderà solo dalla seconda sfera di coordinazione; man mano che il pH scende a valori più acidi, la concentrazione dello ione carbonato diminuisce e  $r_{1p}$  aumenta. Questo è quello che succede nel caso del DO3AM-derivato, in cui si ha un salto di rilassività pari a  $5.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ovvero si passa da un  $r_{1p} = 7.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  quando  $q=2$  ad un valore pari a  $1.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  con  $q = 0$  (Figura 59).<sup>173</sup> Il DO3A-SA, invece, possiede una

velocità di rilassamento che varia tra circa  $8.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $q = 2$ ) e circa  $2.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $q = 0$ ): in questo caso è in gioco un equilibrio acido-base per cui, quando la solfonammide a pH acidi è protonata la specie che predomina è quella con due molecole d'acqua coordinate. A pH basici la solfonammide si deprotona e coordina lo ione  $\text{Gd}^{3+}$  spiazzando le molecole di acqua.<sup>174</sup> Andando a cambiare i sostituenti sul fenile della solfonammide si influenza la pKa del sistema e quindi il pH al quale avviene la perdita delle molecole d'acqua della prima sfera di coordinazione. Anche per NP-DO3A si ha una variazione di  $q$  in funzione dell'equilibrio acido-base fenolo/fenolato, ma in questo caso solo una molecola d'acqua viene persa a pH basici con una rilassività che passa da  $7.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>175</sup>

Tuttavia, nel caso dei complessi **GdL7**, **GdL9**, si presume che il cambiamento di rilassività non sia dipendente da un cambio di  $q$ , ma da una variazione sia del numero di molecole di acqua di seconda sfera che della forza della loro interazione con il complesso. Questo è quello che succede nel caso del complesso di Gd(III) con il legante DOTA-4AMP (Figura 59) in cui si ha un andamento con il pH abbastanza complicato ma riconducibile alla formazione di forti legami a idrogeno delle molecole di acqua di seconda sfera congiunto ad un aumento della velocità di scambio dell'acqua catalizzato dai gruppi fosfonici.<sup>176</sup>

I complessi studiati in questo capitolo sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo idrossile. Esso può causare equilibri di protonazione/deprotonazione che possono influenzare la gabbia di coordinazione del complesso e il suo stato di idratazione. I gruppi elettron-attrattori ammidici ed estere adiacenti al gruppo ossidrilico ne influenzano le proprietà acido-base. Questo effetto sarà sicuramente maggiore per **GdL7** e **GdL9** piuttosto che per **GdL8** dove un gruppo  $\text{CH}_2$  allontana il gruppo elettron attrattore dal gruppo  $-\text{OH}$ . In figura 60 è schematizzato un meccanismo che permetta di spiegare la variazione di rilassività con il pH di questi complessi. A pH acido si possono avere alcune molecole di acqua che interagiscono attraverso forti legami a idrogeno a ponte fra il gruppo  $-\text{OH}$  coordinato al centro metallico e i gruppi ammidici (in **GdL9**) e estere (in **GdL7** e **GdL8**). Nel momento in cui, a pH basico, si ha la deprotonazione del gruppo ossidrilico (per **GdL7** e **GdL9**), questo non interagisce più con le molecole di acqua di seconda sfera che comunque possono rimanere debolmente legate al gruppo estere o ammidico.

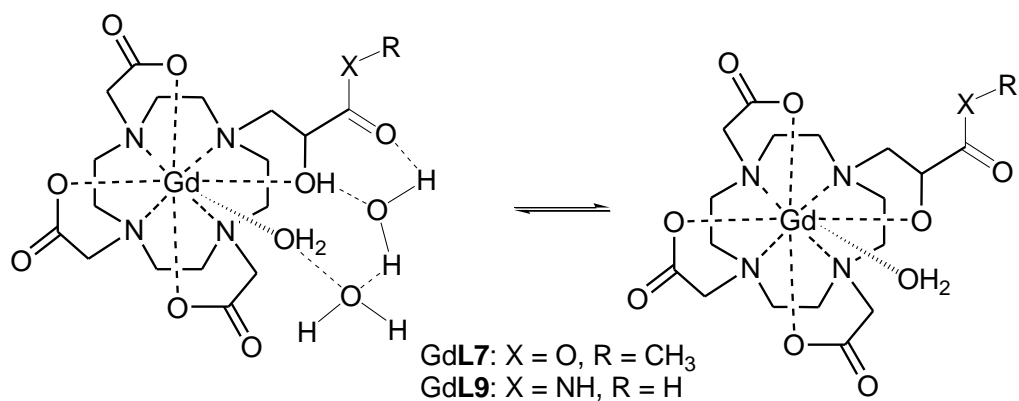


Fig. 60: Contributi delle prime due sfere di coordinazione di GdL7 e GdL9 a pH acido (destra) e pH basico (sinistra)

Come si può vedere dalla figura precedente, si suppone che a pH basico non si abbiano più molecole di acqua di seconda sfera (anche se potrebbero esserci, ma legate debolmente) ed infatti la rilassività è diminuita a valori simili a quelli di un semplice GdHPDO3A. Per il complesso GdL8 ritroviamo un comportamento simile ai due casi precedenti a pH acido, ma dato che la forza elettrone-attraente del gruppo estereo è diminuita dalla distanza, il gruppo -OH non si deprotona a pH < 9 e la rilassività risulta essere intermedia tra quella più elevata dei sistemi precedenti a pH acido e quella più bassa a pH basico (Figura 61).

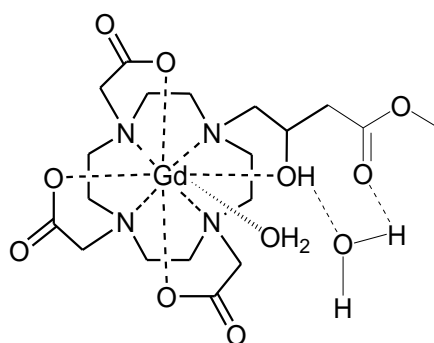


Fig. 61: Contributi delle prime due sfere di coordinazione di GdL8

I campioni di GdL7 e GdL9 sono stati divisi in due aliquote e le misure rilassometriche sono state effettuate una a pH = 4.15 (acido) e una a pH = 8.5 (basico), mentre per GdL8 le misure sono state condotte a pH 7. I dati sperimentali dei complessi di GdL7-L9, sia i profili NMRD che il profilo <sup>17</sup>O NMR, sono stati quindi analizzati simultaneamente in accordo con la teoria SBM per il contributo della sfera interna, col modello di Freed per quella esterna e con la teoria di Swift-Connick per il rilassamento del nucleo <sup>17</sup>O.<sup>163,164</sup> I parametri ottenuti sono riportati in Tabella 8 e paragonati a quelli di GdHPDO3A. Alcuni dei parametri coinvolti nella descrizione della dipendenza di  $r_1$  dal campo magnetico possono essere fissati ai valori standard tipici dei chelati HPDO3A-derivati: il numero di molecole di acqua coordinate è fissato ad uno ( $q = 1$ ) e la distanza tra il centro metallico e la molecola

d'acqua è stata fissata a 3.0 Å per tutti i complessi. Si sono inoltre impostati costanti i parametri  $a = 4.0$  Å (minima distanza di avvicinamento delle molecole di acqua di seconda sfera al  $Gd^{3+}$ ) e  $^{298}D = 2.25 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (coefficiente di diffusione delle molecole di acqua di sfera esterna). Per quanto concerne le molecole di acqua di seconda sfera, si sono stabilite tre molecole d'acqua per il complesso GdL9, due per GdL8 e solo una GdL7. Come si può vedere dalla Tabella 8, a parte il caso di GdL9 a pH basico, per tutti i complessi i parametri associati al rilassamento elettronico,  $\Delta_2$  e  $\tau_V$ , assumono valori piuttosto comparabili a quelli trovati per GdHPDO3A; il che è un ulteriore prova di una struttura di coordinazione molto simile. E' da tenere in considerazione che, anche nel caso dei complessi GdL7-L9, è molto probabile che ci siano più isomeri in soluzione e che la percentuale di tali isomeri cambi in funzione del pH. Uno studio  $^1H$  NMR in alta risoluzione per i complessi paramagnetici di Eu(III) e Yb(III), come è stato fatto per i complessi DOTMA derivati riportati nel capitolo 3, è necessario per analizzare più in dettaglio il comportamento di tali complessi. L'analisi che viene effettuata di seguito prende in considerazione parametri mediati sui possibili isomeri presenti.

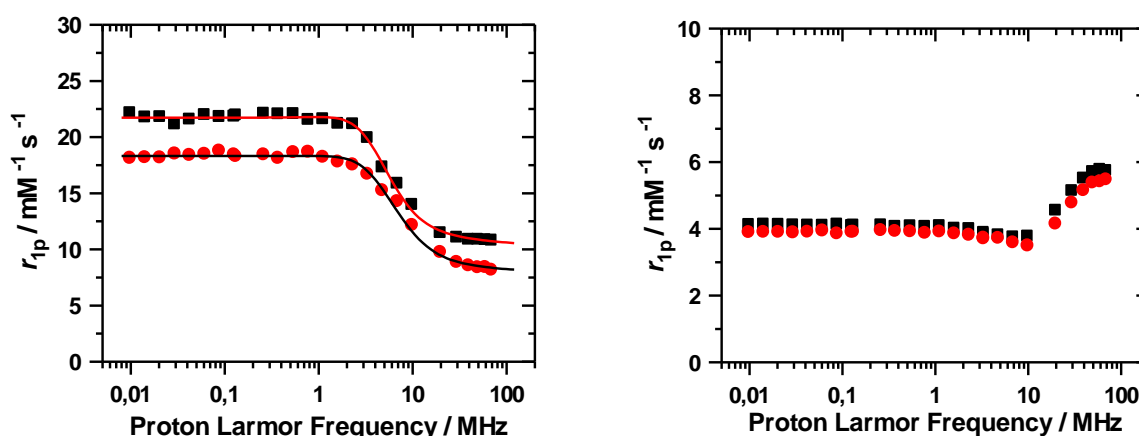


Fig. 62: Sinistra: profili NMRD di GdL7 a pH 4.15 e 310 K (quadrati neri) e 298 K (cerchi rossi).  
 Destra: profili NMRD di GdL7 a pH 8.50 e 310 K (quadrati neri) e 298 K (cerchi rossi).

La mancanza delle misure di  $^{17}O$  NMR per GdL7 fa sì che i parametri correlati con lo scambio dell'acqua non sono stati determinati tramite questa misura e sono quindi da ritenere non del tutto accurati. Il fitting dei profili di GdL7 a pH acido ha comunque permesso di ottenere dei risultati soddisfacenti con valori di  $\tau_M$  di 180 ns per la molecola di acqua di prima sfera e di  $\tau_R$  di 120 ps, un valore superiore a quello di piccoli complessi, a causa della presenza di molecole di acqua di seconda sfera che ruotano insieme al complesso e fanno sì che lo ione paramagnetico risenta di un peso molecolare maggiore. Anche il valore di  $\tau_R^{SF}$  è solo la metà di quello dell'intero complesso dimostrando così che le molecole di acqua di seconda sfera ruotano anch'esse lentamente. I profili a pH basici non sono stati fittati perché i risultati non erano soddisfacenti. La forma dei profili sembra

evidenziare una qualche aggregazione del complesso che causa l'aumento di  $\tau_R$  e la presenza di un largo picco a campi magnetici superiori a 40 MHz. La piccola variazione di rilassività con la temperatura è una dimostrazione che in queste condizioni la molecola di acqua scambia lentamente con l'acqua di bulk.

Parametri	GdL7 (pH=4.15)	GdL8	GdL9 (pH=4.15)	GdL9 (pH=8.50)	GdHPDO3A <sup>a</sup> (TSAP e SAP)
$^{298}r_{1p}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>20 MHz</sup>	11.0	7.01	9.20	4.24	3.7
$^{298}\tau_M$ (ns)	180	150	27	900	8.9 (TSAP) 640 (SAP)
$\Delta^2$ (10 <sup>19</sup> ; s <sup>-2</sup> )	2.74 ± 0.2	7.42 ± 1.3	2.81 ± 0.7	36.5 ± 0.5	1.5 ± 0.2 (TSAP) 9.9 ± 0.5 (SAP)
$^{298}\tau_V$ (ps)	44.2 ± 0.1	22.7 ± 0.3	45.7 ± 0.1	11.6 ± 1	30 ± 1 (TSAP) 8 ± 1 (SAP)
$^{298}\tau_R$ (ps)	120	100	110	100	650
$^{298}\tau_R^{SF}$ (ps)	58.5	20.2	47.7	3	--

Tab. 8: Parametri rilassometrici di GdL7, GdL8, GdL9.  
a: D. Delli Castelli, M. Caligara, M. Botta, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 7130–7138

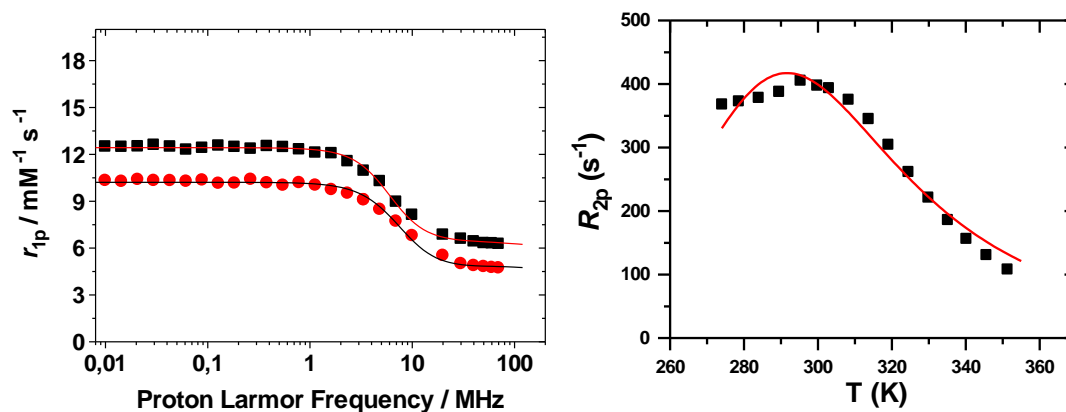


Fig. 63: A sinistra i profili NMRD di GdL8 a 310 K (quadrati neri) e 298 K (cerchi rossi);  
a destra il profilo <sup>17</sup>O NMR misurato a 500 MHz.

GdL8 ha un comportamento interessante perché, anche se la rilassività non varia con il pH, il valore di rilassività a pH 7, 298 K e 20 MHz è comunque elevato (7.0 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) e vicino ai valori di complessi con due molecole di acqua di prima sfera. La forma del profilo <sup>17</sup>O NMR mostra la probabile esistenza di due specie isomeriche e quindi i parametri che si ottengono dai fitting risultano essere una media dei due contributi. Comunque sia, il valore di  $\tau_M$  è solo un po' più corto di quello

di GdL7 e anche il  $\tau_R$  è simile. Infatti, anche per GdL8 abbiamo ipotizzato la presenza di due molecole di acqua di seconda sfera in forte interazione con il complesso, che però, a differenza di GdL7 e GdL9, non vengono spiazzate a pH basici.

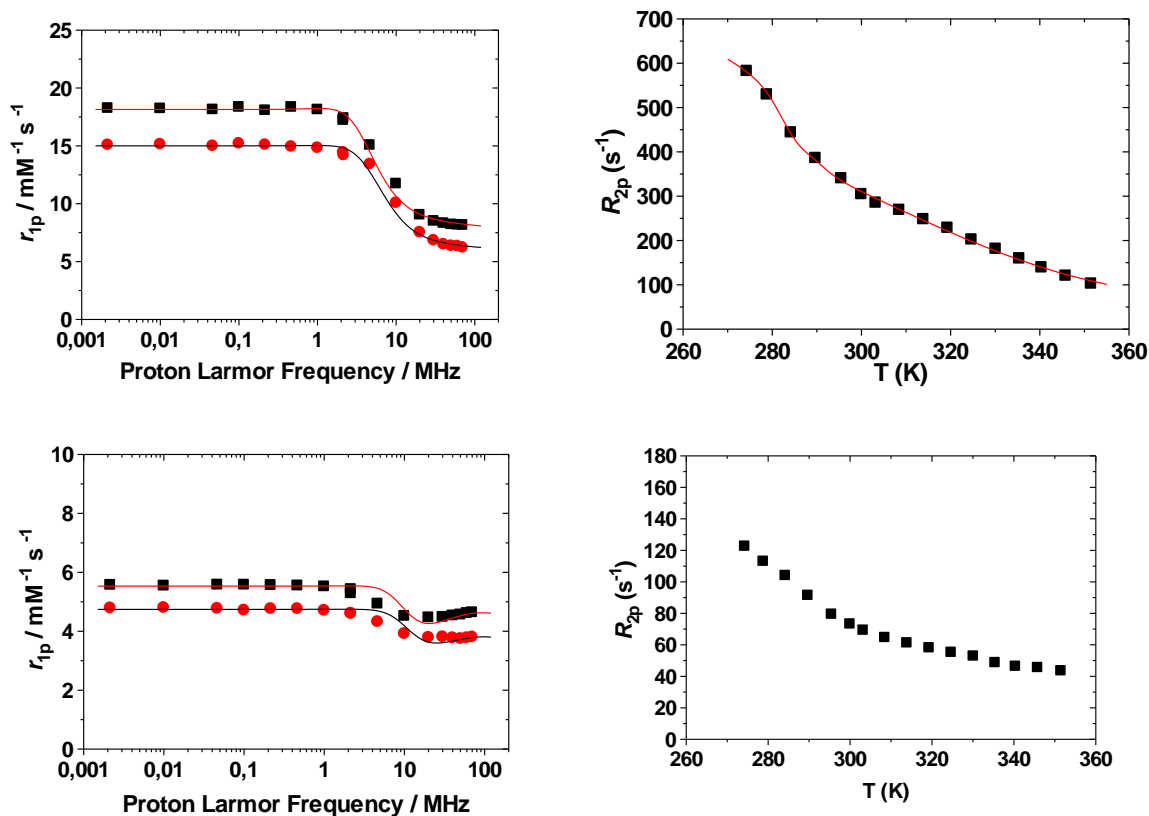


Fig. 64: ALTO: A sinistra i profili NMRD di GdL9 a pH acido a 310 K (quadrati neri) e 298 K (cerchi rossi); a destra il profilo  $^{17}\text{O}$  NMR..  
BASSO: A sinistra i profili NMRD di GdL9 a pH acido a 310 K (quadrati neri) e 298 K (cerchi rossi); a destra il profilo  $^{17}\text{O}$  NMR.

In Figura 64 sono mostrati tutti i profili NMRD e  $^{17}\text{O}$  NMR di GdL9 a pH sia acido che basico. Anch'essi evidenziano la presenza di due specie isomeriche, probabilmente l'isomero SAP e quello TSAP, ma servirebbero ulteriori studi per chiarire questo aspetto e poterne determinare la struttura in soluzione.

Il fitting simultaneo dei dati ha permesso di evincere che a pH acido GdL9 possiede un  $\tau_M$  di 27 ns., Lo scambio veloce dell'acqua coordinata, il più veloce di tutti i complessi analizzati in questo capitolo. fa sì che il valore di rilassività di GdL9, in queste condizioni di pH, sia abbastanza elevato rispetto ad altri complessi di Gd(III)  $q = 1$ . Come abbiamo visto per GdL7 e GdL8, anche nel caso di GdL9 si ha un  $\tau_R$  di circa 100 ps e un  $\tau_R^{\text{SF}}$  che è poco meno della metà del  $\tau_R$  dell'intero complesso, dimostrando la formazione di forti legami a idrogeno delle molecole di acqua di seconda sfera a ponte fra il gruppo ossidrilico e il gruppo ammidico. A pH basici, invece, sia la forma dei profili che i risultati dei fitting dimostrano una struttura del complesso un po' differente. La formazione dello ione alcolato

e la sua coordinazione allo ione metallico probabilmente rallentano notevolmente lo scambio della molecola di acqua coordinata ( $\tau_M = 900$  ns), ma anche i parametri elettronici sono diversi da quelli degli altri complessi visti finora. In questo caso, le molecole di acqua di seconda sfera vengono mantenute nel fitting, ma il  $\tau_R^{SF}$  di soli 3 ps dimostra che esse ruotano molto rapidamente e quindi interagiscono solo debolmente con il complesso. Questi parametri rilassometrici sono quindi responsabili del basso valore di rilassività di GdL9 a pH > 8.

## 4.4 Conclusioni:

E' importante rimarcare che i risultati riportati in questo capitolo sono ancora preliminari e che ulteriori studi sono necessari per delucidare in modo dettagliato il comportamento in soluzione di questi complessi. Inoltre, per determinare le specie presenti in soluzioni, è necessario effettuare studi  $^1\text{H}$  NMR in alta risoluzione per i complessi paramagnetici di Eu(III) e Yb(III). Tuttavia, ci sono alcuni aspetti particolarmente importanti in questo capitolo che è bene evidenziare:

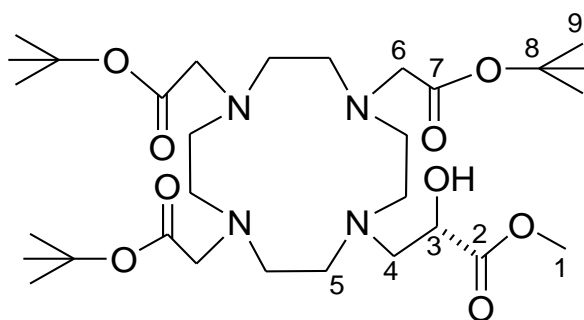
- 1) I complessi GdL7 e GdL9 possiedono una velocità di rilassamento che decresce passando da valori di pH acidi a basici, mostrando il tipico comportamento che manifestano i complessi quando subiscono un cambiamento di idratazione a seguito di un equilibrio acido/base. I risultati riportati però evidenziano che non c'è un cambiamento di  $q$ , ma che la rilassività diminuisce a causa di una variazione sia del numero delle molecole d'acqua di seconda sfera che della forza della loro interazione con il complesso.
- 2) Il complesso GdL7 a pH = 4.15 possiede la velocità di rilassamento più elevata di tutti gli HPDO3A-derivati studiati ( $r_{1p} = 11.0$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Saranno necessari ulteriori studi per poter ottenere un quadro più chiaro di quello che succede al complesso a pH basici, in quanto il suo comportamento differisce da quello degli altri complessi studiati in questo capitolo.
- 3) Il complesso GdL8 possiede un valore di rilassività abbastanza elevato per un complesso  $q = 1$  ( $r_{1p} = 7.0$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Dato che l'ossidrile risulta essere situato più lontano dal gruppo elettron attrattore rispetto ai complessi GdL7 e GdL9, il valore della velocità di rilassamento non è dipendente dal pH. Le due molecole d'acqua di seconda sfera interagiscono fortemente con il complesso in tutto l'intervallo di pH investigato (pH 4-9).
- 4) Gli studi dei profili NMRD e  $^{17}\text{O}$  NMR di GdL9 a pH sia acido che basico evidenziano la presenza di due specie, probabilmente l'isomero SAP e quello TSAP, ma servirebbero ulteriori studi per chiarire questo aspetto e poterne determinare la struttura in soluzione. I valori dei

parametri ottenuti dal fitting del complesso a pH acido e basico risultano essere molto diversi tra loro, compresi quelli relativi allo spin elettronico. Questo presuppone che oltre ad un cambio della sfera di idratazione, il complesso subisce anche una trasformazione della gabbia di coordinazione del metallo. Comunque sia, a pH acidi il fitting simultaneo dei dati ha evidenziato un valore di scambio dell'acqua molto elevato ( $\tau_M = 27$  ns) e molecole di acqua di seconda sfera fortemente legate al complesso che fanno sì che questo complesso risulti particolarmente interessante per studi futuri.

## 4.5 Parte Sperimentale:

### 4.5.1 MHP-DO3A:

- **MHP-DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (16):**



1 eq di DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (0.504 g, PM = 514.7 g/mol), 20 eq di Metil 2(R)-glicidato (g = 2.00, PM = 102.09 g/mol) e 2 equivalenti di Et<sub>3</sub>N (g=0.198, PM = 101.19 g/mol) sono stati sciolti in CHCl<sub>3</sub> nell'apposito vial di vetro che è stato posto nel MicroOnde (130 °C, 70 W, 0.5 ore). Una volta completata la reazione, la soluzione di color bruno è seccata al rotavapor.

Il grezzo è purificato tramite una colonna cromatografica impaccata con silica gel, utilizzando come eluente, una miscela di DCM:MeOH (95:5). Le frazioni pulite contenenti il prodotto sono state seccate *in vacuo* e il solido di color bianco è stato caratterizzato per via NMR.

Resa: 151 mg; P.M.= 616.8 g/mol; resa %= 25%

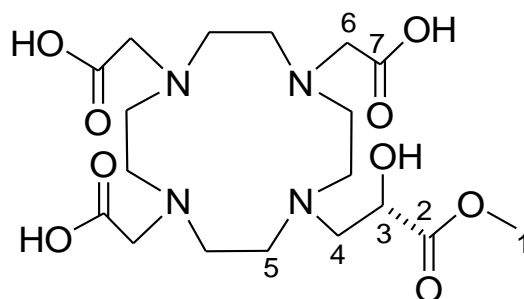


ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 617.7; trovata 617.9

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.46 (H<sub>9</sub>, m, 9H); 2,79-3.02 (H<sub>5</sub> ring, m, 16H); 3,38-3.42 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 3,65 (H<sub>1</sub>, s, 3H); 3.79 (H<sub>6</sub>, s, 6H); 383-3.85 (H<sub>4</sub>, m, 2H).

<sup>13</sup>CNMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 28.06 (C<sub>9</sub>); 48.41 (C<sub>4</sub>); 52.63-53.05 (C<sub>5</sub> ring); 53.20 (C<sub>3</sub>); 55.59 (C<sub>6</sub>); 55.73 (C<sub>6</sub>); 56.14 (C<sub>1</sub>); 82.41 (C<sub>8</sub>); 172.49 (C<sub>7</sub>); 174.94 (C<sub>2</sub>)

- **MHP-DO3A (L7):**



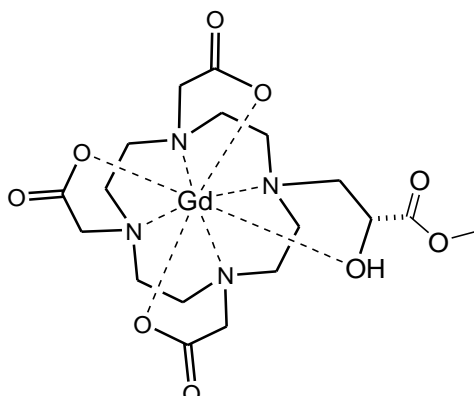
1 equivalente di composto **16** (0.200 g, PM = 616.75 g/mol) sono sciolti in una miscela di DCM:TFA (1:1 3 mL:3 mL). La soluzione è lasciata reagire una notte a temperatura ambiente. Successivamente è stata seccata al rotavapor e il solido bianco è sciolto in Et<sub>2</sub>O. Il surnatante è separato dal precipitato e quest'ultimo è stato seccato per poi essere caratterizzato per via NMR.

Resa: 142 mg; P.M.= 448.4 g/mol; resa % = 99%

<sup>1</sup>H NMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 1.46 (H<sub>9</sub>, m, 9H); 2,79-3.02 (H<sub>5</sub> ring, m, 16H); 3,38-3.42 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 3,65 (H<sub>1</sub>, s, 3H); 3.79 (H<sub>6</sub>, s, 6H); 3.83-3.85 (H<sub>4</sub>, m, 2H).

<sup>13</sup>CNMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 45.45 (C<sub>4</sub>); 51.09 (C<sub>6</sub>); 52.65-53.75 (C<sub>5</sub> ring); 52.98 (C<sub>1</sub>); 54.24 (C<sub>3</sub>); 55.73 (C<sub>6</sub>); 173.15 (C<sub>7</sub>); 176.88 (C<sub>2</sub>).

- **Gd-MHP-DO3A (Gd-L7):**



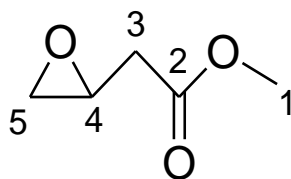
Ad 1 equivalente del legante **L7** (17 mg, PM=448.4 g/mol) sono stati aggiunti 1 eq. GdCl<sub>3</sub> (P.M.=371g/mol; 14.1 mg) sciolti in 3ml di acqua deionizzata.

La reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per circa 4 ore. Successivamente la soluzione è stata portata a pH di 9 e lasciata a reagire per 3 ore a temperatura ambiente.

Infine si è filtrato il tutto per eliminare il solido bianco (Gd(OH)<sub>3</sub>) e il surnatante è stato liofilizzato.

#### 4.5.2 MHB-DO3A:

- **2-ossiranilAcetato di Etile (17):**



Ad una soluzione contenente 1 eq. di 3-Butanoato di Metile (0.1 g, PM = 100.12) in 5 mL di CHCl<sub>3</sub> sono stati aggiunti goccia a goccia e sotto flusso di azoto, 2 eq. di acido 3-CloroPerBenzoico (0.345 g, PM = 172.57 g/mol). La reazione è lasciata in agitazione per 48 ore a temperatura ambiente

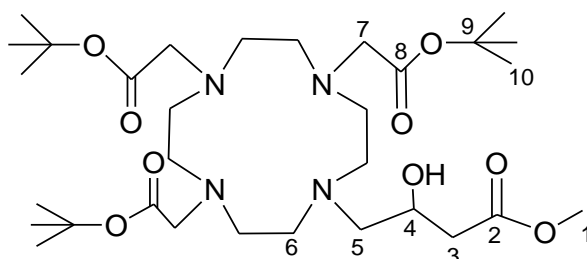
Come già anticipato nel paragrafo **4.1** a causa dell'estrema volatilità del prodotto, per poterlo caratterizzare attraverso l'analisi NMR, è stato necessario utilizzare un solvente deuterato, andando ad eliminare selettivamente i segnali del peracido.

Si presume che tale scelta non influisca sulla resa del prodotto, in quanto non è stato possibile determinarla. Per lo step successivo si considera una resa teorica del 100 %.

$^1\text{H NMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 2.66 ( $\text{H}_3$ , m, 2H); 2.94 ( $\text{H}_5$ , m, 2H); 3.38 ( $\text{H}_4$ , m, 1H); 3.81 ( $\text{H}_1$ , m, 3H).

$^{13}\text{CNMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 37.81 ( $\text{C}_3$ ); 46.83 ( $\text{C}_5$ ); 48.11 ( $\text{C}_4$ ); 52.04 ( $\text{C}_1$ ); 166.56 ( $\text{C}_2$ ).

- **MHB-DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (18):**



Ad una soluzione contenente 1 eq di  $\text{DO3A(OtBu)}_3$  (0.386 g,  $\text{PM} = 514.7$  g/mol) e 3 eq di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.311 g,  $\text{PM} = 138.21$  g/mol) sciolti in 20 mL di  $\text{CHCl}_3$  si è aggiunto il composto **17** sciolto ancora nel suo solvente (resa teorica reazione precedente 100%). Il tutto è stato inserito in un vial e per la reazione si è sfruttato l'utilizzo delle microonde (130 °C, 70 W, 0.5 ore). Il grezzo così ottenuto è stato purificato per via cromatografica con una miscela di eluenti composta da  $\text{DCM}:\text{MeOH}$  (95:5). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state unite e seccate. Il composto **18** è stato infine caratterizzato con la tecnica NMR.

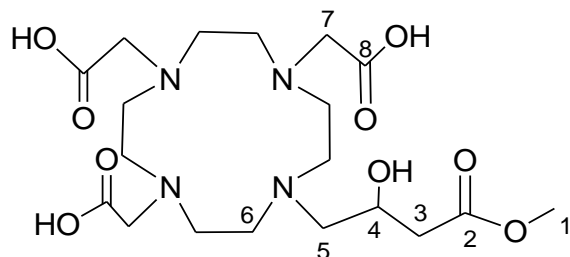
Resa: 99 mg; P.M.= 630.8 g/mol; resa % = 21%

ESI- $\text{MS}^+$ : teorica per  $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 631.7; trovata 632.0

$^1\text{H NMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 1.46 ( $\text{H}_{10}$ , s, 27H); 2.72-2.93 ( $\text{H}_6$  ring, m, 16H); 3.00-3.03 ( $\text{H}_4$ , m, 1H); 3.11 ( $\text{H}_1$ , s, 3H); 3.32 ( $\text{H}_7$ , s, 6H); 3.62-3.64 ( $\text{H}_5$ , m, 2H); 3.75-3.77 ( $\text{H}_3$ , m, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 28.24 ( $\text{C}_{10}$ ); 44.65 ( $\text{C}_3$ ); 48.92 ( $\text{C}_5$ ); 51.97-53.55 ( $\text{C}_6$  ring); 54.69 ( $\text{C}_4$ ); 57.62 ( $\text{C}_7$ ); 58.10 ( $\text{C}_1$ ); 80.94 ( $\text{C}_9$ ); 170.27 ( $\text{C}_8$ ); 170.82 ( $\text{C}_2$ ).

- **MHB-DO3A (L8):**



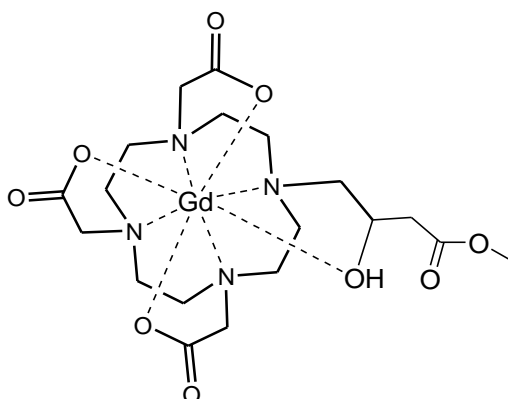
1 eq di composto **17** (0.05 g, PM = 630.8 g/mol) sono messi a reagire con una miscela di DCM:TFA (1:1 3mL:3mL) a temperature ambiente per una notte. La soluzione è stata poi seccata al rotavapor e il grezzo è stato sciolto con Et<sub>2</sub>O; il precipitato è stato tenuto, seccato e caratterizzato per via spettroscopica.

Resa: 34 mg; P.M.= 462.5 g/mol; resa %= 93%

<sup>1</sup>H NMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 2,99-3.21 (H<sub>6</sub> ring, m, 16H); 3,35-3.51 (H<sub>4</sub>, m, 1H); 3,56 (H<sub>1</sub>, s, 3H); 3.67 (H<sub>7</sub>, s, 6H); 3.78-3.94 (H<sub>5</sub>, m, 2H), 3.89-4.09 (H<sub>3</sub>, m, 2H).

<sup>13</sup>CNMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 45.45 (C<sub>3</sub>); 47.14 (C<sub>5</sub>); 49.97 (C<sub>4</sub>); 51.09 (C<sub>7</sub>); 52.65-53.75 (C<sub>6</sub> ring); 54.69 (C<sub>4</sub>); 52.98 (C<sub>1</sub>); 175.42 (C<sub>8</sub>); 178.63 (C<sub>2</sub>).

- **Gd-MHB-DO3A (Gd-L8):**



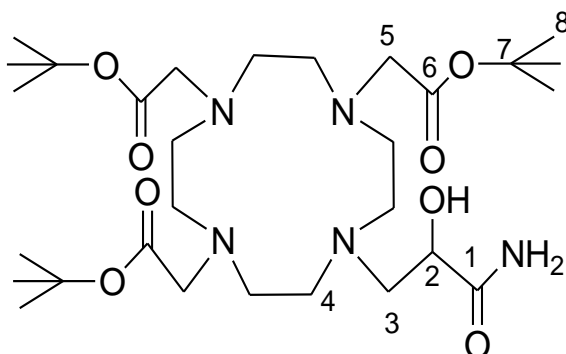
Ad 1 equivalente del legante **L8** (9 mg, PM = 462.5 g/mol) sono stati aggiunti 1 eq. GdCl<sub>3</sub> (P.M.= 371 g/mol; 7,2 mg) sciolti in 5ml di H<sub>2</sub>O.

La reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Successivamente la soluzione è stata portata a pH di circa 9 e lasciata a reagire per alcune ore a temperatura ambiente.

Infine si è filtrata la soluzione per eliminare il solido bianco (Gd(OH)<sub>3</sub>) e il surnatante è stato liofilizzato e caratterizzato.

#### 4.5.3 HPMA-DO3A:

- **HPMA-DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (19):**



1 eq di DO3A(OtBu)<sub>3</sub> (0.100 g, PM = 514.7 g/mol), 20 eq di Glicidammide (g = 0.020, PM = 87.08 g/mol) e 2 equivalenti di Et<sub>3</sub>N (g = 0.198, PM = 101.19 g/mol) sono stati sciolti in 10 mL di toluene

nel vial di vetro che è stato successivamente posto nel MicroOnde (130 °C, 70 W, 0.5 ore). Una volta completata la reazione, la soluzione è seccata al rotavapor.

Il grezzo è purificato tramite una colonna cromatografica impaccata con silica gel, utilizzando come eluente DCM:MeOH (95:5). Le frazioni pulite contenenti il prodotto sono state seccate *in vacuo* e il solido di color bianco è stato caratterizzato per via NMR.

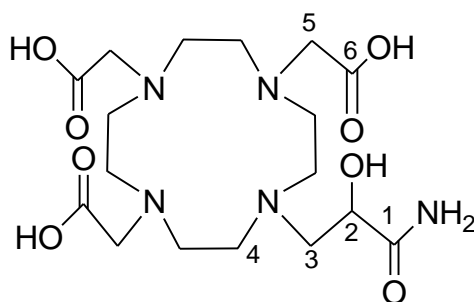
Resa: 60 mg; P.M.= 601.76 g/mol; resa %= 51%

ESI-MS<sup>+</sup>: teorica per C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 602.8; trovata 603.0

<sup>1</sup>H NMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.27 (H<sub>9</sub>, m, 9H); 2,34-2.45 (H<sub>4</sub> ring, m, 16H); 3,15-3.23 (H<sub>3</sub>, m, 2H); 3.55 (H<sub>5</sub>, s, 6H); 3.62-3.66 (H<sub>2</sub>, m, 1H).

<sup>13</sup>CNMR, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 23.75 (C<sub>8</sub>); 48.41 (C<sub>3</sub>); 49.13-50.27 (C<sub>5</sub> ring); 55.12 (C<sub>2</sub>); 55.39 (C<sub>6</sub>); 83.83 (C<sub>7</sub>); 174.37 (C<sub>6</sub>); 179.78 (C<sub>1</sub>)

- **HPMA-DO3A (L9):**

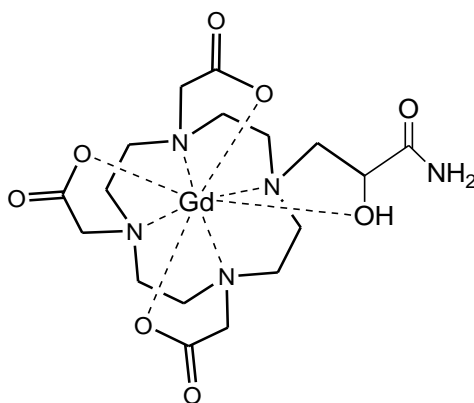


1 eq di composto **19** (0.06 g, PM = 601.76 g/mol) sono messi a reagire con una miscela di DCM:TFA (1:1 3mL:3mL) a temperature ambiente per una notte. La soluzione è stata poi seccata al rotavapor e il grezzo è stato sciolto con Et<sub>2</sub>O. Si è centrifugato il tutto ed il precipitato è stato tenuto, seccato e caratterizzato per via spettroscopica.

<sup>1</sup>H NMR, D<sub>2</sub>O δ (ppm): 2.74-2.99 (H<sub>4</sub> ring, m, 16H); 3,35-3.51 (H<sub>2</sub>, m, 1H); 3.58 (H<sub>5</sub>, s, 6H); 3.78-3.81 (H<sub>3</sub>, m, 2H), 4.01-4.10 (H<sub>2</sub>, m, 1H).

$^{13}\text{C}$ NMR,  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta$  (ppm): 47.69-49.13 ( $\text{C}_4$  ring); 54.78 ( $\text{C}_2$ ); 55.02 ( $\text{C}_5$ ); 54.69 ( $\text{C}_3$ ); 176.11 ( $\text{C}_6$ ); 179.63 ( $\text{C}_2$ ).

- **Gd-HPMA-DO3A (Gd-L9):**



Ad 1 equivalente del legante **L8** (19 mg, PM = 433.6 g/mol) sono stati aggiunti 1 eq.  $\text{GdCl}_3$  (P.M.= 371 g/mol; 16 mg) sciolti in 7mL di  $\text{H}_2\text{O}$ .

La reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Successivamente la soluzione è stata portata a pH di circa 9 e lasciata a reagire per 2 ore a temperatura ambiente. Durante questo periodo si può notare la formazione di un precipitato.

Infine si è filtrata la soluzione per eliminare il solido bianco ( $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ) e il surnatante è stato liofilizzato e caratterizzato.

# **Capitolo 5:**

# **Bibliografia**



1. Damadian, R. *Science* 1971, **171**, 1151-1153
2. Kumar, A.; Welti, D.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson. Ser A* 1975, **18**, 69-83
3. Mansfield, P. *J. Phys. C* 1977, **10**, L55-L58
4. Wiener, S. N.; Flynn, M. J.; Edelstein, J. *Radiology*, 1980, **136**, 181-185
5. Chapman, B.; Turner, R.; Ordidge, R. J.; Doyle, M.; Cawley, M.; Coxon, R.; Glover, P. Mansfield, P. *Magn. Reson. Med.* 1987, **5**, 246-254
6. Dumoulin, C. L.; Souza, S. P.; Hart, H. R. *Magn. Reson. Med.* 1987, **5**, 238-245
7. Bandettini, P. A.; Wong, E. C.; Hinks, R. S.; Tikofsky, R. S.; Hyde, J. S. *Magn. Reson. Med.* 1992, **25**, 390-397
8. Kwong, K. K.; Belliveau, J. W.; Chesler, D. A.; Goldberg, I. E.; Weisskoff, R. M.; Poncelet, B. P.; Kennedy, D. N.; Hoppel, B. E.; Cohen, M. S.; Turner, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**, 5675-5679
9. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 474-485.
10. Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 572-573
11. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679-712
12. Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559-565
13. Eisinger, J.; Shulman, R. G.; Blumberg, W. E. *Nature* **1961**, *192*, 963-964.
14. Andrew, E. R.; Bottomley, P. A.; Hinshaw, W. S.; Holland, G. N.; Moore, W. S.; Simaraj, C. *Phys. Med. Biol.* **1977**, *22(5)*, 971-974
15. Damadian, R.; Goldsmith, M.; Minkoff, L. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **1977**, *9(1)*, 97-100,108
16. Hinshaw, W. S.; Bottomley, P. A.; Holland, G. N. *Nature* **1977**, *270(5639)*, 722-723
17. Lauterbur, P. C.; Dias, M. H. M.; Rudin, A. M. *Front. Biol. Energ.* **1978**, *1*, 752-759
18. Brady, T. J.; Goldman, M. R.; Pykett, I. L.; Buonanno, F. S.; Kistler, J. P.; Newhouse, J. H.; Burt, C. T.; Hinshaw, W. S.; Pohost, G. M. *Radiology* **1982**, *144(2)*, 343-347
19. Goldman, M. R.; Brady, T. J.; Pykett, I. L.; Burt, C. T.; Buonanno, F. S.; Kistler, J. P.; Newhouse, J. H.; Hinshaw, W. S.; Pohost, G. M. *Circulation* **1982**, *66(5)*, 1012-1016.
20. Young, I. R., Clarke, G. J., Gales, D. R., et al. *Comput. Tomogr.*, 1981, **5**, 534
21. Carr, D. H., Brown, J., Bydder, G. M., et al. *Lancet* 1984, **1**, 484
22. Lin, S.-P.; Brown Jeffrey, J. *J. Magn. Reson. Imaging* **2007**, *25(5)*, 884-899.
23. Koenig, S. H.; Brown, R. D., III *Magn. Reson. Med.* **1984**, *1(4)*, 478-495.
24. Dawson, P. *Eur. J. Radiol.* **1996**, *23(3)*, 201-204.
25. R. Weissleder and M. Papisov, *Rev. Magn. Reson. Med.*, 1992, **4**, 1
26. Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 572-573
27. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679-712
28. Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559-565
29. V. Jacques and J. F. Desreux, *Top. Curr. Chem.*, 2002, **221**, 123
30. Aime S.; Calabi L.; Cavallotti C. ; Gianolio E. Giovenzana GB.; et al; *Inorg. Chem.* 2004, **43**, 24
31. S. Aime, A. S. Batsanov, M. Botta, J. A. K. Howard, D. Parker, K. Senanayake and G. Williams, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 4696
32. M. Botta, *Eur. J., Inorg. Chem.*, 2000, 399
33. L. Tei, M. Botta, C. Lovazzano, A. Barge, L. Milone, S. Aime, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, **46**, 86-93

34. D. H. Powell, O. M. Ni Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 9333.
35. L.Helm, A. E.Merbach, *Chem. Rev.* 2005, **105**, 1923.
36. Horrocks, W. D., Jr.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, **101**, 334-40
37. Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams, J. A. G.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 1999, **2**, 493-504.
38. Geraldes, C. F. G. C.; Urbano, A. M.; Hoefnagel, M. A.; Peters, J. A. *Inorg. Chem.* 1993, **32**, 2426-32.
39. Alpoim, M. C.; Urbano, A. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Peters, J. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1992, 463-7
40. Geraldes, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Cacheris, W. P.; Kuan, K. T.; Brown, R. D., III.; Koenig, S. H.; Spiller, M. *Magn. Reson.Med.* 1988, **8**, 191-9.
41. Chang, C. A.; Brittain, H. G.; Telser, J.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* 1990, **29**, 4468-73
42. Anelli, P. L.; Balzani, V.; Prodi, L.; Uggeri, F. *Gazz. Chim. Ital.* 1991, **121**, 359-64
43. Bryden, C. C.; Reilley, C. N. *Anal. Chem.* 1982, **54**, 610-15.
44. Albin, M.; Horrocks, W. D., Jr.; Liotta, F. J. *Chem. Phys. Lett.* 1982, **85**, 61-4
45. Bovens, E.; Hoefnagel, M. A.; Boers, E.; Lammers, H.; van Bekkum, H.; Peters, J. A. *Inorg. Chem.* 1996, **35**, 7679-7683
46. Frey, S. T.; Chang, C. A.; Carvalho, J. F.; Varadarajan, A.; Schultze, L. M.; Pounds, K. L.; Horrocks, W. D., Jr. *Inorg. Chem.* 1994, **33**, 2882-9.
47. Bryden, C. C.; Reilley, C. N.; Desreux, J. F. *Anal. Chem.* 1981, **53**, 1418-25
48. Horrocks, W. D., Jr.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, **101**, 334-40.
49. Zhang, X.; Chang, C. A.; Brittain, H. G.; Garrison, J. M.; Telser, J.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* 1992, **31**, 5597-600.
50. Kim, W. D.; Kiefer, G. E.; Huskens, J.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* 1997, **36**, 4128-4134
51. Alpoim, M. C.; Urbano, A. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Peters, J. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1992, 463-797.
52. Shannon, R. D. *Acta Crystallogr., Sect.* 1976, **32**, 751-67
53. Caravan, P.; Amedio, J. C., Jr.; Dunham, S. U.; Greenfield, M. T.; Cloutier, N. J.; McDermid, S. A.; Spiller, M.; Zech, S. G.; Looby, R. J.; Raitsimring, A. M.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem.--Eur. J.* **2005**, *11*(20), 5866-5874.
54. Parker, D. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*(3), 156-165
55. Woods, M.; Kiefer, G. E.; Bott, S.; Castillo-Muzquiz, A.; Eshelbrenner, C.; Michaudet, L.; McMillan, K.; Mudigunda, S. D. K.; Ogrin, D.; Tircso, G.; Zhang, S.; Zhao, P.; Sherry, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(30), 9248-9256.
56. Martell, A. E. In *Essays in Coordination Chemistry*; Schneider, W., Anderegg, G., Gut, R., Eds.; Berkhäuser Verlag: Basel, 1964
57. Adamson, A. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 1578
58. Hancock, R. D.; Marsicano, F. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* 1976, 1096
59. Harris, W. R. *J. Coord. Chem.* 1983, **13**, 16
60. Hancock, R. D.; McDougall, G. J. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* 1977, **67**
61. D.F. Shriver; P.W Atkins; C.H. Langford, *Chimica inorganica*, Zanichelli, 1993, 222
62. Bloch, F., Hansen, W. W., Packard, M., *Phys. Rev.* 1948, **70**, 474

63. Hancock, R. D. *Pure Ap I. Chem.* 1986, **58**, 1445
64. Hancock, R. D.; McDougall, G. J. J. *Am. Chem. SOC*, 1980, **102**, 6551
65. Martin, L. Y.; De Hayes, L. J.; Zompa, L. F.; Busch, D. H. J. *Am. Chem. SOC*, 1974, **96**, 4041
66. Wainright, K. P.; Ramasubbu, A. J. *Chem. SOC., Chem. Commun.* 1982, 277
67. Hancock, R. D.; Evers, A.; Ngwenya, M. P.; Wade, P. W. J. *Chem. Soc Chem. Commun.* 1987, 1129
68. Hancock, R. D.; Dobson, S. M.; Evers, A.; Wade, P. W.; Ngwenya, M. P.; Boeyens, J. C. A.; Wainright, K. P. *J. Am. Chem. SOC.* 1988, **110**, 2788
69. Micheloni, M.; Sabatini, A.; Paoletti, P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1978, **2**, 828
70. Kaden, T. A. *Top. Curr. Chem.* 1984, **121**, 157
71. Stetter, H.; Frank, W. *Angew. Chem., Znt. Ed. Engl.* 1976, **15**, 686
72. Delgado, R.; Frausto de Silva, J. R. *Talanta* 1982, **29**, 815
73. Desreux, J. F.; Loncin, M. M. *Znorg. Chem.* 1986, **25**, 69
74. Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D. *Znorg. Chem.* 1987, **26**, 958
75. Spirlet, M. R.; Rebizant, J.; Loncin, M. F.; Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* 1984, **23**, 4278
76. Christiansen, L.; Henrickson, D. N.; Toftlund, H.; Wilson, S. E.; Xie, C. L. *Inorg. Chem.* 1986, **25**, 2813
77. Kimura, E.; Koiek, T.; Toriumi, K. *Inorg. Chem.* 1988, **27**, 2687
78. Mise, I.; Mikurya, M.; Sonada, H.; Kida, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1984, 692
79. Evers, A.; Hancock, R. D.; Murase, I. *Znorp. Chem.* 1986, **25**, 2160
80. Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C. *Nuclear and Electron Relaxation*; VCH: Weinheim, 1991
81. Graif, M.; Steiner, R. E. *Br. J. Radiol.* **1986**, 59(705), 865-873
82. Johnston, D. L.; Liu, P.; Lauffer, R. B.; Newell, J. B.; Wedeen, V. J.; Rosen, B. R.; Brady, T. J.; Okada, R. D. *J. Nucl. Med.* **1987**, 28(5), 871-877
83. Konings, M. S.; Dow, W. C.; Love, D. B.; Raymond, K. N.; Quay, S. C.; Rocklage, S. M. *Inorg. Chem.* **1990**, 29(8), 1488-1491
84. McNamara, M. T.; Higgins, C. B.; Ehman, R. L.; Revel, D.; Sievers, R.; Brasch, R. C. *Radiology* **1984**, 153(1), 157-163
85. Runge, V. M.; Schoerner, W.; Niendorf, H. P.; Laniado, M.; Koehler, D.; Claussen, C.; Felix, R.; James, A. E., Jr. *Magn. Reson. Imaging* **1985**, 3(1), 27-35
86. Wenzel, T. J.; Ashley, M. E.; Sievers, R. E. *Anal. Chem.* **1982**, 54(4), 615-621
87. Bousquet, J. C.; Saini, S.; Stark, D. D.; Hahn, P. F.; Nigam, M.; Wittenberg, J.; Ferrucci, J. T. *Radiology* 1988, 166(3), 693-698
88. Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* 1987, 26(6), 958-960
89. Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* 1980, 19(5), 1319-1324
90. Loncin, M. F.; Desreux, J. F.; Merciny, E. *Inorg. Chem.* 1986, 25(15), 2646-2648
91. Paulroth, C.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* 1995, 34(6), 1408-1412
92. Powell, D. H.; NiDhubhghaill, O. M.; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schlaepfer, W.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118(39), 9333-9346
93. Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R.; Cacheris, W. *Inorg. Chem.* **1993**, 32(5), 582-586
94. Bianchi, A.; Calabi, L.; Giorgi, C.; Losi, P.; Mariani, P.; Paoli, P.; Rossi, P.; Valtancoli, B.; Virtuani, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, (5), 697-705
95. Fossheim, S. L.; Fahlvik, A. K.; Klaveness, J.; Muller, R. N. *Magn. Reson. Imaging* **1999**, 17(1), 83-89

96. Kang, S. I.; Ranganathan, R. S.; Emswiler, J. E.; Kumar, K.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*(13), 2912-2918
97. Caravan, P. et al.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352
98. Benetollo, F.; Bombieri, G.; Calabi, L.; Aime, S.; Botta, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 148-157
99. Aime, S.; Botta, M.; Ermondi, G. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4291-4299.
100. Woods, M.; Aime, S.; Botta, M.; Howard, J. A.; Moloney, J. M.; Navet, M.; Parker, D.; Port, M.; Rousseaux, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9781-9792.
101. Jacques, V.; Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4048-4053
102. D. Delli Castelli, M. C. Caligara, M. Botta, E. Terreno, and S. Aime. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 7130-7138
103. Jacques, V.; Desreux, J. F. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*(Contrast Agents I), 123-164
104. Kobayashi, H.; Sato, N.; Hiraga, A.; Saga, T.; Nakamoto, Y.; Ueda, H.; Konishi, J.; Togashi, K.; Brechbiel, M. *W. Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*(3), 454-460.
105. Runge, V. M. *J. Magn. Reson. Imaging* **2000**, *12*(2), 205-213
106. Venkatachalam, M. A.; Rennke, H. G. *Circ. Res.* **1978**, *43*(3), 337-347
107. R. Weissleder and M. Papisov, *Rev. Magn. Reson. Med.*, **1992**, *4*, 1
108. Tilcock, C. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *37*(1-3), 33-51
109. Thomsen HS. *Radiol Clin North Am.*, 2009, *47*(5), 827-31
110. Cowper SE, *Rheumatology*, 2003, *15* (6), 785-790
111. Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, LeBoit PE, *Lancet*, **2000**, *356* 1000-1
112. Mendoza FA, Artlett CM, Sandorfi N, Latinis K, Piera-Velazquez S, Jimenez SA, *Semin. Arthritis Rheum.* **2006**, *35* (4), 238-49
113. Grobner T., *Dial. Transplant.*, **2006**, *21* (4), 1104-8
114. Marckmann P, Skov L, Rossen K, et al, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2006**, *17*, (9) 2359-62,
115. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Morb. Mortal. Wkly.*, **2007**, *56*-7, 137-41
116. Alexander, V. *Chem. Rev.* **1995**, *95*(2), 273-342
117. Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, *87*(5), 901-927
118. Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E. in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, **2003**; *9*, 841-881.
119. Atkins, T. J.; Richman, J. E.; Oettle, W. F. *Org. Synth.* **1978**, *58*, 86-98
120. Cox, J. P. L.; Craig, A. S.; Helps, I. M.; Jankowski, K. J.; Parker, D.; Eaton, M. A. W.; Millican, A. T.; Millar, K.; Beeley, N. R. A.; Boyce, B. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1990**, (9), 2567-2576.
121. Moi, M. K.; Meares, C. F.; Denardo, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*(18), 6266-6267
122. Renn, O.; Meares, C. F. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*(6), 563-569.
123. Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*(7), 2268-2270
124. Weisman, G. R.; Reed, D. P. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(15), 5186-5187
125. R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1721-2085.
126. E. U. Akkaya, M. E. Huston, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3590-3593.
127. I. Meunier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Cocolios, R. Guillard, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 685-695
128. F. Bellouard, F. Chuburu, N. Kervarec, L. Toupet, S. Triki, Y. Le Mest, H. Handel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 3499-3505;
129. M. Botta and L. Tei, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1945-1960.
130. L. Tei, G. Gugliotta, Z. Baranyai and M. Botta, *Dalton Trans.*, **2009**, 9712-9714

131. Z. Jaszberenyi, A. Sour, E. Toth, M. Benmelouka and A. E. Merbach, *Dalton Trans.*, **2005**, 2713-2719.
132. A. D. Sherry, R. D. Brown, C. F. G. Geraldès, S. H. Koenig, K. T. Kuan and M. Spiller, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 620-622.
133. F. A. Rojas-Quijano, G. Tircso, E. T. Benyo, Z. Baranyai, H. T. Hoang, F. K. Kalman, P. K. Gulaka, V. D. Kodibagkar, S. Aime, Z. Kovacs and A. D. Sherry, *Chem. - Eur. J.*, **2012**, 18, 9669-9676.
134. V. Lorusso, L. Pascolo, C. Ferneti, M. Visigalli, P. Anelli, and C. Tiribelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 100-105
135. D. A. Moore, *Org. Synth.*, **2008**, 85, 10
136. J. F. Desreux, E. Merciny and M. F. Loncin, *Inorg. Chem.*, **1981**, 20, 987-991.
137. A. Takacs, R. Napolitano, M. Purgel, A. C. Benyei, L. Zekany, E. Brucher, I. Toth, Z. Baranyai and S. Aime, *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 2858-2872.
138. A. Bianchi, L. Calabi, C. Giorgi, P. Losi, P. Mariani, P. Paoli, P. Rossi, B. Valtancoli and M. Virtuani, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 697-705.
139. H. Sigel, B. Prijs and R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, **1981**, 56, 45-49
140. E. Toth, E. Brucher, I. Lazar and I. Toth, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 4070-4076.
141. S. L. Wu and W. D. Horrocks, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 3724-3732.
142. J. Moreau, E. Guillon, J. C. Pierrard, J. Rimbault, M. Port and M. Aplincourt, *Chem. - Eur. J.*, **2004**, 10, 5218-5232.
143. E. Brücher, G. Laurency and Z. S. Makra, *Inorg Chim Acta*, 1987, **139**, 141-142.
144. X. Wang, T. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, E. Merciny and J. F. Desreux, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 1095-1099.
145. K. Kumar and M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 4193-4199.
146. L. Burai, I. Fabian, R. Kiraly, E. Szilagyí and E. Brucher, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 243-248.
147. E. Szilagyí, É. Tóth, Z. Kovács, J. Platzek, B. Radüchel and E. Brücher, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 298, 226-234.
148. Z. Baranyai, G. A. Rolla, R. Negri, A. Forgacs, G. B. Giovenzana and L. Tei, *Chem. - Eur. J.*, **2014**, 20, 2933-2944.
149. E. Toth, R. Kiraly, J. Platzek, B. Raduchel and E. Brucher, *Inorg. Chim. Acta*, **1996**, 249, 191-199.
150. E. Toth, E. Brucher, I. Lazar and I. Toth, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4070-4076
151. Z. Baranyai, Z. Palinkas, F. Uggeri, A. Maiocchi, S. Aime and E. Brucher, *Chem. - Eur. J.*, **2012**, 18, 16426-16435
152. P. Wedeking, K. Kumar and M. F. Tweedle, *Magn. Reson. Imaging*, **1992**, 10, 641-648
153. A. Takacs, R. Napolitano, M. Purgel, A. C. Benyei, L. Zekany, E. Brucher, I. Toth, Z. Baranyai and S. Aime, *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 2858-2872.
154. Z. Baranyai, Z. Palinkas, F. Uggeri, A. Maiocchi, S. Aime and E. Brucher, *Chem. - Eur. J.*, **2012**, 18, 16426-16435.
155. P. L. Anelli, L. Lattuada, V. Lorusso, G. Lux, A. Morisetti, P. Morosini, M. Serleti and F. Uggeri, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3629-3641.
156. P. Verwilt, S. V. Eliseeva, S. Carron, L. V. Elst, C. Burtea, G. Dehaen, S. Laurent, K. Binnemans, R. N. Muller, T. N. Parac-Vogt and W. M. De Borggraeve, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 3577-3585.
157. P. L. Anelli, L. Lattuada, V. Lorusso, G. Lux, A. Morisetti, P. Morosini, M. Serleti and F. Uggeri, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3629-3641
158. P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2293-2352.

159. D. A. Fulton, E. M. Elemento, S. Aime, L. Chaabane, M. Botta and D. Parker, *Chem. Commun.*, **2006**, 1064–1066
160. E. C. Wiener, M. Abadjian, R. Sengar, L. Vander Elst, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 6554–6568
161. S. Aime, M. Botta, et al, *Inorg. Chem.* **50** (2011) 7955.
162. Ren, J.; Zhang, S.; Sherry, A. D.; Geraldes, C. F. G. C. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 273.
163. Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Merbach, A. E.; Powell, H.; Pubanz, D.; Aime, S.; Botta, M. J. *Alloy. Compd.* **1995**, *225*, 303.
164. Aime, S.; Botta, M.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Terreno, E. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 5200
165. Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307–312;
166. Powel, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333
167. D. Delli Castelli, M. C. Caligara, M. Botta, E. Terreno, S. Aime, *Inorg. Chem.* 2013, **52**, 7130–7138
168. Aime, S.; Delli Castelli, D.; Terreno, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5513–5515.
169. Aime, S.; Delli Castelli, D.; Lawson, D.; Terreno, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2430–2431
170. A. Barge, E. Cappelletti, G. Cravotto *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3810–3816
171. Stevens, Calvin L., and James Tazuma. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*(3) 715-717
172. Findley, Thomas W., Daniel Swern, and John T. Scanlan. *J. A. Chemical Society* **1945**, *67*, 412-414
173. Bruce, J.I., Dickins, R.S., Govenlock, L.J. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9674.
174. Lowe, M., Parker, D., Reany, O. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 7601.
175. Woods, M., Kiefer, G.E., Bott, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9248.
176. Zhang, S., Wu, K.C., and Sherry, A.D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 3192.