



Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE
CICLO XXVI

TESI DI DOTTORATO

*SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI NUOVI COMPLESSI DI Cu^{2+} e Ga^{3+} CON
LEGANTI DITIOCARBAMMICI PER L'IMAGING DIAGNOSTICO E LA TERAPIA
ANTITUMORALE*

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Antonino Polimeno
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Alessandro Dolmella
Supervisore : Ch.mo Prof. Alessandro Dolmella
Co-supervisore: Dr.ssa Cristina Bolzati

Dottorando: Nicolò Morellato

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

SOMMARIO	7
ABSTRACT	9
INTRODUZIONE	11
Radiazioni, radioattività, decadimento	11
La Medicina Nucleare	14
La Tomografia ad emissione di Positroni (PET)	17
Radionuclidi e Radiofarmaci	21
Agenti teranostici in medicina	25
Complessi metallici in medicina	30
I ditiocarbammati	33
SCOPO	41
Obiettivo del lavoro	41
Progettazione del lavoro	44
SEZIONE A:	
<i><u>Sintesi e valutazione biologica di complessi di rame con leganti ditiocarbammici</u></i>	
A1. Il rame in medicina nucleare	55
A1.1 Isotopi radioattivi del rame	55
A1.2 Produzione di ^{64}Cu	57
A1.3 Sistemi chelanti per ^{64}Cu	58
A1.4 [$^{64}\text{Cu}(\text{ATSM})$] per l' <i>imaging</i> di tessuti tumorali ipossici	66

A2. Il rame nella terapia antitumorale	69
A2.1 Biochimica del rame	69
A2.2 Complessi di rame come agenti antitumorali	72
A2.3 Meccanismo d'azione	80
A2.4 Studi <i>in vivo</i>	84
A3. Parte Sperimentale	87
A3.1 Materiali e strumentazioni	87
A3.2 Sintesi dei leganti ditiocarbammici. Procedure generali	88
A3.2.1 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L2	88
A3.2.2 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L3	89
A3.2.3 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L4	89
A3.2.4 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L9	90
A3.2.5 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L10	90
A3.2.6 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L13	91
A3.2.7 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L16	91
A3.2.8 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L17	92
A3.2.9 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L19	92
A3.2.10 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L20	93
A3.2.11 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L22	93
A3.2.12 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L23	94
A3.2.13 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L24	94
A3.2.14 Sintesi e caratterizzazione di DTC-L25	95
A3.2.15 Sintesi e caratterizzazione di PIPE-1	95
A3.2.16 Sintesi e caratterizzazione di DPDC	96
A3.3 Sintesi di complessi del tipo $[\text{}^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ con leganti ditiocarbammici ciclici. Procedura generale	97
A3.3.1 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$	98
A3.3.2 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L2})_2]$	98
A3.3.3 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L3})_2]$	99
A3.3.4 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L4})_2]$	99
A3.3.5 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L9})_2]$	100
A3.3.6 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L10})_2]$	100
A3.3.7 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L13})_2]$	101
A3.3.8 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L15})_2]$	101

A3.3.9	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L16) ₂]	102
A3.3.10	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L17) ₂]	102
A3.3.11	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L19) ₂]	103
A3.3.12	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L20) ₂]	103
A3.3.13	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L22) ₂]	104
A3.3.14	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L23) ₂]	104
A3.3.15	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L24) ₂]	105
A3.3.16	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L25) ₂]	105
A3.3.17	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(PIPE-1) ₂]	106
A3.4	Sintesi di complessi del tipo [^{63/65} Cu(DTC-Ln) ₂] con leganti ditiocarbammici lineari. Procedura generale	107
A3.4.1	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DEDC) ₂]	107
A3.4.2	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DPDC) ₂]	108
A3.4.3	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(NOMe) ₂]	108
A3.4.4	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(ISOMe) ₂]	109
A3.4.5	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(POMe) ₂]	110
A3.4.6	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(POEt) ₂]	110
A3.4.7	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DPODC) ₂]	111
A3.4.8	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DBODC) ₂]	111
A3.4.9	Sintesi e caratterizzazione di [Cu(PR-13) ₂]	112
A3.5	Testi di vitalità cellulare	113
A3.5.1	Linee cellulari e condizioni di crescita	113
A3.5.2	MTT test	113
A3.6	Sintesi dei complessi del tipo [⁶⁴ Cu(DTC-Ln) ₂] con il tracciante radioattivo ⁶⁴ Cu	115
A3.7	Efficienza di marcatura	116
A3.8	Purificazione dei complessi [⁶⁴ Cu(DEDC) ₂] e [⁶⁴ Cu(PDTC) ₂]	116
A3.9	Studi di stabilità <i>in vitro</i>	117
A3.10	Esperimenti di <i>uptake</i> in cellule tumorali MCF-7	119
A3.11	Esperimenti di <i>uptake</i> temperatura dipendente in cellule tumorali MCF-7	120
A3.12	Esperimenti di competizione in cellule tumorali MCF-7	121
A3.12.1	Inibizione di hCTR1	121
A3.12.2	Inibizione di DMT1	121
A3.13	Esperimento di <i>uptake</i> a concentrazioni crescenti in cellule tumorali MCF-7	122
A3.14	Esperimenti di efflusso in cellule tumorali MCF-7	123
A3.15	Esperimenti di <i>uptake</i> in cellule non tumorali HEK	124

A3.16	Esperimenti di <i>uptake</i> e lisi cellulare in cellule tumorali MCF-7	125
A3.17	Accumulo di rame in cellule tumorali MCF-7	126
A4.	Risultati e discussione	127
A4.1	Sintesi e caratterizzazione dei leganti ditiocarbammici	127
A4.2	Sintesi e caratterizzazione dei complessi del tipo [^{63/65} Cu(DTC-Ln) ₂]	133
A4.3	Test di vitalità cellulare	139
A4.4	Sintesi e caratterizzazione dei complessi radiomarcanti [⁶⁴ Cu(DTC-Ln) ₂]	146
A4.5	Effetto del pH ed efficienza di marcatura	150
A4.6	Studi di stabilità <i>in vitro</i>	152
A4.7	Esperimenti di <i>uptake</i> in cellule tumorali MCF-7	157
A4.8	Esperimenti di <i>uptake</i> temperatura dipendente in cellule tumorali MCF-7	160
A4.9	Esperimenti di competizione rame in cellule tumorali MCF-7	161
A4.10	Esperimento di <i>uptake</i> a concentrazioni crescenti in cellule tumorali MCF-7	163
A4.11	Esperimenti di efflusso in cellule tumorali MCF-7	164
A4.12	Esperimenti di <i>uptake</i> in cellule non tumorali HEK	165
A4.13	Esperimenti di <i>uptake</i> e lisi cellulare in cellule tumorali MCF-7	167
A4.14	Accumulo di rame in cellule tumorali MCF-7	169
A5.	Conclusioni e Prospettive	171

SEZIONE B:

Sintesi e valutazione biologica di complessi di gallio con leganti ditiocarbammici

B1.	La chimica del gallio	177
B1.1	Chimica del gallio(III)	177
B1.2	Chimica di coordinazione del gallio	180
B1.3	Isotopi del gallio in medicina nucleare	181
B1.4	Complessi di gallio in medicina nucleare	184
B1.5	Il gallio nella terapia antitumorale	189
B2.	Parte sperimentale	193
B2.1	Materiali e strumentazione	193

B2.2	Sintesi dei leganti ditiocarbammici. Procedure generali	195
B2.2.1	Sintesi e caratterizzazione di NH ₂ Et	195
B2.2.2	Sintesi e caratterizzazione di DTC-L8	196
B2.2.3	Sintesi e caratterizzazione di CyP	196
B2.2.4	Sintesi e caratterizzazione di CyH	197
B2.3	Sintesi di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln) ₃] con leganti ditiocarbammici ciclici.	198
B2.3.1	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PDTC) ₃]	198
B2.3.2	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L2) ₃]	199
B2.3.3	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L4) ₃]	199
B2.3.4	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L9) ₃]	200
B2.3.5	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L10) ₃]	201
B2.3.6	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L15) ₃]	201
B2.3.7	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L16) ₃]	202
B2.3.8	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L17) ₃]	203
B2.3.9	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L20) ₃]	203
B2.3.10	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L22) ₃]	204
B2.3.11	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L23) ₃]	204
B2.3.12	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L25) ₃]	205
B2.3.13	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PIPE-1) ₃]	206
B2.4	Sintesi di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln) ₃] con leganti ditiocarbammici lineari.	207
B2.4.1	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DED ₃ C) ₃]	208
B2.4.2	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DMDC) ₃]	208
B2.4.3	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DPDC) ₃]	209
B2.4.4	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DPODC) ₃]	210
B2.4.5	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DBODC) ₃]	210
B2.4.6	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PrEt) ₃]	211
B2.4.7	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(POEt) ₃]	212
B2.4.8	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(ISOMe) ₃]	212
B2.4.9	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PR-13) ₃]	213
B2.5	Sintesi di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln) ₃] con leganti ditiocarbammici derivati da ammina primaria.	214
B2.5.1	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(NH ₂ Et) ₃]	214
B2.5.2	Sintesi e caratterizzazione di [Ga(CyP) ₃]	215

B2.5.3 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(CyH) ₃]	215
B2.5.4 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L8) ₃]	216
B2.5.5 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PIPE-2) ₃]	216
B2.6 Test di vitalita' cellulare	217
B2.7.1 Linee cellulari e condizioni di crescita	217
B2.7.2 MTT Test	217
B2.7 Effetto del pH sulla formazione di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln) ₃]	218
 B3. Risultati e Discussione	 221
B3.1 Sintesi e caratterizzazione dei complessi della serie [Ga(DTC-Ln) ₃]	221
B3.2 Valutazione dell'attività biologica di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln) ₃] nei confronti di cellule tumorali 2008 e LoVo.	240
B3.3 Effetto del pH sulla sintesi dei complessi [Ga(DTC-Ln) ₃]	243
 B4. Conclusioni e Prospettive	 245
 BIBLIOGRAFIA	 247

SOMMARIO

Il rame è un metallo essenziale per il nostro organismo appartenente al gruppo 11 della tavola periodica. Grazie alle sue caratteristiche chimiche e fisiche è un valido candidato nell'ambito della diagnostica per immagini come isotopo radioattivo e nella terapia antitumorale come complesso metallico.

Il ^{64}Cu è un isotopo radioattivo β^+ emittente ottimo per essere utilizzato nella diagnostica per immagini di tipo PET. Questa tecnica permette infatti l'ottenimento di immagini del corpo umano allo scopo di identificare e quantificare *in vivo* processi biologici e biochimici.

Diversi composti di rame sono stati sintetizzati e studiati ma solo un complesso con un legante tiosemicarbazone è entrato in fase avanzata di sperimentazione clinica e nessun prodotto a base di ^{64}Cu è ancora stato immesso in commercio.

Il rame risulta essere un metallo molto studiato anche in ambito terapeutico, dal momento che la sua concentrazione è particolarmente elevata nei tessuti tumorali ed è coinvolto nel processo di angiogenesi associato alla crescita tumorale. Queste osservazioni, unite al successo ottenuto dal cisplatino come agente antitumorale e al conseguente interesse nato attorno alla possibilità di sviluppare nuovi composti metallici come agenti terapeutici, hanno portato alla progettazione e alla sintesi di complessi di rame in grado di agire selettivamente a livello del tumore, senza effetti tossici a livello sistemico e attivi anche nei confronti di linee cellulari resistenti al cisplatino.

Con l'obiettivo di progettare dei nuovi sistemi chelanti in grado di essere utilizzati da un lato a scopo diagnostico in medicina nucleare con l'utilizzo del isotopo radioattivo ^{64}Cu e dall'altro a scopo terapeutico come potenziali antitumorali, è stata sviluppata una libreria di complessi neutri a geometria quadrato planare di Cu^{2+} con leganti bidentati del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ dove DTC = ditiocarbammato.

I ditiocarbammati sono dei leganti, ampiamente studiati all'interno del nostro gruppo di ricerca, in grado di legare il metallo attraverso due atomi di zolfo, con la possibilità di essere derivatizzati con molecole biologicamente attive per ottenere dei potenziali sistemi *target* specifici. Recentemente, inoltre, alcuni ditiocarbammati hanno dimostrato di formare spontaneamente complessi stabili di $\text{Cu}(\text{II})^{(10)}$, in grado di inibire l'attività chimotripsinica del proteasoma inducendo apoptosi in differenti tipi di cellule tumorali.

L'utilizzo di una serie molto ampia di leganti ditiocarbammici strutturalmente diversi ha, quindi, l'obiettivo di valutare possibili relazioni tra la struttura chimica e l'attività citotossica.

I complessi sono stati preparati attraverso l'applicazione di diverse vie sintetiche che utilizzano come materiale di partenza $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. I complessi ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi elementare, tecniche spettroscopiche (IR e UV-Vis) e spettrometria di massa ESI(+).

Di tutti i composti ottenuti è stata testata la citotossicità *in vitro* nei confronti di linee cellulari tumorali resistenti e non al cisplatino, composto a base metallica di riferimento.

Successivamente la chimica di coordinazione è stata trasferita a livello di tracciante con il radionuclide ^{64}Cu ed è stato valutato se questo sistema di marcatura può essere applicato in ambito radiofarmaceutico. In particolare, sono state ottimizzate le procedure sintetiche ed è stata testata l'efficienza di marcatura e il profilo di stabilità *in vitro* del sistema.

Infine sono stati effettuati una serie di esperimenti di *uptake* in cellule di tumore alla mammella MCF-7 sia con i composti non radioattivi che con gli analoghi radiomarcanti allo scopo di approfondire i meccanismi di accumulo cellulare attraverso i quali questa classe di composti esplica la sua attività citotossica.

Anche il gallio ha caratteristiche chimiche e fisiche che lo rendono un metallo molto interessante sia a livello diagnostico che terapeutico. Infatti, il ^{68}Ga è un isotopo radioattivo β^+ emittente che può essere facilmente prodotto mediante generatore portatile e consente di ottenere immagini PET di ottima qualità, paragonabili a quelle ottenute con il ^{18}F isotopo attualmente di elezione nella diagnostica, riscuotendo un interesse sempre più elevato.

Diversi complessi di gallio sono stati sintetizzati e studiati, alcuni sono risultati molto efficaci potendo così entrare in fase avanzata di sperimentazione clinica. Ma nonostante i promettenti risultati nessun composto è ancora stato immesso in commercio.

Il gallio risulta essere un metallo molto impiegato anche in terapia, grazie alle sue proprietà antineoplastiche e da diversi decenni semplici sali di gallio sono utilizzati come antitumorali.

Gli ottimi risultati ottenuti hanno portato alla progettazione di complessi *metal based* in grado di agire selettivamente a livello del tumore, senza effetti tossici a livello sistemico e attivi anche nei confronti di linee cellulari resistenti al cisplatino.

Con l'obiettivo di progettare dei nuovi sistemi chelanti per una applicazione radiofarmaceutica con l'isotopo ^{68}Ga da un lato e lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali dall'altro, è stata sviluppata una libreria di complessi neutri di Ga^{3+} con leganti bidentati del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ con leganti ditiocarbammici, selezionati per le loro caratteristiche già elencate in precedenza.

I complessi sono stati preparati attraverso l'applicazione di diverse vie sintetiche che utilizzano come materiale di partenza $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. I composti ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi elementare, tecniche spettroscopiche (IR, NMR) e diffrattometria ai raggi X.

Di alcuni complessi è stata testata la citotossicità *in vitro* nei confronti di due diverse linee cellulari tumorali ed, infine è stata testata la resa di formazione dei complessi in funzione del pH al fine di eseguire delle valutazioni preliminari prima di trasferire la chimica di coordinazione a livello di tracciante con l'isotopo radioattivo ^{68}Ga che viene eluito da generatore per mezzo di soluzione acida.

ABSTRACT

Copper is an essential metal for our organism and it belongs to the group 11 in the periodic table. Thanks to its chemical and physical features it is an effective candidate within diagnostic imaging and antitumor therapy as radioactive isotope and metal complex, respectively.

^{64}Cu is a β^+ emitter radioactive isotope, ideal to be used in PET (Positron Emission Tomography) imaging. This technology allows to obtain body images in order to identify and quantify biological and biochemical *in vivo* processes.

Several copper compounds were synthesized and studied but only one complex with a thiosemicarbazone ligand entered in clinical trial and no copper-64 compound is still put in the market.

Copper is a much studied metal even as therapeutic agent, since its concentration is very high in tumor tissues and it is involved in the angiogenetic process associated to cellular growth.

These remarks, with the cisplatin success as anticancer agent and the relative interest created around the chance to develop new therapeutic agents, led to design and synthesize copper complexes able to act selectively into the tumor tissue, even against cisplatin resistant cells and without systemic toxic effects.

With the aim to design new chelating systems able to be used as diagnostic agents in nuclear medicine with the radioactive isotope ^{64}Cu and as potential anticancer agents, a neutral square-planar $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ complexes library was developed where DTC = dithiocarbamate.

Dithiocarbamates are ligands, just widely studied inside our research group, able to coordinate the metal center by means of two sulfur atoms. They have the chance to be conjugated with bioactive molecules in order to obtain potential specific target systems.

Moreover, recently some dithiocarbamates showed to form spontaneously stable Cu(II) complexes, able to inhibit the proteasoma chymotrypsinic-like activity inducing apoptosis in several cancer cells.

Therefore use of a very wide range of structurally different dithiocarbamate ligands has the aim to evaluate possible relationship between the chemical structure and the cytotoxic activity.

The complexes were prepared with the application of several synthetic procedures using $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ as starting material. The complexes were completely characterized via elemental analysis, spectroscopic techniques (IR and UV-Vis) and ESI(+) mass spectrometry.

In vitro citotoxicity against several human cancer cells, resistant and not to cisplatin, was tested for all copper complexes.

Then, coordination chemistry was transferred to a radioactive tracer level with the radionuclide copper-64 and it was evaluated if this labeling system could be applied as radiopharmaceutical. In particular, the synthetic procedures were optimized and labeling efficiency and *in vitro* stability were tested. Finally, a series of uptake experiments were performed with human breast cancer cells (MCF-7) both with the cold

complexes and the analogous radioactive complexes in order to learn more about the accumulation patterns whereby this class of compounds shown its citotoxic activity.

Also gallium presents chemical and physical characteristics which make it a very interesting metal both in diagnostics and in therapy. In fact, gallium-68 is a β^+ -emitter isotope which can be easily produced by means of a portable generator and it allows to obtain high quality PET images, comparable with PET images made with fluorine-18, the most used radionuclide in diagnostic imaging, and so gallium-68 gained an increasing interest for nuclear medicine applications.

Several gallium complexes were synthesized and studied and some of these were very effective and they entered in clinical trial. But, despite these promising results, no gallium compound is still put in the market.

Gallium is a very employed metal just in therapy, thanks to its anticancer properties and for many decades ordinary gallium salts are used as antitumor agents. The excellent results obtained led to the design of metal based complexes able to act selectively against cancer cells, without without systemic toxic effects.

With the aim to project new chelating systems for a radiopharmaceutical application with gallium-68 and to develop new anticancer agents a neutral $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ complexes library was prepared with dithiocarbamate ligands, chosen for their interesting properties, just listed above.

The complexes were prepared with the application of several synthetic procedures using $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ as starting material. The compounds were characterized by means of elemental analysis, spectroscopic techniques (IR, NMR) and X-ray diffraction. *In vitro* citotoxicity was tested against two human cancer cell lines for some of these complexes and, finally, it was evaluated the yield of these compounds in pH dependence in order to perform some considerations before transferring coordination chemistry to a radioactive tracer level with gallium-68 which is obtained from the generator by means of an acid solution.

INTRODUZIONE

Radiazioni, radioattività e decadimento

L'atomo è la più piccola parte di un elemento che ne mantiene le caratteristiche e nel contempo è la principale sorgente di radiazioni sia elettromagnetiche che corpuscolari. È costituito da un nucleo e da particelle più leggere, gli elettroni, dotate di carica negativa che gli ruotano attorno in orbitali energeticamente ben definiti. Il nucleo a sua volta è costituito da protoni aventi carica elettrica positiva e neutroni, ovvero particelle elettricamente neutre. Ogni atomo ha lo stesso numero di protoni e di elettroni e risulta elettricamente neutro. Però, gli atomi di uno stesso elemento, pur avendo lo stesso numero di protoni, possono avere diverso numero di neutroni, dando così origine agli isotopi.

La radiazione emessa da parte di isotopi radioattivi è dovuta all'instabilità nucleare che caratterizza alcuni elementi. Il ritorno alla stabilità energetica avviene con emissione di raggi α e/o β , accompagnati alcune volte dall'emissione di raggi γ . Gli elementi che presentano queste proprietà vengono definiti radionuclidi e l'emissione di radiazione dà origine al decadimento radioattivo.

Caratteristica comune a tutti i tipi di radiazione è la cessione di energia alla materia attraversata, cessione che in genere si manifesta con un aumento locale della temperatura, ma non solo, perché le radiazioni sono in grado di impressionare una lastra fotografica, principio base della diagnostica per immagini. Tutti questi effetti sono una diretta conseguenza dei processi fisici di eccitazione e ionizzazione dovute agli urti della radiazione con la materia.

Le radiazioni non ionizzanti non sono in grado di produrre ionizzazione nei materiali ad esse esposti. Si ritiene che le radiazioni non ionizzanti possano avere effetti sugli organismi viventi solo per i loro effetti termici. La pericolosità delle radiazioni non ionizzanti è stata investigata mediante numerosi esperimenti, ma non è ancora stata dimostrata.

Per radiazioni ionizzanti, invece, si intende il passaggio nella materia di particelle dotate di carica (corpuscoli) o fotoni (non corpuscolati) con conseguente ionizzazione della stessa. Il processo di ionizzazione è dovuto alla cessione di energia da parte della radiazione alla materia mentre la attraversa. (Figura 1).

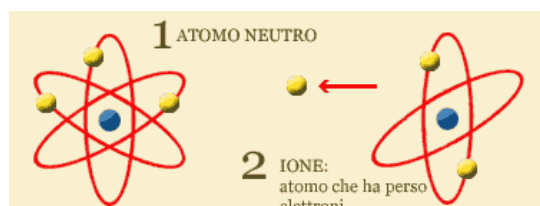


Fig. 1. Il fenomeno della ionizzazione.

Una caratteristica importante delle radiazioni è la loro energia, che si misura in Joule, o in elettronvolt, dove 1 elettronvolt è l'energia che una carica elementare (protone o elettrone) acquisisce quando attraversa un campo elettrico con differenza di potenziale di un Volt (1eV corrisponde a $1,6 \cdot 10^{-9}$ J).

Secondo la legge del decadimento radioattivo, per ogni radioisotopo deve trascorrere un determinato periodo di tempo, chiamato tempo di dimezzamento o di emivita, affinché il numero degli atomi radioattivi si dimezzi. Tale tempo ha un *range* estremamente ampio, tanto da variare da frazioni di secondi a milioni di anni.

A seconda del radionuclide il decadimento può essere α , β , quest'ultimo distinto in β^- e β^+ , e γ (Figura 2). Il numero dei decadimenti che avvengono nell'unità di tempo per una data quantità di materiale, viene definita "attività" del preparato. L'attività viene misurata in Becquerel (Bq):

1 Bq = 1 disintegrazione al secondo

Le radiazioni α e γ emesse nel processo di decadimento radioattivo hanno energia ben definita per ogni radioisotopo; le radiazioni β , invece, hanno uno spettro energetico continuo, che si estende fino ad una energia massima tipica per ciascun radioisotopo. L'energia media di questi elettroni è dell'ordine di un terzo dell'energia massima.

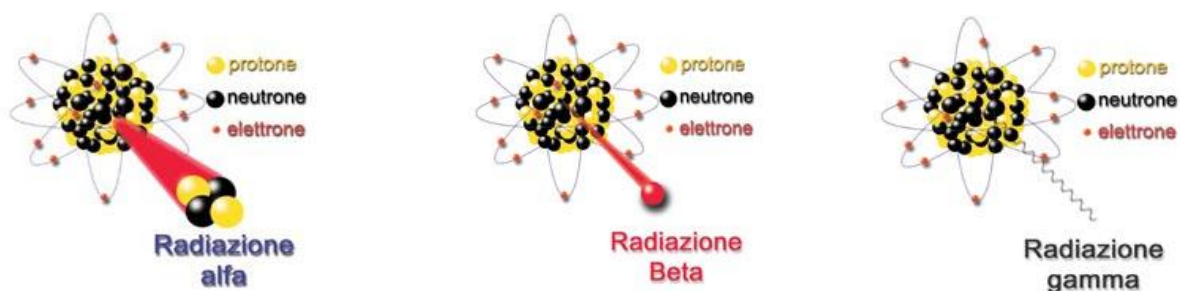


Fig. 2. Radiazioni emesse nei processi di decadimento.

Quindi, i radionuclidi si differenziano tra di loro per il tempo di dimezzamento e per il tipo e l'energia delle particelle emesse; ne consegue quindi una diversa capacità di penetrazione dei vari tipi di radiazioni nei materiali, e questo ne definisce la pericolosità.

Le radiazioni α sono particelle cariche positivamente costituite da due neutroni e due protoni. Durante il decadimento si avrà una riduzione di due unità del numero atomico e di quattro unità del numero di massa. Sono, per loro natura, facilmente fermate da un foglio di carta o dallo strato corneo della pelle (Figura 3). Sono pericolose soltanto se i materiali α -emettitori vengono introdotti nell'organismo.

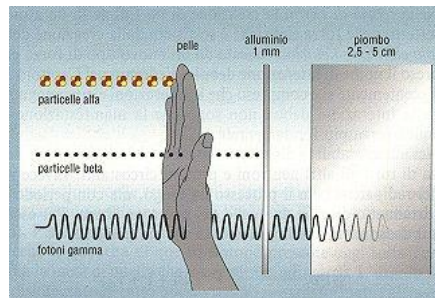


Fig. 3. Capacità di penetrazione delle radiazioni

Le radiazioni β sono, invece, elettroni o positroni e il decadimento si osserva quando il rapporto neutroni/protoni è superiore all'unità o viceversa. Nel caso in cui un neutrone (composto dall'associazione di un protone e di un elettrone) espella un elettrone, la massa atomica resta costante, mentre il numero atomico aumenta di una unità. Al contrario, se si verifica una emissione di un positrone, è un protone ad espellere una particella carica positivamente. Quindi, in questo caso, la massa atomica rimane sempre costante, mentre il numero atomico diminuisce di una unità. Le radiazioni β , per la loro natura, sono in grado di attraversare un semplice foglio di carta, ma possono essere facilmente fermate da un foglio di alluminio di 1mm (Figura 3).

I raggi γ sono radiazioni elettromagnetiche simili alle radiazioni luminose, ma di lunghezza d'onda inferiore. Il decadimento non comporta alcun cambiamento della massa atomica, né del numero atomico, essendo la radiazione puramente energetica.

Soltanto materiali ad alta densità, quali il piombo, sono in grado di fermarle e la pericolosità, specialmente nel caso di irraggiamento esterno, è strettamente connessa con l'elevata capacità di penetrazione che hanno nei vari materiali, compresi i tessuti viventi (Figura 3).

La Medicina Nucleare

La Medicina Nucleare è una branca specialistica della medicina che utilizza radionuclidi, ovvero isotopi di particolari elementi che, in seguito a decadimento, sono in grado di emettere radiazioni α , $\beta^{+/-}$ e γ a scopo diagnostico e/o terapeutico.

Le informazioni fornite dalla diagnostica medico-nucleare si esprimono in dati quantitativi ed in immagini. Le immagini ottenute esprimono la distribuzione spaziale o spazio-temporale del radiofarmaco e la loro caratteristica principale è quella di essere l'espressione morfologica di una funzione vitale.

Di conseguenza, una scintigrafia scheletrica non è, come il radiogramma, la rappresentazione dell'anatomia normale o alterata dell'osso, ma è la mappa della distribuzione dell'attività biologica che attivamente governa l'accumulo del radiofarmaco osteotropo. E' quindi possibile ottenere una radiografia dello scheletro di un cadavere, ma non una scintigrafia scheletrica. Il concetto che il dominio della Medicina Nucleare sia il "funzionale" è presente in tutta la storia della disciplina e trova ancora oggi maggior rilievo grazie ai progressi della radiochimica e della radiofarmacologia.

Al contrario delle immagini radiologiche, che vengono ottenute sfruttando l'attenuazione del fascio di radiazioni X da parte dei tessuti interposti tra l'apparecchiatura che le ha prodotte e il sistema di rivelazione, le immagini medico-nucleari, dette scintigrafie ⁽¹⁾, sono ottenute per mezzo della rivelazione di radiazioni emesse da radiofarmaci distribuiti nell'organismo. La tecnica utilizzata è detta diagnostica per immagini o *imaging*. Questa si basa sull'impiego di particolari cristalli caratterizzati dalla proprietà di emettere fotoni, quando vengono colpiti da radiazioni γ di energia superiore a qualche decina di keV.

Allo scopo si utilizza uno strumento, chiamato *gamma-camera* (Figura 4), costituita da:

- un *collimatore* posto tra la sorgente e il cristallo di rivelazione. Questo ha la funzione di indirizzare le radiazioni verso un unico punto in modo da non compromettere la qualità dell'immagine scintigrafica;
- un *rivelatore a scintillazione*, rappresentato da un cristallo di sodio ioduro (NaI) attivato con tallio (Tl), in grado di convertire la radiazione γ in un fascio di fotoni;
- una serie di *fotomoltiplicatori* e di *preamplificatori* che hanno la funzione di trasformare i fotoni luminosi in un segnale elettrico, che a sua volta viene amplificato e condotto verso i circuiti di elaborazione;
- un *computer* che elabora e ricostruisce l'immagine.

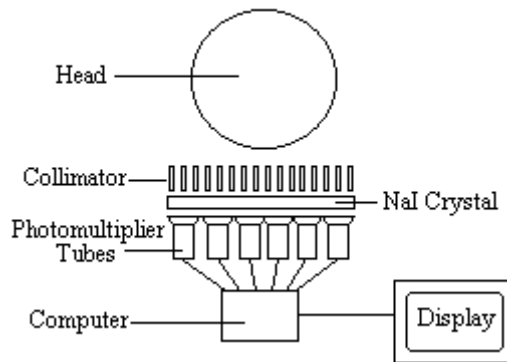


Fig.4. Schematizzazione di una gamma-camera.

Quindi, la radiazione, che proviene dall'organo e che contiene le informazioni relative al suo stato clinico, viene restituita sotto forma di immagini di sezioni consecutive (tomografia planare) o tridimensionali (*SPECT* = Single Photon Emission Computed Tomography), in grado di evidenziare una lesione funzionale prima che si manifesti la lesione anatomica.

Altra tecnica che consente di ottenere immagini di elevata qualità nell'ambito della diagnostica che sfrutta isotopi radioattivi è la tomografia ad emissione di positroni (*PET* = Posytron Emission Tomography) che verrà discussa in dettaglio nel paragrafo successivo.

La Medicina Nucleare è divisa in diversi settori, a seconda del tipo di utilizzo:

- in *diagnostica in vitro*, con determinazione diretta sui campioni biologici di analiti con tecniche di tipo immunometrico;
- in *diagnostica in vivo*, con somministrazione diretta al paziente di radiofarmaci γ o β^+ emittenti;
- in *terapia*, con somministrazione di radiofarmaci per il trattamento di diverse patologie, in particolare oncologiche. I radiofarmaci utilizzati presentano caratteristiche differenti rispetto a quelli usati in diagnostica, in quanto emettono radiazioni corpuscolate α o β^- in grado di dissipare tutta la loro energia in uno spazio molto piccolo (<1 cm); ciò permette una radioterapia metabolica selettiva e mirata;
- in *ricerca biomedica*, con la possibilità di marcare le molecole biologiche sostituendo uno o più isotopi stabili con il corrispondente isotopo radioattivo, quali ad esempio C, N, H, O. Ciò permette di non modificare in alcun modo le caratteristiche fisiche e chimiche della molecola nativa, mantenendo quindi invariate le sue proprietà biologiche.

La diagnostica medico-nucleare interviene in diversi settori, tra cui rivestono importanza primaria Cardiologia e Oncologia, come mostrato in Tabella 1.

Ambito di patologia	Problemi di salute specifici
Oncologia	<ul style="list-style-type: none"> • neoplasie della tiroide e tumori neuro-endocrini • neoplasie della mammella, prostata, polmone, colon retto, melanoma • linfomi • altre patologie neoplastiche primitive e secondarie
Cardiologia	<ul style="list-style-type: none"> • cardiopatia ischemica acuta e cronica • miocardiopatie dilatative
Endocrinologia	<ul style="list-style-type: none"> • patologie della tiroide e delle paratiroidi • patologie dell'ipofisi, del surrene e delle gonadi
Ortopedia-osteopatie	<ul style="list-style-type: none"> • complicanze da protesi articolari • osteonecrosi • alterazioni del metabolismo calcico • patologia reumatica e artropatie
Neurologia e Psichiatria	<ul style="list-style-type: none"> • demenze • vasculopatie cerebrali • epilessia • morbo di Parkinson e parkinsonismi
Nefro-Urologia	<ul style="list-style-type: none"> • uropatie ostruttive • parenchimopatie acute e croniche • reflussi • ipertensione nefro-vascolare
Gastroenterologia	<ul style="list-style-type: none"> • patologia delle ghiandole salivari • disordini della motilità • patologie focali epatiche
Pneumologia	<ul style="list-style-type: none"> • embolia polmonare • interstiziopatie (sarcooidosi inclusa) • bronco-pneumopatia cronica ostruttiva
Patologie infiammatorie	<ul style="list-style-type: none"> • osteomielite, spondilodisciti e artriti acute • patologia infiammatoria del tratto gastroenterico • ascessi e febbre di n.d.d. • complicanze infettive delle protesi
Ematologia	<ul style="list-style-type: none"> • policitemia vera e piastrinopenie

Tab. 1 Competenze della Medicina Nucleare

La Tomografia ad emissione di Positroni (PET)

La tomografia ad emissione di positroni (PET) rappresenta una metodica diagnostica, nell'ambito della medicina nucleare, che consente di studiare *in vivo* le funzioni, i processi metabolici e le reazioni biochimiche del corpo umano. Essa consiste nell'acquisizione di immagini tomografiche che, per mezzo della rilevazione di radionuclidi emettitori di positroni β^+ consente di ottenere immagini ad alta risoluzione ed una misura quantitativa dell'attività localizzata nei siti bersaglio^(2,3).

Nella PET vengono utilizzati, di norma, composti marcati con specie radionuclidiche quali ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C e ^{18}F che costituiscono traccianti ideali in quanto si tratta di isotopi radioattivi dei principali costituenti della materia vivente. Le loro caratteristiche chimiche, infatti, permettono marcature "fisiologiche" di substrati biologici anche a basso peso molecolare senza modificarne struttura e funzione. La breve emivita di questi radionuclidi, compresa tra i 2 minuti del ^{15}O e 110 min del ^{18}F , rende necessaria la produzione *in situ* mediante ciclotroni ad uso biomedicale, ormai ampiamente diffusi in diverse realtà ospedaliere italiane.

La strumentazione PET permette di registrare le radiazioni γ emesse in coincidenza ed in direzione opposta (angolo di 180°) in seguito all'annichilazione dei positroni emessi dal radionuclide (Figura 5). La posizione spaziale del radionuclide all'interno del corpo viene infatti rilevata da una serie di scintillatori solidi posti all'interno di un anello che circonda la parte del corpo interessata all'indagine.

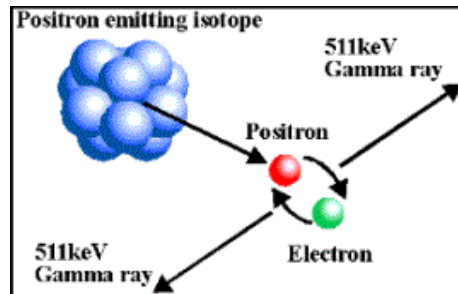


Fig.5. Il processo di annichilazione di un positrone

Ogni rivelatore è costituito da uno scintillatore solido e da un fotomoltiplicatore ad esso associato, che amplifica il segnale luminoso emesso e che invia il segnale ad un sistema computerizzato. In particolare, però, i rivelatori, posti ad anello intorno alla sorgente dei raggi γ due a due in coincidenza, raccolgono tutte le radiazioni che arrivano, ma il computer registra solamente quelle che arrivano in coincidenza su due rivelatori, come evidenziato in Figura 6. Questo fatto consente di localizzare con precisione la sorgente di annichilazione e quindi ricostruire una immagine bidimensionale della parte del corpo esaminata. Se l'acquisizione di più immagini viene eseguita in successione con lo spostamento dell'anello lungo il corpo, o meglio, del corpo all'interno dell'anello, si potranno ottenere, per mezzo di elaborazioni del computer, delle immagini tridimensionali. Questa sofisticata tecnica permette anche di determinare quantitativamente l'attività e quindi la concentrazione del radionuclide nei vari comparti del corpo umano.

La risoluzione delle immagini PET è condizionata intrinsecamente dall'energia della radiazione β^+ caratteristica del radionuclide utilizzato. Infatti l'effetto dell'annichilazione si produce quando il positrone cede tutta la sua energia all'ambiente esterno. Quindi, più elevata è questa energia, maggiore è lo spazio medio che i positroni percorrono prima dell'annichilazione che influenza a sua volta la risoluzione intrinseca dell'immagine.

Infine, l'efficienza della strumentazione PET è determinata da due fatti importanti. Il primo è l'eliminazione dei collimatori, necessari per aumentare la risoluzione nelle gamma-camere ma che causano una forte diminuzione nell'efficienza del sistema. Infatti, i collimatori bloccano tutte le radiazioni che non arrivano dalla sorgente posizionata lungo la sua orientazione spaziale, riducendo di molto il numero di scintillazioni e quindi il segnale acquisito dal fotomoltiplicatore. La risoluzione della strumentazione PET è legata invece alla determinazione del punto di emissione delle due radiazioni gamma in coincidenza a 180° l'una rispetto all'altra e la presenza dei collimatori non è richiesta. D'altra parte l'alta energia delle radiazioni gamma (511 keV) riduce l'efficienza della PET, perchè diverse radiazioni passano attraverso i cristalli dello scintillatore senza cedere la loro energia e produrre scintillazione. Per questo motivo si utilizzano principalmente cristalli di germanato di bismuto, ad elevata densità, per aumentare la probabilità di interazione con i raggi γ .

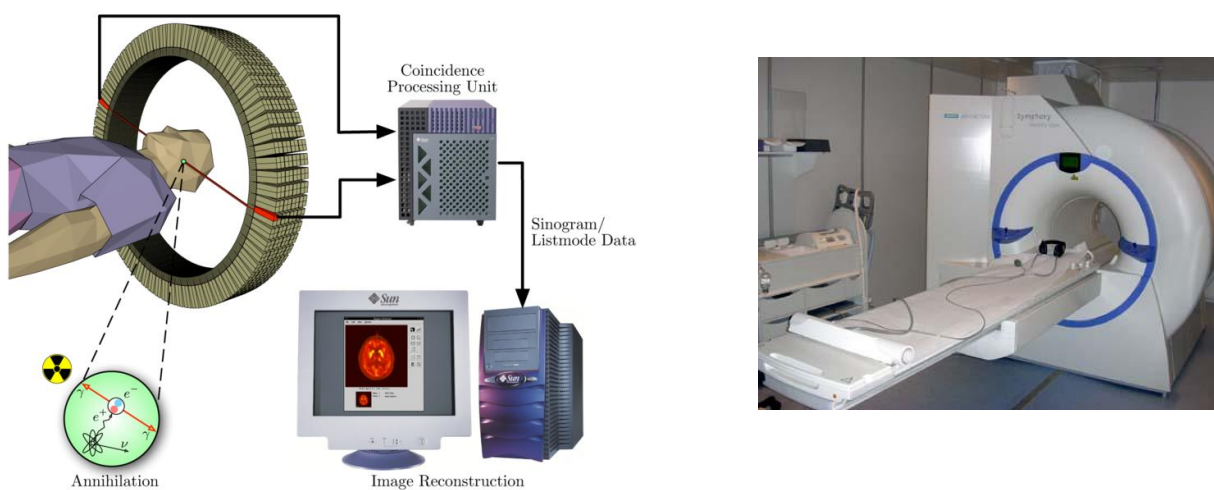


Fig. 6. Schema di un funzionamento di un tomografo PET.

La PET si avvale di radiofarmaci marcati con radionuclidi a vita breve emittenti positroni che tipicamente vengono prodotti attraverso l'impiego di acceleratori particelle chiamati ciclotroni.

Il ciclotrone è un particolare acceleratore di particelle che serve per la produzione dei radioisotopi. Sostanzialmente esso è costituito da un campo magnetico statico e da uno elettrico, perpendicolare al campo magnetico, applicato ad opportuni elettrodi all'interno di una camera a vuoto. Il campo magnetico è responsabile della curvatura della traiettoria delle particelle, mentre il campo elettrico consente di

aumentarne l'energia per portarle su traiettorie di raggio sempre più grande. In definitiva le particelle descrivono una specie di spirale che, iniziando dal centro, ove è posizionata la sorgente di ioni da accelerare, termina con il raggio massimo, corrispondente all'energia alla quale si intendono utilizzare le particelle per bombardare il bersaglio (Figura 7). Le particelle accelerate bombardano nuclei stabili in modo da attivare delle reazioni nucleari che convertono il nucleo stabile del bersaglio in quello radioattivo di interesse liberando altre particelle leggere. Le energie necessarie per attivare le reazioni nucleari riportate vanno dai 5 MeV a poche decine di MeV.

La breve emivita dei radionuclidi utilizzati nella PET ha rappresentato l'elemento di maggiore limitazione per la diffusione di questa tecnologia ma l'avvento di sistemi sicuri ed affidabili, in grado di produrli direttamente in situ, ha dato un significativo impulso allo sviluppo di questa diagnostica d'immagine.

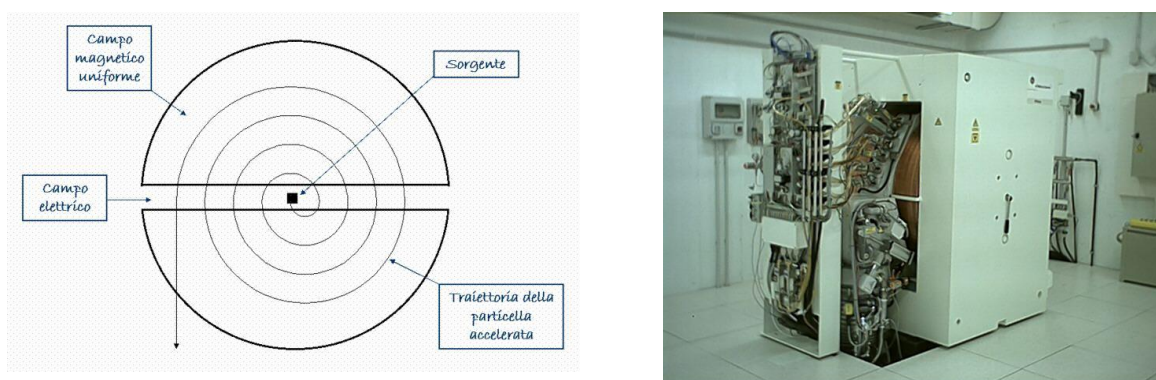


Fig. 7. Principio di funzionamento di un ciclotrone

Per un più proficuo utilizzo della strumentazione PET ed in particolare per sfruttare la maggior risoluzione dell'immagine data da questa tecnica, sempre maggiore attenzione è rivolta ai radionuclidi emettitori di positroni ottenibili da generatore.

E' possibile infatti che il radionuclide β^+ emittente venga ottenuto per decadimento di un radionuclide padre, di solito attraverso cattura elettronica. Se il radionuclide padre ha un $t_{1/2}$ decisamente più lungo di quello del figlio, esso può venir depositato in una colonna cromatografica in grado di determinare l'eluizione selettiva del radionuclide figlio. In questo modo viene offerta l'opportunità di prelevare dalla colonna (generatore) il radionuclide emittente di positroni, per tempi lunghi, con eluizioni a tempi prestabiliti ed in quantità sufficienti per l'indagine PET. In Figura 8 è riportato lo schema di funzionamento di un generatore così come descritto.

Il maggior vantaggio nell'impiego di emettitori di positroni ottenibili da generatore è quello di poter rinunciare alla presenza di un ciclotrone nelle immediate vicinanze della struttura ospedaliera.

I radionuclidi emettitori di positroni ricavabili da generatori però sono quasi tutti elementi metallici come nel caso di Gallio-68, il Rubidio-82, il Rame-62 prodotti rispettivamente dai generatori $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$,

$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$. Le proprietà metalliche di questi radioisotopi fanno sì che, per essere incorporati all'interno di molecole biologiche, debbano formare complessi di coordinazione.

L'uso dei radiofarmaci emettitori di positroni nella PET sconvolge, quindi, la filosofia iniziale per cui la tecnica PET è stata progettata. Infatti, la PET tradizionalmente costruisce immagini derivate da radioisotopi di elementi che fanno parte di molecole naturali con tropismi o metabolismi noti. Ad ogni modo, la maggior risoluzione garantita dalla PET e la possibilità di ovviare all'acquisto del ciclotrone, rende tali radionuclidi emettitori di positroni a carattere metallico estremamente utili ed interessanti.

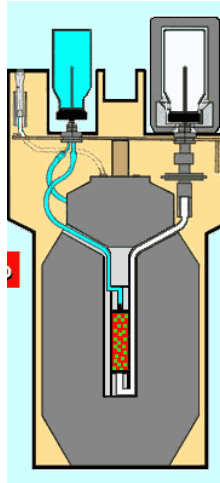


Fig. 8. Schema di funzionamento di un generatore

Radionuclidi e Radiofarmaci

I radionuclidi utilizzati a scopo diagnostico devono presentare determinate caratteristiche chimico-fisiche⁽⁴⁾:

- decadere con emissione di radiazioni β^+ o γ a bassa energia;
- essere facilmente incorporabili in una molecola di trasporto;
- il complesso risultante deve essere stabile *in vitro* ed *in vivo*;
- la marcatura deve essere facilmente realizzabile in tempi brevi, possibilmente a temperatura ambiente.

I radionuclidi utilizzati in terapia, invece, devono presentare caratteristiche differenti:

- la radiazione deve essere corpuscolata (α o β^-) ad alta energia;
- devono concentrarsi sul tessuto bersaglio, possibilmente senza accumulo nei tessuti sani;
- l'energia deve essere dissipata in poco spazio (<1cm), in modo da evitare danni ai tessuti circostanti;
- l'energia deve essere di 1-2 MeV per i nuclidi β emittenti e di circa 2-6 MeV per i nuclidi α emittenti;
- devono essere prodotti con un'elevata attività specifica (10 GBq/ μ g);
- devono avere un'emivita che va dalle 2 h ai 3 giorni;
- La citotossicità verso le cellule malate deve essere efficace ed irreversibile, senza significativi effetti secondari locali e/o sistemici per il paziente

Nella Figura 9⁽⁵⁾ vengono inquadrati all'interno della tavola periodica i radioelementi di più ampio impiego in medicina nucleare e che presentano le caratteristiche chimiche e nucleari più vicine a quelle idealmente richieste.

IA												VIA						VIIA
H	IIA											III A	IVA	VA	VIA	VIIA	H	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg	IIB	IVB	VB	VIB	VIIB	VIII B			IB	IIB	Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Ku	Ha	106	107	108	109										

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

- Elemento con isotopo emettitore di raggi γ
- Elemento con isotopo emettitore di particelle α
- Elemento con isotopo emettitore di elettroni (particelle β)
- Elemento con isotopo emettitore di positroni

Fig. 9. Tavola periodica dei radionuclidi utilizzati in Medicina Nucleare e loro tipo di emissione.

Tra questi, il ^{99m}Tc è considerato, grazie alle sue caratteristiche chimico-fisiche, il radionuclide di elezione nella diagnostica per immagini di tipo SPECT. Questo, infatti, decade attraverso l'emissione di una radiazione γ monocromatica con un'energia di 140 keV. Inoltre, presenta un tempo di emivita di 6.02 h, sufficientemente lungo, da permettere al radiochimico di portare a termine la sintesi del complesso e al medico di ottenere immagini utili, e sufficientemente breve, perchè la dose di radiazioni assorbita dal paziente sia minima.

Infine, il ^{99m}Tc è facilmente disponibile a basso costo attraverso generatori portatili di ^{99}Mo - ^{99m}Tc , installabili in ogni centro di Medicina Nucleare.

Nell'ambito della diagnostico per immagini di tipo PET, invece, il radionuclide più utilizzato è ^{18}F ma esistono altri radionuclidi di grande interesse quali ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{68}Ga . ^{18}F presenta caratteristiche nucleari ottimali Decade con emissione di positroni la cui energia massima (valore) è compatibile con l'ottenimento di immagini di elevata qualità. Il suo tempo di dimezzamento di 110 minuti, inoltre, è sufficientemente lungo da garantire il trasporto di radio farmaci a base di ^{18}F anche ad una certa distanza dal centro di produzione che comunque richiede la presenza di un ciclotrone.

Il radionuclide attualmente più utilizzato in terapia è l' ^{90}Y ; questo, infatti possiede proprietà soddisfacenti per fini terapeutici: emissione β^- pura, $t_{1/2} = 64$ h, $E_{\text{media}} = 0.93$ MeV, $E_{\text{max}} = 2.27$ MeV, penetrazione media nei tessuti di 2.5 mm, con un massimo di 10.3 mm.

I radiofarmaci sono dei composti chimici, che contengono uno o più nuclidi radioattivi, utilizzati come strumenti necessari per ottenere, in modo non invasivo, informazioni diagnostiche sui tessuti interni dell'organismo o per indurre un effetto terapeutico sui tessuti malati. Essendo prodotti medicinali devono essere preparati rispettando i requisiti imposti dalle specifiche della Farmacopea Ufficiale italiana e il loro impiego può avvenire solo previa Autorizzazione all'immissione al commercio (A.I.C.) rilasciata dal ministero della salute. I radiofarmaci vengono somministrati nell'organismo sottoforma di soluzioni, sospensioni, aerosol o altro, presentano un'opportuna struttura chimica e spesso sono coniugati a molecole o cellule che fungono da vettori. Una volta introdotti nell'organismo, i radiofarmaci contenenti radionuclidi γ o β^+ emittenti possono comportarsi da traccianti di funzione, permettendo studi diagnostici *in vivo* ed evidenziando anomalie metaboliche e funzionali dei tessuti patologici, mentre quelli contenenti radionuclidi α o β^- emittenti consentono, grazie alla loro energia e potere penetrante, una specifica irradiazione a fini terapeutici. In linea di principio, i radiofarmaci possono essere considerati come la combinazione di tre differenti componenti:

- *nucleare*, che è responsabile dell'emissione del segnale;
- *chimica*, che è responsabile delle caratteristiche biologiche e quindi delle specifiche reazioni in cui sono coinvolti;
- *farmaceutica*, che garantisce la sicurezza dell'uso *in vivo*.

Generalmente, i radiofarmaci possono essere usati *in vivo* solo se soddisfano i seguenti requisiti:

1. *caratteristiche chimiche e radiochimiche*

- conformità agli specifici criteri di purezza chimica, radiochimica e radionuclidica;
- di solito, alta attività specifica;
- alta stabilità chimica *in vivo*;
- farmacocinetica nota *in vivo*;

2. *caratteristiche biologiche*

- sterilità;
- assenza di endotossine batteriche;
- assenza di tossicità.

L'ottimizzazione di tutti questi parametri dà la garanzia di avere radiofarmaci iniettabili. Ogni procedura adottata per la preparazione (marcatura, processi di purificazione, sterilizzazione, etc.) deve essere opportunamente scelta ed ottimizzata per raggiungere questo scopo. Inoltre, tutte le operazioni di produzione e manipolazione devono essere eseguite in opportune aree a contaminazione controllata per minimizzare il rischio di una contaminazione batterica del prodotto finito.

I radiofarmaci a base metallica possono essere suddivisi in due classi principali:

- *metal essential* (agenti di perfusione), come i radiofarmaci del Tecnezio, nei quali il metallo è parte integrante della molecola e la cui biodistribuzione dipende dal flusso ematico, dai meccanismi di perfusione e dalle proprietà chimico-fisiche del complesso di coordinazione che penetra nelle cellule con un meccanismo di trasporto passivo;
- *metal tagged* (letteralmente: “etichettati”) la cui biodistribuzione nell’organismo è determinata dalle caratteristiche della molecola vettrice (ad esempio, un anticorpo) e dalle sue interazioni specifiche con strutture biologiche, quali recettori, mentre il metallo o il complesso di coordinazione viene semplicemente trasportato.

In ambedue i casi la geometria e la stabilità del radiofarmaco sono determinate dalla chimica di coordinazione del metallo.

Per quanto riguarda i radiofarmaci non caratterizzati dalla formazione di complessi metallici, il caso più noto e impiegato nella pratica clinica quotidiana è quello del 2-¹⁸F-Fluoro-deossi-D-glucosio (¹⁸F-FDG). Si tratta di un derivato del deossiglucosio dove un gruppo ossidrilico viene sostituito da un atomo di ¹⁸F, come indicato in Figura 10. Il deossiglucosio è infatti noto per essere internalizzato attraverso il trasportatore GLUT1 e per subire poi una sola reazione di fosforilazione rimanendo intrappolato all’interno della cellula. La sostituzione con un atomo di ¹⁸F non altera la funzione biologica di questa molecola che può quindi essere sfruttata come un tracciante del metabolismo del glucosio. Questa caratteristica può essere sfruttata in campo oncologico dal momento che i tumori maligni sono caratterizzati da un elevato ritmo glicolitico rispetto ai tessuti normali e che la rapida crescita tumorale è associata ad un progressivo aumento della glicolisi anaerobica.

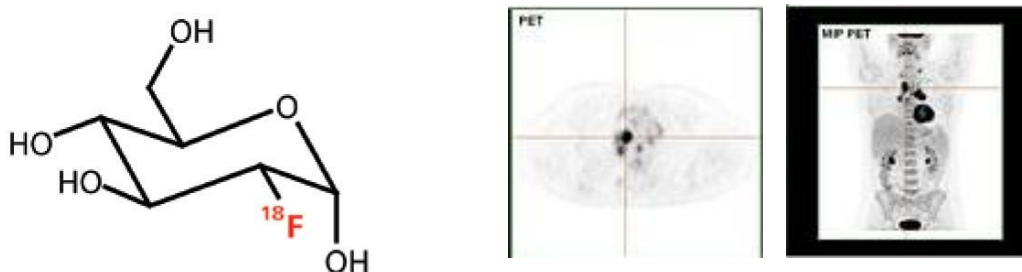


Fig. 10. Struttura chimica di ¹⁸F-FDG ed un esempio di immagine PET ottenuta con questo tracciante.

Agenti teranostici in medicina

Il termine “teranostica” è stato coniato nel 2002⁽⁶⁾ e definisce un materiale in grado agire come agente terapeutico e allo stesso tempo diagnostico. Quindi, un agente teranostico contiene al suo interno sia una componente terapeutica che una componente deputata all’*imaging* diagnostico (Figura 11).

A differenza dell’approccio clinico tradizionale dove due diversi composti sono deputati al raggiungimento dei due obiettivi, gli agenti teranostici combinano queste caratteristiche in un unico “package” che ha le potenzialità per superare possibili discrepanze nei profili di biodistribuzione e selettività che invece esistono quando si impiegano distinti agenti diagnostici e terapeutici. L’obiettivo finale nell’ambito della teranostica è, quindi, quello di sviluppare la capacità di monitorare allo stesso tempo il tessuto malato, la cinetica di rilascio e l’efficacia del trattamento con la speranza di arrivare a calibrare in modo estremamente preciso la tipologia e il dosaggio del trattamento terapeutico da utilizzare per il singolo paziente⁽⁷⁾.

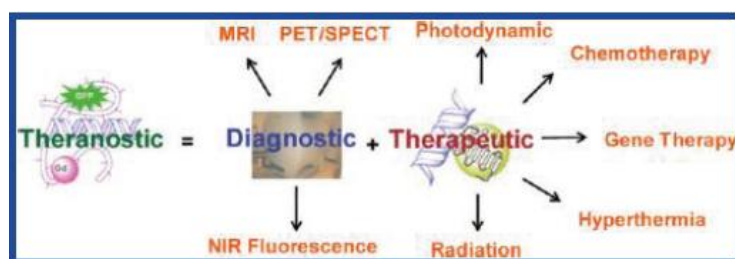


Fig.11. Le componenti diagnostica e terapeutica di un agente teranostico

In questo campo i risultati più promettenti sono stati ottenuti grazie all’impiego di nanoparticelle che possono essere localizzate in modo specifico in determinati distretti dell’organismo e quindi ridurre i loro potenziali effetti collaterali. La dimensione nanometrica di questi materiali preclude loro la possibilità di essere velocemente metabolizzati, consentendo quindi di rimanere per un tempo elevato nel sistema circolatorio. Inoltre, in molti tessuti tumorali i vasi sanguigni sono di forma irregolare e le cellule endoteliali possono presentare fenestrazioni che possono sfruttare da strutture nano particellari per l’ingresso a livello dei tessuti tumorali dove vengono poi trattenute grazie ad uno scarso drenaggio linfatico. Infine, le nanoparticelle sono caratterizzate da un elevato rapporto tra la loro area superficiale e il volume che comporta un’elevata capacità di caricamento attraverso la quale possono essere derivatizzate con molecole ad azione terapeutica e agenti diagnostici di vario tipo⁽⁸⁾.

A questo riguardo l’impiego di acidi nucleici (oligonucleotidi antisense, siRNA, aptameri) si è rivelato decisamente promettente in una serie di patologie quali il morbo di Alzheimer, il cancro, la deficienza di adenosina deaminasi e la fibrosi cistica dal momento che sono in grado di alterare l’espressione genica. Il loro successo come agenti terapeutici è però legato soprattutto al loro rilascio a livello del sito bersaglio dal momento che sono fortemente suscettibili di degradazione enzimatica e non vengono facilmente internalizzati dalle cellule. Infatti, l’iniezione sistemica di DNA nudo è in larga parte inefficace poiché

solamente una minima parte raggiunge intatta la destinazione finale a livello intracellulare. Tra i vari sistemi di rilascio studiati per questa classe di molecole, le nanoparticelle inorganiche presentano il notevole vantaggio di poter essere facilmente modificate per un approccio teranostico.

Ad esempio, nanoparticelle di oro sono state funzionalizzate con un oligonucleotide antisense in grado di legarsi ad una regione specifica dell'mRNA coinvolta nella soppressione dell'espressione della survivina, una proteina che agisce come inibitore di apoptosi⁽⁹⁾. Un ulteriore piccolo oligonucleotide è marcato invece con una cianina fluorescente, Cy5, che consente l'individuazione dell'interazione a livello dell'mRNA mediante comparsa di fluorescenza. La tecnica di individuazione dell'mRNA così progettata è veloce e sensibile e si denota come un promettente approccio di tipo teranostico.

Un altro esempio di agenti ad azione teranostica è rappresentato dalla sintesi di un sistema macromolecolare⁽¹⁰⁾, riportato in Figura 12, caratterizzato dalla presenza di un sito di coordinazione per un lantanide, da una serie di gruppi etilamminici che possono essere protonate e consentire l'interazione con specifiche catene polinucleotidiche. L'aspetto più interessante di questo tipo di piattaforma è rappresentato dal fatto che è possibile utilizzare il sito di coordinazione con un lantanide come il gadolinio, noto agente di contrasto per la risonanza magnetica nucleare oppure come l'europio che consente di effettuare un tipo di imaging su scala inferiore attraverso la microscopia di fluorescenza. Addotti di questo tipo hanno dimostrato una elevata efficienza di internalizzazione cellulare e un basso profilo di tossicità, oltre a non essere associati ai problemi tipici di una sonda fluorimetrica quali il *photobleaching* e una marcatura non uniforme.

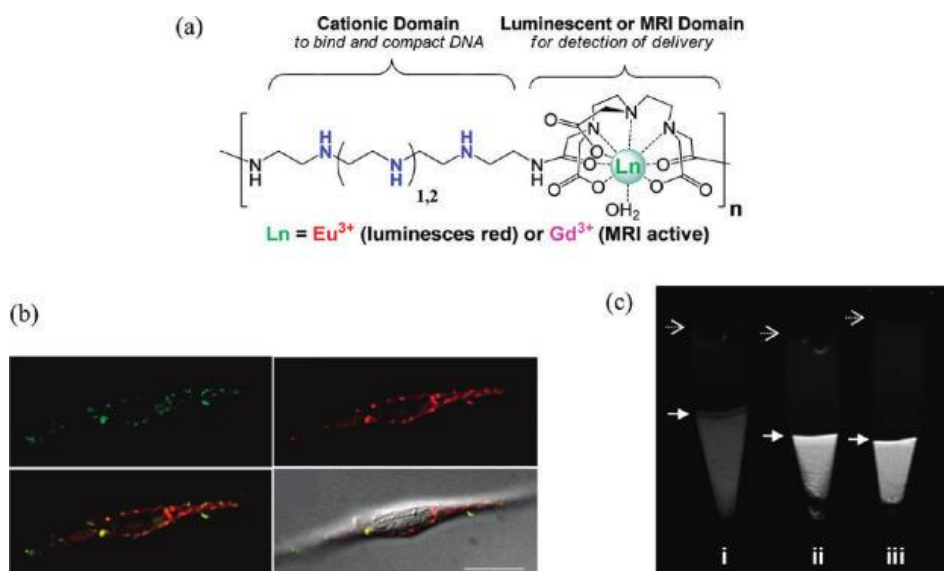


Fig.12. a) Il sistema macromolecolare con il sito di coordinazione per il lantanide; b) immagini di fluorescenza in cellule HeLa ottenute con Eu³⁺; c) immagini di risonanza magnetica in cellule HeLa ottenute con Gd³⁺.

Altro esempio di sistema nano particellare ad azione teranostica prevede la presenza di un gruppo porfirinico per il legame del manganese, un metallo sfruttato anch'esso come agente di contrasto in risonanza magnetica nucleare. Questi particolari addotti hanno una forma toroidale determinata dalla presenza di molecole anfifiliche polietileniche e da un core interno dove è localizzata la struttura porfirinica e dove viene caricata una molecola ad attività chemioterapica come l'idrofobica camptotecina o l'idrofilica doxorubicina⁽¹¹⁾, come mostrato in Figura 13.

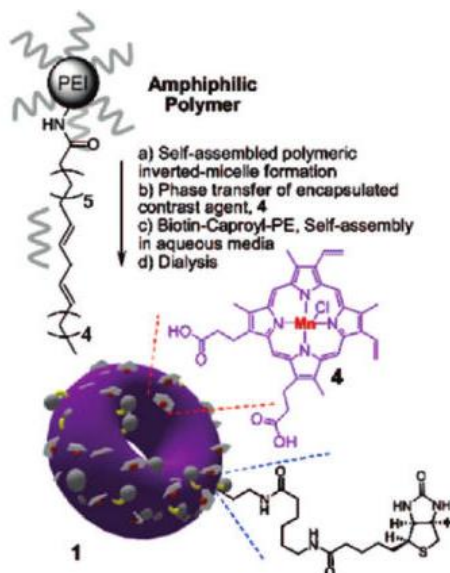


Fig. 13. Il sistema di forma toroidale caricato con molecole ad attività antitumorale.

Spesso in questi sistemi vengono aggiunte delle funzionalità di imaging multimodale come nel caso di nano particelle di ossido di ferro, caricate con molecole di dopamina, la cui superficie è funzionalizzata sia con la cianina Cy5_5 che con il radioisotopo ^{64}Cu ⁽¹²⁾, ovvero due componenti che consentono allo stesso di tempo di utilizzare come sistema di imaging la fluorescenza o la diagnostica per immagini PET (Figura 14). Infine, è stata sviluppata una facile via di sintesi per l'ottenimento di nano cristalli di ossido di ferro, legati covalentemente a sonde fluorescenti quali la rodamina o la fluoresceina e ad una molecola ad attività antitumorale come la doxorubicina⁽¹³⁾. Studi *in vitro* su cellule di adenocarcinoma mammario SK-BR-3 hanno evidenziato che l'attività citotossica della doxorubicina è mantenuta mentre studi *in vivo* su topi con tumore alla mammella di tipo MCF-7 hanno dimostrato l'efficacia come agenti diagnostici sia delle particelle di ossido di ferro come agenti di contrasto che delle sonde fluorescenti.

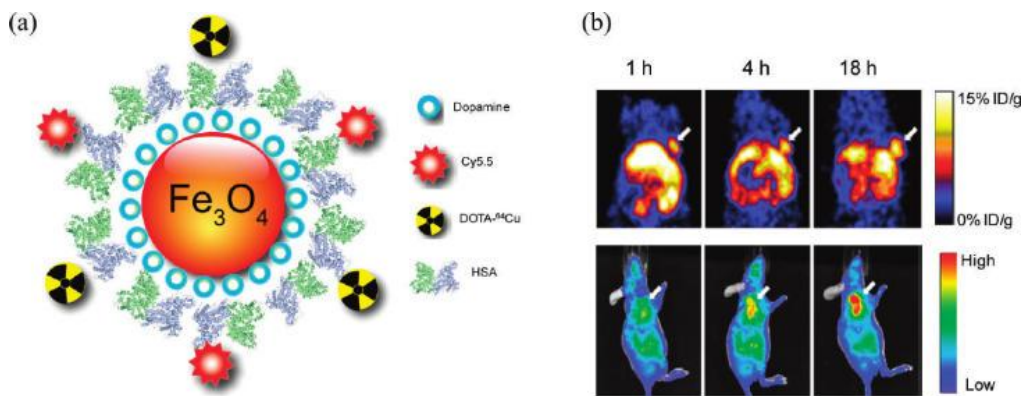


Fig. 14. a) Particelle di ossido di ferro funzionalizzate per l'imaging multimodale; b) immagini di fluorescenza e PET in topi con glioblastoma sub cutaneo.

Evidentemente ciascuna delle tecniche di *imaging* scelta presenta alcune caratteristiche positive ed alcuni svantaggi. Ad esempio nel caso della risonanza magnetica nucleare per ottenere delle immagini ad elevato contrasto è necessario un accumulo significativo dell'agente di contrasto nel tessuto bersaglio mentre la tecniche medico-nucleari sono associate ad una elevata sensibilità ma una inferiore risoluzione spaziale. È estremamente interessante notare però che, senza ricorrere all'uso di sistemi nanoparticellari, i radionuclidi presentano il vantaggio di emettere radiazioni differenti che possono essere sfruttate per scopi terapeutici. Ad esempio i radioisotopi ^{64}Cu e ^{67}Ga hanno delle caratteristiche nucleari tali per cui possono essere usati allo stesso tempo come agenti diagnostici, attraverso l'emissione di positroni, e come agenti terapeutici grazie all'emissione di elettroni. In alternativa è possibile pensare all'utilizzo di specifiche coppie di radionuclidi che esercitino lo stesso tipo di azione⁽¹⁴⁾. A riguardo i primi tentativi per un approccio di questo genere sono riconducibili ad una ventina di anni fa quando l'ittrio-90 ha iniziato ad essere largamente impiegato nell'ambito della radio immunoterapia e si è pensato di sfruttare gli stessi anticorpi marcati con l'isotopo γ -emittente, Indio-111, per studi comparati di *imaging* e biodistribuzione che potessero essere utili nel prevedere la dosimetria e l'efficacia del trattamento terapeutico. Un approccio di questo tipo è in realtà abbastanza azzardato dal momento che ittrio e indio sono due elementi la cui biochimica presenta certamente alcune analogie ma soprattutto significative differenze che non possono garantire una uniformità di comportamento per specie marcate con gli isotopi radioattivi di questi due metalli⁽¹⁵⁾. La soluzione ideale è piuttosto quella che prevede di utilizzare un radionuclide terapeutico da solo oppure associato ad un congenere chimico che abbia le stesse proprietà chimiche e biochimiche in modo tale che l'immagine diagnostica possa realmente fornire informazioni attendibili circa il dosaggio, la tossicità e l'efficacia del trattamento terapeutico.

Un ulteriore problema connesso a questa opportunità è che sebbene esistano molte coppie di radionuclidi interessanti, spesso le loro metodiche di produzione possono estremamente diverse tanto da influenzarne la chimica e il comportamento *in vivo*. I radionuclidi che possono essere ottenuti in quantità sufficienti e

che presentano caratteristiche fisiche, chimiche e nucleari particolarmente promettenti sono riportati in Tabella 2⁽¹⁶⁾.

Su queste basi è possibile, quindi, pensare ad un futuro in cui i trattamenti saranno sempre più mirati e personalizzati per il singolo paziente dove i dati diagnostici potranno essere analizzati in tempo reale ed essere sfruttati per prevedere con elevata probabilità la validità di una terapia.

L'attuazione un approccio terapeutico di questo tipo potrà aumentare l'efficacia del trattamento consentendo anche un certo risparmio economico da parte dei servizi sanitari nazionali anche se l'aumento della disponibilità a costi ragionevoli di alcuni tra i migliori radionuclidi teranostici rimane uno dei problemi principali che deve essere risolto prima di poter trasferire questo approccio nella pratica clinica quotidiana.

Radionuclide	t_{1/2}	Emissione γ per l'imaging (%)	Particelle terapeutiche, energia media
Scandio-47	3.35 g	159 keV (68%)	β^- ; 162 keV
Rame-64	12.07 h	511 keV(38.6 %)	β^- ;190 keV
Rame-67	2.58 g	186 keV (40%)	β^- ; 141 keV
Gallio-67	3.26 g	93, 184, 296 keV (40, 24, 22%)	15 Auger; 0,04-9.5 keV 10 conversioni elettroniche; 82-291 keV
Indio-111	2.80 g	171,, 245 keV (91, 94%)	6 Auger; 0.13-25.6 keV 12 conversioni elettroniche; 144-245 keV
Sn-117m	14.00 g	159 keV (86%)	8 conversioni elettroniche; 141 keV
Iodio-123	13.3 h	159 keV (83%)	12 Auger; 23-30.4 keV 7 conversioni elettroniche; 0.014-32 keV
Iodio-131	8.0 g	365 keV (82%)	β^- ; 181 keV
Samario-132	1.94 g	103 keV (30%)	β^- ; 280 keV
Astato-211	7.2 h	79 keV (21%)	α ; 5867 keV
Bismuto-213	46 min	441 keV (26%)	β^- ; 425 keV; α 98% dal figlio Tallio-201

Tab. 2. Elenco di alcuni tra i principali radionuclidi con caratteristiche nucleari che potrebbero consentire una applicazione teranostica.

Complessi metallici in medicina

Gli ioni metallici hanno la caratteristica di essere solubili nei fluidi biologici ed in questa forma hanno la tendenza ad interagire e legarsi a diverse molecole biologiche come ad esempio le proteine o il DNA. Questa scoperta ha portato allo studio e all'utilizzo di diversi composti contenenti metalli come possibili soluzioni per diverse malattie. Il complesso metallico di maggiore successo come anti tumorale è il cisplatino.

Il **cisplatino** [cis-diammino-dicloro-platino(II)], la cui struttura è riportata in Figura 15, è stato per la prima volta sintetizzato nel 1844 da Michele Peyrone⁽¹⁷⁾, ma solo nel 1969 Barnett Rosenberg ne scoprì accidentalmente le proprietà antitumorali⁽¹⁸⁾. È costituito da un atomo di platino legato a due ioni cloro e due molecole di ammoniaca.

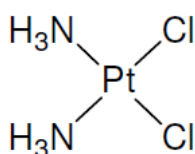


Fig. 15. Struttura del cisplatino

Il cisplatino è uno più efficaci farmaci antitumorali in commercio, attualmente utilizzati in chemioterapia sia da solo che in associazione con altri farmaci. Viene utilizzato per quasi il 50% di tutti i tumori ed è uno dei pochi antitumorali potenzialmente curativo (porta alla guarigione della malattia del 90% del caso di tumore ai testicoli)⁽¹⁹⁾. Viene impiegato soprattutto per il trattamento di patologie neoplastiche come il tumore all'ovaio, alla cervice, al polmone, alla vescica e ai testicoli. Il successo clinico ha stimolato la ricerca verso la sintesi di farmaci nuovi e più potenti. Di tutti i complessi di platino entrati in sperimentazione clinica di Fase I, solo due sono stati approvati in terapia. Essi sono il carboplatino⁽²⁰⁾ [cis-diammino-(1,1-ciclobutan-dicarbossilato)platino(II)] e oxaliplatino⁽²¹⁾ [(trans-R,R-cicloesano-1,2-diammino)oxaliplatino(II)] (Figura 16).

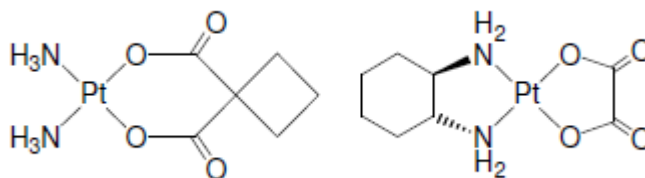


Fig. 16. Strutture del carboplatino (sinistra) e oxaliplatino (destra)

Benché il cisplatino sia utilizzato in clinica da decenni, il suo meccanismo d'azione e quello di composti analoghi non è stato ancora ben definito. Tuttavia è generalmente accettato che il bersaglio d'azione del cisplatino sia il DNA⁽²²⁾ e che il composto reattivo è rappresentato dalla specie monoidrato attiva cis-

$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^{+}$ ⁽²³⁾, carica positivamente (elettrofila), che può reagire con le basi nucleofile del DNA, principalmente con l'N₇ della guanina, mediante l'eliminazione di una molecola d'acqua. Si possono verificare diversi tipi di legami tra i composti di platino ed il DNA, ma i più frequenti sono i legami cross-link 1,3 intracatena e i legami cross-link 1,2 intracatena. (Figura 17) Quest'ultimo risulta essere il legame più citotossico, poichè provoca una tensione di legame così forte da portare alla distorsione dell'acido nucleico che determina lo svolgimento della doppia elica con conseguente avvio del processo di apoptosi cellulare⁽²⁴⁾.

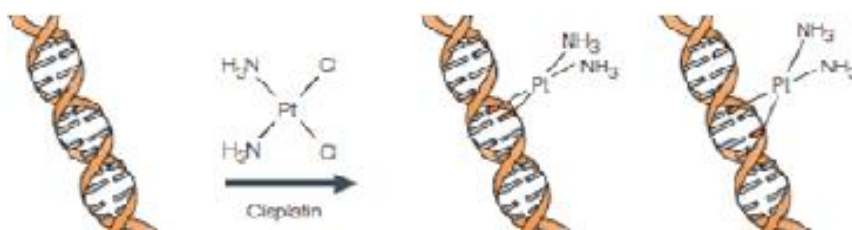


Fig. 17. Legami tra il cisplatino e il DNA (attività del cisplatino)

Il cisplatino e i suoi derivati presentano alcuni svantaggi e tra i principali possiamo ricordare la presenza di effetti collaterali severi come la nefrotossicità, epatotossicità, ototossicità e nefrotossicità e l'insorgenza di fenomeni di resistenza innata o acquisita.

Per questi motivi la ricerca si è focalizzata sull'utilizzo di nuovi agenti antitumorali a base di metalli diversi dal platino, che potessero avere proprietà farmacologiche almeno paragonabili a quest'ultimo, accompagnati da un minore sviluppo di effetti collaterali e in grado di minimizzare fenomeni di resistenza.

Inoltre, l'interesse per i complessi inorganici come agenti antitumorali è sempre più elevato dal momento che questo tipo di composti presentano una serie di vantaggi rispetto alle convenzionali molecole organiche impiegate in terapia. Infatti, gli ioni metallici sono in grado di coordinare leganti in una configurazione tridimensionale che consente una efficace derivatizzazione con molecole responsabili di un sistema target specifico⁽²⁵⁾. Inoltre, i complessi metallici offrono una grande varietà di possibili strutture molecolari caratterizzate da diversi numeri di coordinazione, geometrie e proprietà cinetiche che non possono essere realizzate con i convenzionali composti di natura organica^(26, 27). Ulteriormente, gli orbitali d parzialmente occupati nei metalli di transizione conferiscono ai complessi delle interessanti proprietà elettroniche utili nella progettazione di antitumorali⁽²⁸⁾. Ioni metallici possono essere anche coinvolti in processi ossido-riduttivi⁽²⁹⁾ a livello fisiologico e la loro capacità di partecipare in reazioni di scambio di leganti determina una elevata probabilità di interazione con molecole biologiche, come già ampiamente dimostrato dal cisplatino⁽³⁰⁾. Infine, la possibilità di impiegare anche dei metalli non essenziali consente di

esplorare degli interessanti e inaspettati comportamenti in vivo, differenti da quelli riscontrati nei sistemi presenti in natura⁽³¹⁾.

I Ditiocarbammati

Caratteristiche generali:

I ditiocarbammati (DTC) sono piccole molecole organiche a base di zolfo che contengono un gruppo funzionale ditiocarbossilico coniugato con un gruppo amminico secondario alifatico⁽³²⁾ (Figura 18).

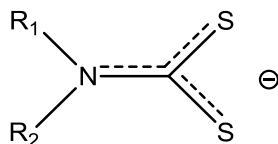


Fig. 18. Struttura generale del legante ditiocarbammico

Il gruppo ditiocarbossilico è molto importante in quanto consente la coordinazione dei ditiocarbammati a ioni metallici e la possibilità di reagire con altri gruppi solfidrici^(33, 34). I complessi che si ottengono si sono rivelati molto stabili, soprattutto grazie alla delocalizzazione degli elettroni sugli orbitali π che si formano tra i due atomi di zolfo legati al centro metallico.

Proprio in virtù delle loro proprietà chelanti i ditiocarbammati presentano elevata attività antibatterica, antitubercolotica e antifungina, che ne permettono l'utilizzo in diversi campi, che spaziano dall'agricoltura come insetticidi, erbicidi e fungicidi, all'ambito medico.

In medicina i ditiocarbammati sono utilizzati per diversi scopi, tra i quali i più importanti sono il trattamento di funghi e batteri, la cura dell'alcolismo cronico, come antidoto per l'avvelenamento da metalli ed, infine, sono in fase sperimentale come terapia per la cura dell'AIDS⁽³⁵⁾.

Come già evidenziato, i ditiocarbammati hanno la capacità di chelare ioni metallici, compresi quelli presenti a livello fisiologico comportando quindi una modificazione dell'attività di diverse strutture cellulari.

Infatti, derivati del dietil-ditiocarbammato (DEDC) sono in grado di inibire la Cu/Zn superossido dismutasi attraverso la captazione del metallo a livello endogeno, necessario per l'attivazione dell'enzima⁽³⁶⁾.

Altri studi condotti su cellule di neuroblastoma umano hanno evidenziato che il DEDC è in grado di indurre un elevato effetto citotossico. Ciò è dovuto alla capacità dei ditiocarbammati di complessare il rame endogeno a livello extracellulare; in questa forma il rame può attraversare la membrana cellulare, localizzarsi a livello intracellulare e indurre una drastica diminuzione della vitalità cellulare, proprio a causa del sovraccarico di rame, che comporta uno stress ossidativo con formazione di specie reattive dell'ossigeno in grado di causare danni al DNA⁽³⁷⁾.

Un altro aspetto particolarmente interessante dei ditiocarbammati riguarda il loro potenziale utilizzo come agenti chemoprotettori nei confronti della tossicità renale causata dal cis-platino e da altri composti ad azione antitumorale a base di platino, che attualmente ne limita fortemente l'impiego. Infatti, è stato

ipotizzato che il cis-platino sia in grado di indurre nefrotossicità, con comparsa di stati infiammatori e la morte delle cellule tubulari, a causa della capacità del platino di legarsi agli enzimi renali ricchi di gruppi tiolici⁽³⁷⁾. Lo zolfo, infatti, è coinvolto nell'intero processo metabolico dei farmaci a base di platino dal momento che interviene nei processi di *uptake* cellulare e di interazione con il DNA. Nonostante il ruolo dei composti a base di zolfo non sia ancora del tutto chiarito, è accettato che la loro interazione con cis-platino e derivati abbia degli effetti negativi sull'efficacia del trattamento terapeutico dal momento che si associa a fenomeni di tossicità renale e resistenza. Inoltre, il legame stabile ed irreversibile del cis-platino con leganti intracellulari caratterizzati dalla presenza di gruppi tiolati è considerato come il principale *step* di inattivazione mentre l'interazione con proteine e peptidi con residui solforati quali cisteina o metionina ne causa una alterazione della conformazione con conseguenti variazioni della loro attività biologica⁽³⁸⁾.

Per questa serie di motivi molecole nucleofile a base di zolfo sono state testate come agenti chemoprotettori⁽³⁹⁾ in grado di modulare la tossicità indotta dal cis-platino e tra questi, il DEDC ha evidenziato dei risultati particolarmente interessanti dal momento che agisce come protettore a livello renale, gastrointestinale e del midollo osseo. In particolare l'azione del DEDC è dovuta alla capacità di spiazzare il platino dai gruppi tiolici proteici senza però modificare gli addotti platino-DNA che sono responsabili dell'attività antitumorale⁽⁴⁰⁾. Inoltre, liberando il platino dall'interazione con le strutture cellulari solforate, il ditiocarbammato aumenta la quantità di platino disponibile per l'interazione con il DNA.

Nonostante il DEDC abbia dimostrato un ottimo profilo farmacologico nella terapia antitumorale con cisplatino e derivati, tuttavia, il suo utilizzo come chemoprotettore renale risulta essere piuttosto limitato dal profilo di tossicità acuta propria dei ditiocarbammati stessi⁽⁴¹⁾.

Complessi metallici con ditiocarbammati in medicina:

Sulla base di queste considerazioni la ricerca si è concentrata sulla progettazione di complessi in grado di combinare l'attività antitumorale del centro metallico con l'effetto chemoprotettivo dei ditiocarbammati. Composti di questo tipo dovrebbero essere caratterizzati da un buon profilo di stabilità a causa dell'effetto chelante determinato dal legante ditiocarbammico mentre il profilo di solubilità potrebbe essere opportunamente modulato modificando i sostituenti a livello dell'atomo di azoto ditiocarbammico. Infine, la presenza del ditiocarbammato dovrebbe rendere meno probabile la coordinazione di altre molecole a base di zolfo, impedendo quindi l'interazione del centro metallico con strutture proteiche ed enzimatiche e di conseguenza riducendo l'insorgenza di effetti indesiderati⁽⁴²⁾.

Per prima cosa sono stati sintetizzati una serie di complessi a base di platino⁽⁴³⁾ caratterizzati dalla presenza di un legante di tipo amminico, di un ditiocarbammato e di un buon gruppo uscente in grado di consentire l'interazione con il DNA in modo simile a quanto avviene per il cisplatino (Figura 19). Come leganti amminici sono stati scelti dei derivati della piridina già noti per la loro capacità di interagire con i gruppi sulfidrilici

proteici senza influenzare l'attività antitumorale del centro metallico. Il ditiocarbammato scelto è un derivato della sarcosina, precedentemente studiato per la sua capacità di aumentare l'efficacia terapeutica di alcuni farmaci ad azione antitumorale come la doxorubicina e il metotressato⁽⁴⁴⁾. La funzione carbossilica è stata esterificata per evitare reazioni collaterali e per modulare la solubilità del complesso finale. Tra i diversi composti testati, [Pt^{II}Cl(ESDT)(py)] (PTL1) ha evidenziato le proprietà citotossiche più promettenti associate alla capacità di superare la resistenza indotta dal cis-platino.

È interessante notare che PTL1 determina una platinazione del DNA inferiore rispetto al cisplatino molto probabilmente a causa delle esigenze steriche dei leganti presenti. Ad ogni modo l'interessante profilo di citotossicità riscontrato è dovuto al fatto che il complesso è in grado di causare lesioni a livello del DNA particolarmente difficili da riparare e quindi più efficienti nell'inibire la proliferazione cellulare. Inoltre, la concentrazione nelle urine di *biomarker* di danno renale quali la glutamina sintetasi, l'acido amminoipurico e l'N-acetilglucosamina non subiscono significative variazioni a conferma del fatto che composti di questo tipo evitano la comparsa di effetti collaterali a livello renale⁽⁴⁵⁾.

Sfortunatamente, nonostante questi interessanti risultati, ulteriori studi sono stati interrotti a causa della sua bassa solubilità in e relativamente limitata stabilità in condizioni fisiologiche dei composti e, anche se sono stati sintetizzati e studiati altri complessi di questo tipo, le difficoltà di sintesi e l'inadeguato profilo di stabilità in ambiente fisiologico rimangono dei limiti importanti nello sviluppo di questa classe di potenziali agenti antitumorali.

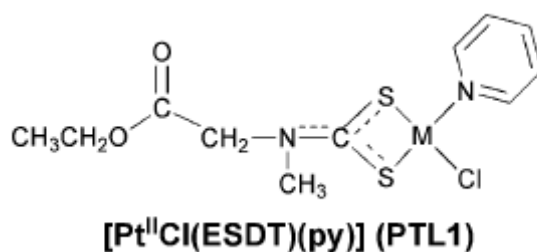


Fig. 19. Il complesso di platino PTL1, caratterizzato dalla presenza di legante ditiocarbammico e una piridina.

Per superare i problemi evidenziati dai complessi a base di platino, sono stati sviluppati dei derivati con altri metalli. Tra questi, i composti di oro hanno goduto di un interesse sempre maggiore anche a causa del fatto che alcuni farmaci a base di oro quali l'auranotioglucozio (solganol) e il trietilfosfino-oro(I)tetraacetilglucosio (auranofin), rappresentati in Figura 20, sono impiegati per il trattamento dei sintomi associati all'artrite reumatoide. L'attività di queste molecole è associata ad una azione immunodepressiva e anti-infiammatoria che può essere utilmente sfruttata anche nell'ambito della terapia antitumorale⁽⁴⁶⁾ ed, infatti, auranofin ha dimostrato di avere una elevata attività citotossica *in vitro* anche se la sua potenziale applicazione come agente antiproliferativo è limitata dalla sua scarsa efficacia *in vivo*.

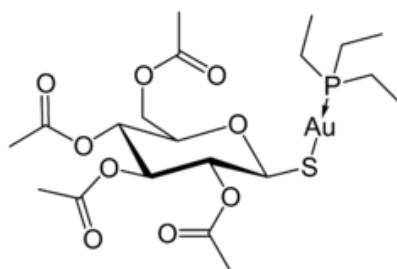


Fig. 20. Struttura chimica di Auranofin

In ogni caso, i complessi di oro(III) hanno caratteristiche chimiche quali la preferenza per la geometria quadrato-planare e la configurazione elettronica d^8 che possono essere facilmente ricondotte al cis-platino. Per questa serie di motivi. Sono stati sintetizzati e caratterizzati una serie di complessi d'oro con leganti ditiocarbammici del tipo $[Au^{III}X_2(dtc)]$ ($X = Cl, Br$; dtc = legante ditiocarbammico) (Figura 21), in cui il metallo coordina il legante attraverso due atomi di zolfo, completando la sfera di coordinazione con due atomi di cloro o di bromo⁽⁴⁷⁾.

Studi comparativi hanno dimostrato che i complessi di oro-ditiocarbammato risultano essere significativamente più attivi dei corrispondenti complessi platino-ditiocarbammato nei confronti di cellule squamose di adenocarcinoma umano alla cervice e promielociti leucemici umani⁽⁴⁸⁾. I complessi ottenuti risultano anche essere, in vitro, molto citotossici nei confronti di linee tumorali cellulari cisplatino resistenti⁽⁴⁹⁾ suggerendo un meccanismo d'azione diverso.

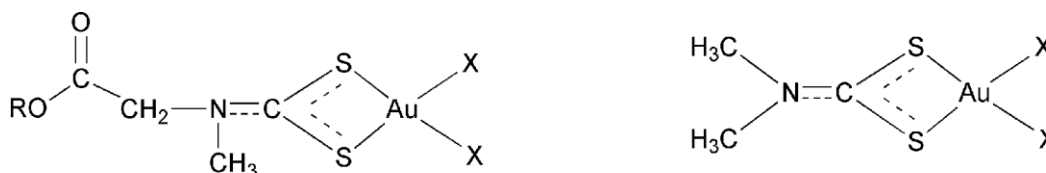


Fig. 21. Struttura generale di una serie di composti di oro(III) del tipo $[Au^{III}X_2(dtc)]$.

Infatti, recenti studi hanno evidenziato che i target cellulari di questa classe di composti sono la tireodossina reduttasi e il proteasoma^(50, 51). Il sistema della tireodossina gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del bilancio ossido-riduttivo intracellulare e l'inibizione dell'enzima reduttasi che ne controlla lo stato redox, determina alterazioni nelle funzioni mitocondriali associate a stress ossidativi che portano ad innescare la morte cellulare per apoptosi. Come già ricordato invece, il proteasoma è coinvolto nella degradazione proteica e una sua inibizione causa un stress a livello del reticolo endoplasmatico con conseguente morte cellulare.

Tra i composti di oro il complesso AUL12, la cui struttura è riportata in Figura 22, è stato selezionato per le sue caratteristiche di solubilità, stabilità e attività proliferativa per eseguire ulteriori studi in topi con

tumore solido di Ehrlich e carcinoma ascitico⁽⁵²⁾. Dopo 11 giorni di trattamento è stata osservata una significativa riduzione della massa tumorale e la chemioterapia è generalmente ben tollerata senza alcuna perdita di peso nei topi trattati. Anche per quanto riguarda il profilo di tossicità renale, AUL12 causa un aumento estremamente limitato delle concentrazioni dei *biomarker* escreti nelle urine, a conferma di una nefrotossicità piuttosto limitata.

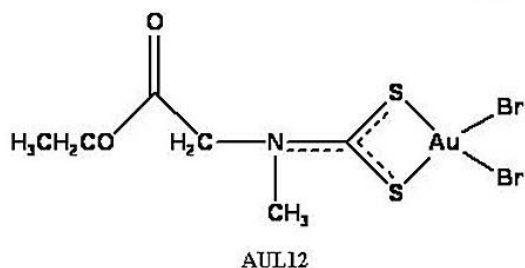


Fig. 22. La struttura del promettente complesso AUL12.

A seguito dei risultati estremamente promettenti raggiunti dai complessi $[Au^{III}X_2(dtc)]$, la ricerca si è estesa verso lo sviluppo di derivati ditiocarbammici coordinati con altri metalli quali il rutenio, al fine di ottenere dei complessi dotati di un'elevata attività antitumorale, almeno paragonabile a quella del cisplatino, associata a ridotti effetti collaterali e minori fenomeni di resistenza innata o acquisita.

Dopo il successo di due importanti composti, il NAMI-A ($(ImH)trans-[Ru^{III}Cl_4(DMSO)(Im)]$, Im = imidazolo; DMSO = dimetilsolfossido)⁽⁵³⁾, progettato come antimetastatico, e il KP1019, ($(IndH)trans-[Ru^{III}Cl_4(Ind)_2]$, Ind = indazolo)⁽⁵⁴⁾, ambedue entrati in sperimentazione clinica, anche il rutenio ha riscosso un grande interesse come metallo per la sintesi di agenti antitumorali.

Al fine di sfruttare in modo sinergico le potenziali attività antitumorali del centro metallico e quelle del legante sono stati realizzati un certo numero di complessi di Ru(III) con derivati ditiocarbammici, dei quali è stata testata in vitro l'attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari tumorali umane⁽⁵⁵⁾.

I derivati ionici dinucleari del tipo $\alpha-[Ru^{III}_2(dtc)_5]Cl$, risultano essere molto più citotossici in vitro rispetto ai corrispondenti analoghi neutri $[Ru^{III}(dtc)_3]$ (Figura 23) ed hanno l'interessante caratteristica di essere particolarmente attivi solo nei confronti di alcune linee cellulari permettendo quindi di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo d'azione selettivo per alcune determinate tipologie tumorali. In Figura 23 sono riportate le strutture generali dei due complessi.

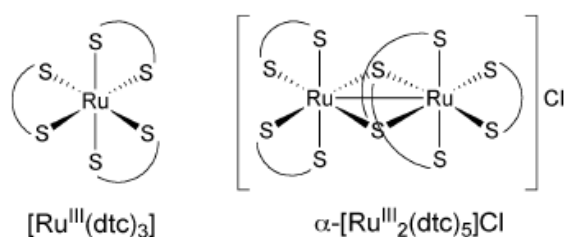


Fig.23. Complessi di rutenio con diversi leganti ditiocarbammici

Complessi di rame con ditiocarbammati in medicina:

Nello sviluppo di agenti antitumorali *metal-based* altro metallo di grande interesse è il rame dal momento che si tratta di un componente essenziale di molte metallo-proteine ed è coinvolto in molti processi cellulari. Studi approfonditi hanno evidenziato che il rame risulta essere un co-fattore essenziale, in grado di stimolare la produzione di citochine, la degradazione della matrice cellulare e la migrazione cellulare endoteliale mediata dalle integrine coinvolte nell'angiogenesi, un processo critico nella crescita del tumore⁽⁵⁶⁾.

Per valutare, quindi, l'azione sinergica dei ditiocarbammati con le proprietà del rame metallico, sono stati eseguiti diversi studi con delle *mixture*, costituite da una miscela del legante in cui è stato aggiunto un sale del metallo. Risultati ottenuti con *mixture* di PDTC e CuCl_2 nei confronti di cellule leucemiche umane HL-60 hanno evidenziato una notevole azione pro-ossidante, in grado di indurre un effetto proapoptotico⁽⁵⁷⁾.

Un altro particolare esempio di *mixture* è quello ottenuto con disulfiram (DSF), farmaco già approvato per l'alcolismo cronico, grazie alla sua capacità di inibire l'aldeide deidrogenasi. Studi *in vitro* condotti in presenza di CuCl_2 hanno evidenziato un'attività citotossica, per induzione di apoptosi, nei confronti di cellule del melanoma. Infatti il DSF nel terreno di coltura si converte in DEDC e in presenza di Cu(II) forma il complesso $[\text{Cu}(\text{DED})_2]$, responsabile dell'attività biologica^(58, 59). Il meccanismo d'azione di disulfiram in presenza di ioni Cu^{2+} è riportato in Figura 24.

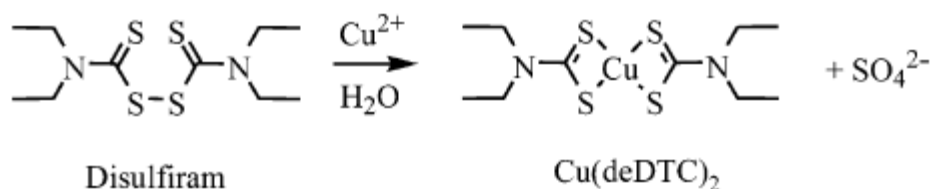


Fig. 24. Attivazione del disulfiram in presenza di Cu^{2+} nel terreno di coltura

Al fine di combinare le proprietà farmacologiche e antitumorali del metallo e del legante sono successivamente stati sintetizzati e caratterizzati dei complessi di rame con leganti ditiocarbammici. Gli studi di citotossicità *in vitro* nei confronti di linee cellulari tumorali hanno evidenziato una notevole attività di questi complessi sia nei confronti di cellule sensibili sia resistenti al cisplatino.

L'elevata attività di questi composti rispetto ai composti di platino è da attribuire anche ad un diverso meccanismo d'azione dal momento che diversi studi sottolineano come i complessi di rame, a differenza di quelli di platino, sono in grado di inibire il proteasoma e indurre meccanismi di apoptosi cellulare. Ciò è stato dimostrato con l'utilizzo del complesso $[\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$, che grazie all'inibizione del proteasoma è in grado di indurre l'apoptosi in cellule di cancro alla mammella⁽⁶⁰⁾.

Grazie ai promettenti risultati ottenuti sono stati sintetizzati anche complessi di rame con leganti ditiocarbammici derivati da esteri della sarcosina (Figura 25), derivato N-metilico della glicina, dimostrando anche in questo caso una buona attività citotossica nei confronti di linee cellulari umane di tumore ovarico e alla cervice uterina (A431 e 2008) e nella variante resistente al cisplatino (A431Pt e c13*)⁽⁶¹⁾.

Infine, con lo stesso obiettivo sono stati sintetizzati dei complessi di zinco con leganti ditiocarbammici dal momento che anche lo zinco è un elemento essenziale nel nostro organismo coinvolto nella corretta attivazione di diverse strutture cellulari tra le quali gli enzimi.

I dati ottenuti dimostrano che i complessi di zinco(II) con leganti ditiocarbammici causano una significativa riduzione della vitalità cellulare in cellule umane cancerose della cervice (A431) e dell'ovaio (2008) e nella loro variante resistente al cisplatino. La loro attività risulta però minore rispetto ai corrispettivi complessi di rame⁽⁶²⁾.

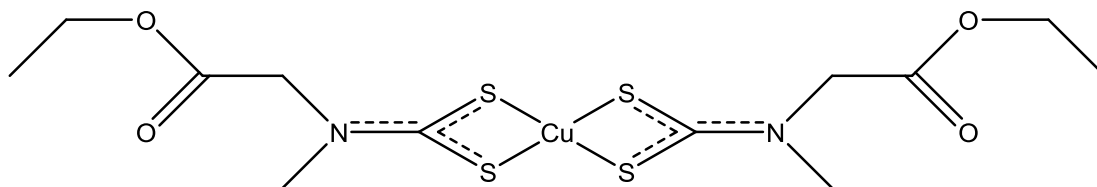


Fig. 25. La struttura del complesso [Cu(ESDT)₂]

SCOPO

Obiettivo del lavoro

Questo lavoro di tesi si inserisce nel contesto della ricerca di base di nuovi sistemi chelanti per la coordinazione di isotopi radioattivi del rame (^{64}Cu) e del gallio (^{68}Ga) a scopo diagnostico in medicina nucleare e allo stesso tempo nella ricerca di nuovi composti *metal-based* a potenziale azione antitumorale. In particolare, il rame-64 è un radionuclide β^+ emittente attualmente molto studiato per la diagnostica per immagini PET (*Positron Emission Tomography*), in quanto permette di ottenere delle immagini di alta qualità ed ha un tempo di dimezzamento più lungo degli isotopi attualmente utilizzati in clinica che consente di veicolare agenti *target* specifico con una farmacocinetica lenta senza determinare un carico di dose eccessivo per il paziente.

Per questo motivo, negli ultimi anni, sono stati valutati una serie di sistemi chelanti capaci di formare complessi di rame sufficientemente stabili per una potenziale applicazione medico-nucleare e di consentire la coniugazione di una molecola biologicamente attiva in grado di riconoscere specifiche strutture dell'organismo e determinare quindi un sistema di *imaging target* specifico. Ma, ciò nonostante un solo complesso a base di ^{64}Cu è attualmente in fase di sperimentazione clinica per l'*imaging* di tessuti tumorali ipossici e nessun composto è ancora entrato in commercio.

Il lavoro di questa tesi si propone quindi di sviluppare un nuovo sistema chelante per ^{64}Cu attraverso l'impiego di leganti significativamente differenti da quelli sin qui testati. In particolare si è deciso di valutare il comportamento dei ditiocarbammati, leganti bidentati in grado di coordinare lo ione Cu^{2+} attraverso due atomi di zolfo per formare dei complessi a sfera di coordinazione S_4 del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$.

La scelta di utilizzare questa classe di leganti è dovuta innanzitutto al fatto che si tratta di una importante e conosciuta famiglia di composti in grado di formare complessi e di stabilizzare metalli di diversa natura. Nonostante questo, la loro applicazione radiofarmaceutica è piuttosto limitata ed in particolare il loro utilizzo per l'ottenimento di radiocomplessi a base di rame non è stato ancora investigato. Inoltre, i ditiocarbammati sono delle molecole molto versatili che possono essere facilmente funzionalizzate con una molecola biologicamente attiva, in grado di riconoscere specifiche strutture recettoriali presenti solo in determinati distretti cellulari, in modo tale da poter sviluppare quindi un sistema di *imaging target* specifico. Inoltre, questo lavoro si propone anche di valutare i complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ nell'ambito della ricerca di nuove molecole *metal-based* a potenziale azione antitumorale.

Lo sviluppo di composti a base metallica come antitumorali ha, infatti, assunto sempre maggiore rilievo a partire dalla scoperta delle promettenti proprietà antineoplastiche del cisplatino. Nonostante questo farmaco risulti, ancora oggi efficace in un gran numero di neoplasie, il suo utilizzo è piuttosto limitato a

causa dei pesanti effetti collaterali, soprattutto a carico dei reni, e per l'insorgenza di fenomeni di resistenza innata o acquisita. Con l'obiettivo di superare questi problemi, negli ultimi anni sono stati studiati diversi composti metallici non a base di platino, in grado di mantenere un'attività citotossica paragonabile a quella del cisplatino, ma caratterizzati da una minore tossicità sistemica e da minori fenomeni di resistenza. Recentemente, leganti ditiocarbammici quali il dietilditiocarbammato (DEDIC) e il pirrolidinditiocarbammato (PDTC) hanno dimostrato di essere potenti agenti chelanti per il rame dal momento che formano spontaneamente complessi stabili di $\text{Cu(II)}^{(10)}$, in grado di inibire l'attività chimotripsinica del proteasoma inducendo apoptosi in differenti tipi di cellule tumorali. Tali complessi determinano, inoltre, una riduzione dell'espressione del recettore per gli androgeni (AR) e del recettore per gli estrogeni α e β ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$) in cellule umane di tumore al seno e alla prostata⁽¹¹⁾. In particolare, il complesso $[\text{Cu(PDTC)}_2]$ presenta una potente azione inibitoria sul proteasoma e una induzione dell'apoptosi nelle cellule tumorali ma non nelle cellule normali.

È interessante notare però che, mentre la citotossicità *in vitro* di questi composti è stata ampiamente investigata, non sono riportati studi sul loro comportamento *in vivo*. Di conseguenza la possibilità di valutare il profilo biologico di queste molecole, in particolare a livello di farmacocinetica e di *uptake* cellulare, attraverso l'uso dei corrispondenti complessi radiomarcanti con ^{64}Cu potrebbe essere di grande interesse. In particolare, questo lavoro si propone di approfondire le conoscenze circa i sistemi di trasporto di questa classe di composti nelle cellule tumorali e i loro meccanismi di accumulo allo scopo di ottenere informazioni utili ad una progettazione più razionale di complessi a base di rame ad attività antitumorale e di verificare se l'attività citotossica mostrata da questi prodotti possa essere sfruttata per veicolare il radionuclide β^+ emittente ^{64}Cu all'interno delle cellule tumorali sviluppando un sistema di *imaging* delle masse tumorali molto efficace.

Altro metallo di grande interesse in ambito medico nucleare è il gallio, dal momento che l'isotopo ^{68}Ga è un radionuclide β^+ emittente a cui si guarda con sempre maggiore interesse nella per la diagnostica per immagini PET soprattutto perché può essere facilmente prodotto mediante l'impiego di un comodo ed economico generatore portatile ma, analogamente a quanto avviene per il rame, nessun composto a base di ^{68}Ga è ancora entrato in commercio.

La seconda parte di questo lavoro di tesi si propone, quindi, di valutare la capacità di leganti ditiocarbammici, per i motivi precedentemente elencati, di coordinare lo ione Ga^{3+} attraverso due atomi di zolfo per formare dei complessi a sfera di coordinazione S_6 del tipo $[\text{Ga(DTC-Ln)}_3]$ allo scopo di da un lato di verificare se questo sistema di coordinazione può essere trasferito a livello di tracciante con il radioisotopo ^{68}Ga per una potenziale applicazione radiofarmaceutica e dall'altro di valutare l'attività biologica di questa classe di composti nei confronti di diverse linee cellulari tumorali.

Infine, è interessante notare che complessi di questo tipo a base di rame o gallio hanno una ulteriore potenziale applicazione come molecole ad azione teranostica. Per teranostico si intende, infatti, una

molecola in grado di agire allo stesso tempo come un agente diagnostico e terapeutico nei confronti della stessa patologia. I radioisotopi ^{64}Cu e ^{67}Cu sono caratterizzati anche da una emissione di particelle β^- che possono essere sfruttate in ambito radioterapeutico. Quindi, composti a base di questi due radionuclidi possono sfruttare la componente di emissione di positroni per la diagnosi e la componente di emissione di elettroni per la terapia dello stesso disturbo, con la possibilità di monitorare costantemente l'efficacia del trattamento terapeutico. Inoltre, dal momento che gli analoghi complessi "freddi" di rame hanno già evidenziato una elevata attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari tumorali, è possibile ipotizzare un approccio teranostico alternativo dove il complesso radiomarcato con ^{64}Cu viene sempre utilizzato in ambito diagnostico mentre l'analogo complesso non radioattivo può venire impiegato per un trattamento di tipo chemioterapico. Quest'ultimo concetto può essere esteso anche al gallio, dove quindi il complesso radiomarcato con ^{68}Ga può essere utilizzato in ambito diagnostico mentre l'analogo complesso freddo in ambito terapeutico.

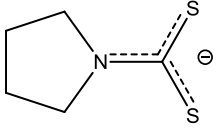
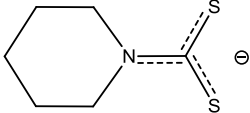
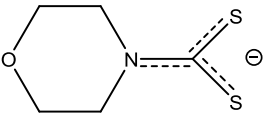
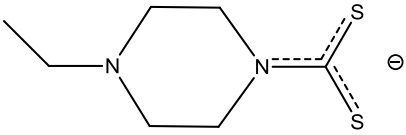
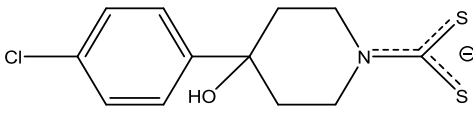
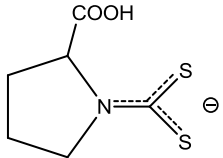
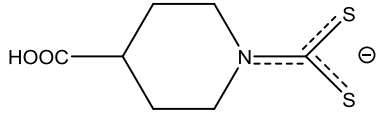
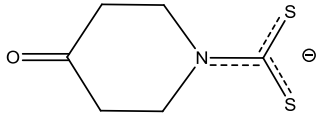
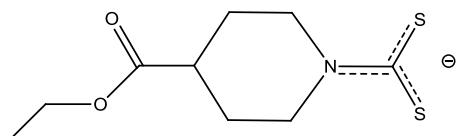
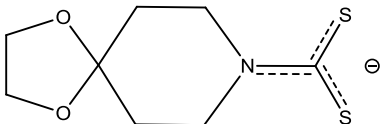
Progettazione del lavoro

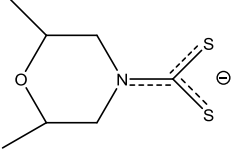
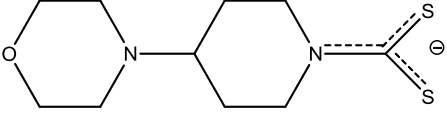
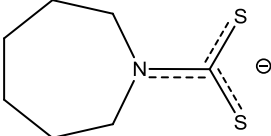
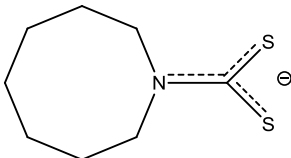
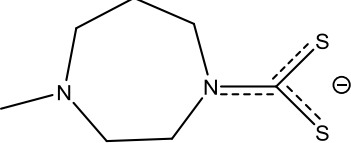
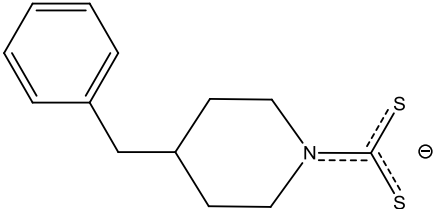
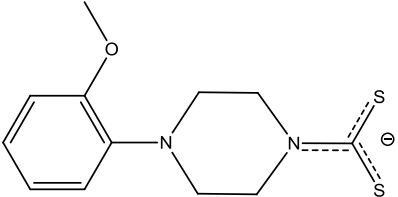
Sintesi, caratterizzazione e valutazione biologica di complessi di rame con leganti ditiocarbammici:

La sezione A di questo lavoro di tesi prevede innanzitutto la sintesi di un'ampia libreria di complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$, dove i leganti ditiocarbammici sono selezionati in modo tale da poter verificare l'eventuale esistenza di una relazione tra la loro struttura e l'attività biologica riscontrata. La sintesi dei complessi non radioattivi è resa necessaria anche per il successivo studio a livello di tracciante con ^{64}Cu dal momento che la manipolazione di radioattività consente di utilizzare solamente quantità estremamente basse di metallo (nell'ordine delle nanomoli) non compatibili con la tradizionale caratterizzazione chimico-fisica che deve essere perciò effettuata sugli analoghi complessi non radiomarcati.

I ditiocarbammati scelti sono stati suddivisi in due categorie principali, in base alla natura dei sostituenti all'azoto ditiocarbammico. Nei ditiocarbammati ciclici l'azoto è inserito all'interno di un eterociclo di dimensioni variabili mentre nei ditiocarbammati lineari l'azoto presenta due sostituenti alifatici

In Tabella 3 sono riportati i ditiocarbammati ciclici utilizzati in questo studio.

Struttura	Nome, denominazione	Sale, massa molecolare
	Pirrolidin-ditiocarbammato PDTC	Ammonio, 164.29
	Piperidin-ditiocarbammato, DTC-L2	Sodio, 183.27
	Morfolin-ditiocarbammato, DTC-L3	Sodio, 185.23
	4-etilpiperazin-ditiocarbammato, DTC-L4	Sodio, 212.31
	4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidin- ditiocarbammato DTC-L9	Sodio, 309.81
	2-carbossipirrolidin-ditiocarbammato, DTC-L10	Sodio, 212.57
	4-carbossipiperidin-ditiocarbammato, DTC-L13	Sodio, 249.25
	4-carbonil-piperidin- ditiocarbammato, DTC-L15	--, 174.26
	4-(carbossietil)piperidin ditiocarbammato, DTC-L16	4-carbossietilpiperidinio, 390.56
	1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]-decano-8- ditiocarbammato, DTC-L17	Sodio, 241.31

	3,5-dimetil-morfolin-ditiocarbammato, DTC-L19	Sodio, 213.29
	4-morfolinipiperidin-ditiocarbammato, DTC-L20	Sodio, 168.37
	Azepan-ditiocarbammato, DTC-L22	Sodio, 193.30
	Azocan-ditiocarbammato, DTC-L23	Sodio, 211.32
	4-N-4-metil-azepan-ditiocarbammato, DTC-L24	Sodio, 212.30
	4-benzil-piperidin-ditiocarbammato, DTC-L25	Sodio, 273.39
	4-(2-metossi)fenilpiperazin ditiocarbammato, PIPE-1	Sodio, 290.37

Tab. 3. Elenco dei ditiocarbammati ciclici utilizzati in questo studio.

Tra questi **PDTC** (pirrolidin-ditiocarbammato) è il più semplice della serie, disponibile commercialmente e utilizzato come riferimento per questa classe di composti.

DTC-L2 (piperidin-ditiocarbammato), **DTC-L22** (azepan-ditiocarbammato), **DTC-L23** (azocan-ditiocarbammato) sono gli omologhi superiori del PDTC, dove l'anello pirrolidinico viene sostituito rispettivamente da un anello a 6 (piperidina) a 7 (azepano), a 8 (azocano) atomi e sono stati scelti per

valutare se l'attività biologica è influenzata dalle dimensioni dell'anello. **DTC-L24** (4-N-4-metil-azepan-ditiocarbammato) presenta un anello a 7 atomi come DTC-L22 ma è caratterizzato dalla presenza di un ulteriore atomo di azoto in posizione 4 legato ad un gruppo metilico.

DTC-L3 (morfolin-ditiocarbammato) e **DTC-L19** (3,5-dimetil-ditiocarbammato) sono caratterizzati dalla presenza della morfolina, che si differenzia da la piperidina per la presenza di un ossigeno in posizione 4. In particolare DTC-L19 presenta anche dei gruppi metilici in orto in posizione meta rispetto all'azoto ditiocarbammico e questi due leganti sono stati scelti per verificare come la presenza di un ulteriore eteroatomo possa modificare il profilo di citotossicità.

DTC-L4 (4-etilpiperazil-ditiocarbammato) e **PIPE-1** (4-(2-metossi)fenilpiperazin-ditiocarbammato) sono derivati della piperazina ed in particolare PIPE-1 è un derivato 2-metossifenilpiperazinico che rappresenta una esempio di biomolecola attiva coniugata al metallo, dal momento che si tratta del gruppo farmacoforo di una serie di antagonisti dei recettori serotoninergici 5-HT_{1A}.

DTC-L9 (4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidin-ditiocarbammato), **DTC-L15** (4-carbonil-piperidin-ditiocarbammato), **DTC-L20** (4-morfolinipiperidin-ditiocarbammato), **DTC-L25** (4-benzil-piperidin-ditiocarbammato) sono derivati della piperidina analoghi a DTC-L2 e diversamente derivatizzati in posizione 4 all'anello piperidinico. **DTC-L16** (4-carbossietilpiperidin-ditiocarbammato) è anch'esso un derivato piperidinico, che presenta come sostituente in posizione 4 una funzione esterea che può essere coinvolta in fenomeni di idrolisi *in vivo* con conseguente intrappolamento in particolari distretti dell'organismo.

DTC-L10 (2-carbossipirrolidin-ditiocarbammato) e **DTC-L13** (4-carbossipiperidin-ditiocarbammato) sono rispettivamente un derivato pirrolidinico con un gruppo carbossilico in posizione orto e un derivato piperidinico con un gruppo carbossilico in posizione para. La funzione carbossilica in questo caso può essere facilmente sfruttata per la coniugazione di una molecola biologicamente attiva. Infine, **DTC-L17** (1,4-dioxa-8-azaspiro-[4,5]-decano-8-ditiocarbammato) è un derivato spiranico.

I ditiocarbammati lineari utilizzati sono riportati in Tabella 4.

Struttura	Nome, denominazione	Sale, massa molecolare
	Dietil-ditiocarbammato, DED	Ammonio, 166.31
	Dipropil-ditiocarbammato (DPDC)	Sodio, 199.31
	Bis(2-metossietil)-ditiocarbammato (DPODC)	--, 208.32
	N,N-etossietil-ditiocarbammato (DBODC)	--, 204.38
	N-metil-N-metossi-ditiocarbammato (NOMe)	--, 136.21
	N-etil-2-metossietan-ditiocarbammato (PoEt)	--, 178.30
	N-(2-metossietil)-2- propanditiocarbammato (IsoMe)	--, 192.32
	N-propil-N-metossietil-ditiocarbammato (POMe)	
	([bis(sarcosin-etilestere- ditiocarbammato)zinco(II)] [Zn(PR-13) ₂])	--, 449.92

Tab. 4. Elenco dei ditiocarbammati lineari utilizzati in questo studio.

DEDC (dietil-ditiocarbammato) è il legante più semplice della serie, già ampiamente descritto in letteratura, disponibile commercialmente e per questo motivo utilizzato come riferimento.

DPDC (dipropil-ditiocarbammato) è un legante simmetrico, omologo superiore di DEDC che permette di valutare come un aumento delle lunghezze della catena laterale influisca sulla sua stabilità e sull'attività di questa classe di composti.

Gli altri ditiocarbammati scelti presentano, invece, nella struttura uno o più atomi di ossigeno in catena laterale che potrebbe comportare una modifica delle caratteristiche finale del prodotto, in particolare per quanto riguarda le caratteristiche di solubilità e di lipofilia. Nello specifico, **NOMe** (N-metil-N-metossi-ditiocarbammato), **POEt** (N-etil-N-metossietil-ditiocarbammato), **ISOMe** (N-isopropil-N-metossietil-ditiocarbammato) e **POMe** (N-propil-N-metossietil-ditiocarbammato) sono molecole asimmetriche che contengono un solo atomo di ossigeno, a differenza di **DBODC** (N,N-metossietil-ditiocarbammato) e **DPODC** (N,N-etossietil-ditiocarbammato) che sono due leganti simmetrici contenenti quindi due ossigeni in catena laterale. Infine, **[Zn(PR13)₂]** ([bis(sarcosin-etilestere-ditiocarbammato)zinco(II)]) è un complesso di zinco utile per verificare la possibilità di ottenere complessi di rame con ditiocarbammati anche attraverso una reazione di transmetallazione oltre che per la stabilizzazione del legante libero asimmetrico PR-13, caratterizzato dalla presenza di un gruppo estereo che, analogamente a quanto detto per DTC-L16, può essere coinvolto in fenomeni di idrolisi *in vivo*.

La prima parte di lavoro sarà suddiviso quindi in diverse fasi:

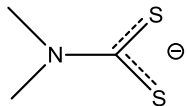
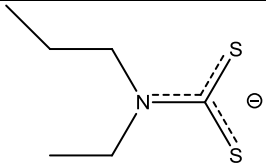
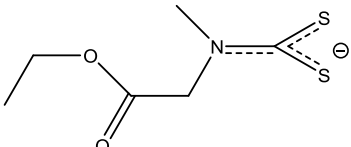
- Sintesi, attraverso diverse procedure, di una libreria di complessi del tipo [Cu(DTC-Ln)₂].
- Caratterizzazione chimico-fisica allo stato solido e in soluzione mediante l'uso di analisi elementare, tecniche spettroscopiche IR, UV-Vis e spettrometria di massa ESI(+).
- Valutazione dell'attività biologica dei composti ottenuti nei confronti di diverse linee cellulari tumorali con particolare attenzione all'azione nei confronti di cellule tumorali resistenti al cisplatino.
- Trasferimento della chimica di coordinazione a livello di tracciante con ⁶⁴Cu e valutazione dell'effetto del pH sulla resa radiochimica e dell'efficienza di marcatura.
- Studi di stabilità *in vitro* nei confronti di reazioni di transchelazione e di transmetallazione e in siero umano.
- Una serie di esperimenti di uptake dei complessi non radioattivi e degli analoghi radiomarcanti con ⁶⁴Cu in cellule di tumore alla mammella MCF-7 in diverse condizioni di temperatura e concentrazione allo scopo di approfondire i meccanismi di accumulo di questa classe di composti all'interno delle cellule tumorali.

Sintesi, caratterizzazione e valutazione biologica di nuovi complessi di gallio con leganti ditiocarbammici:

La sezione B di questo lavoro di tesi comprende la sintesi di un'ampia libreria di complessi del tipo $[Ga(DTC-Ln)_3]$, in modo analogo a quanto fatto per i complessi a base di rame, per valutare l'esistenza di una relazione tra la struttura del ditiocarbammato selezionato e l'attività citotossica. Inoltre, anche in questo caso, la sintesi dei complessi non radioattivi è indispensabile per il trasferimento della chimica di coordinazione a livello di tracciante con ^{68}Ga .

I ditiocarbammati scelti sono stati suddivisi in tre categorie principali, in base alla natura dei sostituenti all'azoto ditiocarbammico. Nei ditiocarbammati ciclici l'azoto è inserito all'interno di un eterociclo di dimensioni variabili, nei ditiocarbammati lineari l'azoto presenta due sostituenti alifatici, mentre nei ditiocarbammati derivati da ammine primarie l'azoto è associato ad unico sostituente, sia esso ciclico o lineare.

Tutti i ditiocarbammati ciclici utilizzati in questo studio sono già stati elencati nel paragrafo precedente mentre alcuni dei ditiocarbammati lineari scelti non sono ancora stati presentati e vengono riportati in Tabella 5.

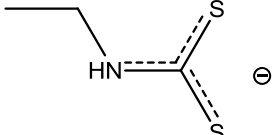
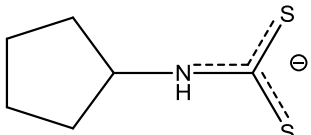
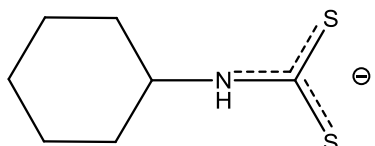
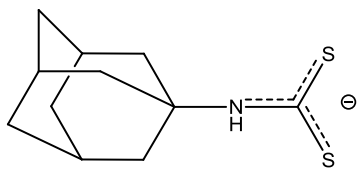
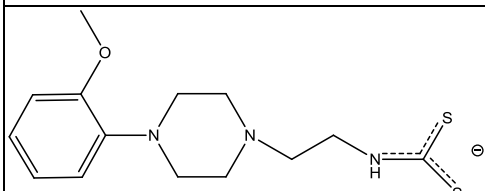
Struttura	Nome, denominazione	Sale, massa molecolare
	Dimetil-ditiocarbammato (DMDC)	Sodio · 1.8 H ₂ O, 175.64
	N-etil-propil-ditiocarbammato (PrEt)	--, 162.30
	Sarcosin-etilestere-ditiocarbammato (PR-13)	--, 192.27

Tab. 5. Elenco dei ditiocarbammati lineari utilizzati solamente per la sintesi di complessi di gallio.

In particolare **DMDC** (dimetil-ditiocarbammato) è il legante più semplici della serie, disponibili commercialmente e per questo motivo utilizzati come riferimento assieme a **DEDC**.

Pr-Et (N-etil-propil-ditiocarbammato) è un ditiocarbammato completamente alifatico come DPDC ma asimmetrico, e **PR-13** (sarcosin-etilestere-ditiocarbammato) è il legante già utilizzato sottoforma di complesso di zinco nella prima parte del lavoro, che in questo caso viene direttamente impiegato senza passare da una reazione di transmetallazione.

I ditiocarbammati derivati da ammina primaria utilizzati in questo studio sono riportati in Tabella 6.

Struttura	Nome, denominazione	Sale, Massa molecolare
	N-etil-ditiocarbammato, NHet	Sodio, 143.20
	Ciclopentil-ditiocarbammato, CyP	Sodio, 197.29
	Cicloesil-ditiocarbammato, CyH	Sodio, 183.29
	Adamantil-ditiocarbammato DTC-L8	Sodio, 249.37
	(2-(4-(2metossifenil)- piperazinil)etil- ditiocarbammato PIPE-2	Sodio, 393.44

Tab. 6. Elenco dei ditiocarbammati derivati da ammina primaria utilizzati in questo studio.

Questa categoria di leganti è stata scelta perchè permettono di coniugare direttamente al gruppo amminico primario di una biomolecola la funzione ditiocarbammica.

NHet (N-etil-ditiocarbammato) è il più semplice ditiocarbammato della serie e rappresenta il legante di riferimento per questa categoria. **CyP** (ciclopentil-ditiocarbammato) e **CyH** (cicloesil-ditiocarbammato) sono semplici derivati aliciclici, caratterizzati rispettivamente da un anello a 5 atomi e a 6 atomi di carbonio.

DTC-L8 (adamantil-ditiocarbammato) possiede la struttura dell'amminoadamantano, noto per la sua affinità con alcune strutture del sistema nervoso centrale, in particolare quelle coinvolte nel morbo di Parkinson.

Infine, **PIPE-2** ((2-(4-(2-metossifenil)piperazinil)etil)-ditiocarbammato) è un derivato 2-metossifenilpiperazinico analogo a PIPE-1 caratterizzato però da una catena alchilica di due atomi di carbonio posta come *spacer* tra il gruppo farmacoforico e la funzione ditiocarbammica.

Il programma di lavoro sarà suddiviso quindi in diverse fasi:

- Sintesi, attraverso diverse procedure di sintesi, di una libreria di complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$.
- Caratterizzazione chimico-fisica allo stato solido e in soluzione mediante l'uso di analisi elementare, tecniche spettroscopiche IR, NMR e diffrattometria a raggi X.
- Valutazione della resa di formazione del complesso di riferimento $[\text{Ga}(\text{DEDIC})_3]$ in funzione del pH allo scopo di un successivo trasferimento della chimica di coordinazione a livello di tracciante con ^{68}Ga .
- Valutazione dell'attività biologica dei composti ottenuti nei confronti di diverse linee cellulari tumorali.

SEZIONE A

***Sintesi e valutazione biologica di complessi di rame
con leganti ditiocarbammici***

A1 IL RAME IN MEDICINA NUCLEARE

A1.1 Isotopi radioattivi del rame

Il rame è un metallo di transizione appartenente al Gruppo 11, Periodo 4, della Tavola periodica. Il suo numero atomico è 29 e la sua configurazione elettronica $[Ar]3d^{10}4s^1$. Esistono due isotopi naturali e stabili del rame, ^{63}Cu e ^{65}Cu , la cui abbondanza relativa è rispettivamente del 69.17% e 30.83% e vi sono, inoltre, una serie di isotopi sintetici radioattivi che possono essere prodotti attraverso un reattore o un ciclotrone⁽⁶³⁾. Un elenco dei radioisotopi del rame con le loro caratteristiche nucleari è riportato in Figura A1.

Isotope	$t_{1/2}$	β^- MeV (%)	β^+ MeV (%)	EC (%)	γ MeV (%)
^{60}Cu	23.4 minutes	—	2.00 (69)	7.0	0.511 (186)
			3.00 (18)		0.85 (15)
			3.92 (6)		1.33 (80)
					1.76 (52)
^{61}Cu	3.32 hours	—	1.22 (60%)	40	2.13 (6)
					0.284 (12)
					0.38 (3)
^{62}Cu	9.76 minutes	—	2.91 (97%)	2	0.511 (194)
^{64}Cu	12.7 hours	0.573 (38.4)	0.655 (17.8%)	43.8	0.511 (35.6)
^{67}Cu	62.0 hours	0.395 (45)	—	—	0.184 (40)
		0.484 (35)			
		0.577 (20)			

Fig. A1. Radioisotopi del rame con possibilità di impiego in Medicina Nucleare

Tra questi, i due isotopi a lunga emivita ^{64}Cu e ^{67}Cu hanno suscitato molto interesse per la loro possibile applicazione in Medicina Nucleare come agenti diagnostici e terapeutici oltre a costituire una interessante coppia di radionuclidi teranostici.

^{67}Cu ha un tempo di dimezzamento di 62 ore particolarmente appropriato per l'*imaging* di agenti con farmacocinetiche *in vivo* lente quali gli anticorpi monoclonali o altre molecole biologiche. L'emissione di elettroni (β^-) ha un'energia pari a 121 KeV utile nella radioterapia mirata di piccoli tumori delle dimensioni di 2-3 millimetri. La componente di emissione γ , invece, può essere sfruttata per tecniche di imaging di tipo SPET (tomografia ad emissione di fotone singolo). In particolare può essere indagato l'*uptake* e la biodistribuzione della biomolecola attiva somministrata durante la terapia.

Per la produzione di ^{67}Cu l'approccio migliore è considerato il bombardamento protonico di ^{68}Zn arricchito ma la mancanza di ciclotroni in grado di produrre protoni a così alta energia (45-67 MeV) ha comportato che la produzione di ^{67}Cu sia tutt'ora piuttosto scarsa⁽⁶⁴⁾.

Lo sviluppo e la ricerca di radiofarmaci marcati con ^{67}Cu soffre della scarsa disponibilità e difficoltà di approvvigionamento del radionuclide oltre al fatto che comunque le rese di produzione non sono elevate e il prodotto presenta sempre una certa quota di inquinamento di altri radionuclidi (^{64}Cu , ^{62}Zn , ^{65}Zn , ^{67}Ga).

^{64}Cu è un radionuclide che presenta un tempo di dimezzamento di 12.7 h, decade emettendo positroni (β^+) la cui massima energia è di 0.66 MeV ed elettroni (β^-) di energia massima pari a 0.573 MeV. Grazie a queste particolari caratteristiche nucleari il ^{64}Cu è ideale per lo sviluppo di nuovi radiofarmaci utili nella diagnostica per immagini di tipo PET e in terapia. Tale tecnica si basa, infatti, sul rilevamento di due fotoni γ di energia pari a 0.511 MeV che vengono generati dall'annichilazione tra un positrone emesso da un nucleo radioattivo e un elettrone della materia.

Un tempo di emivita di 12.7 h permette di distribuire radiofarmaci marcati con ^{64}Cu ad una certa distanza dal centro di produzione e l'indagine diagnostica può essere condotta fino alle 48 ore successive alla somministrazione del tracciante. La massima energia di emissione dei positroni (0.66 MeV) è paragonabile a quella del radionuclide ^{18}F , garantendo così delle immagini di elevata qualità, in modo del tutto analogo a quanto avviene con ^{18}F -FDG, il radiofarmaco attualmente più utilizzato nella diagnostica di tipo PET. Radionuclidi che emettono positroni ad energia più elevate determinano invece una cattiva risoluzione dell'immagine (^{11}C 0.96 e ^{124}I 1.55 MeV). Infine, la componente di emissione β^- può suggerire una possibile applicazione del ^{64}Cu a livello terapeutico anche se, allo stesso tempo, determina un ulteriore carico di radiazioni per il paziente quando il nuclide è usato solamente a scopi diagnostici.

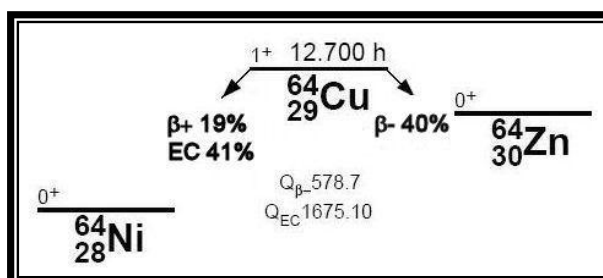


Fig. A2. I decadimenti del radionuclide ^{64}Cu

Il fatto che ^{64}Cu sia un radionuclide caratterizzato da una significativa emissione di positroni ed elettroni consente di ipotizzare un potenziale approccio di tipo teranostico per composti radiomarcanti con questo isotopo. Infatti, la componente di emissione di positroni può essere sfruttata in ambito diagnostico mentre l'emissione di elettroni può allo stesso tempo essere utilizzata per il trattamento terapeutico della stessa patologia. In questo modo sarebbe possibile pianificare con buona affidabilità il trattamento terapeutico per ciascun paziente e monitorarne gli effetti in modo costante.

A1.2 Produzione di ^{64}Cu

L'isotopo radioattivo ^{64}Cu può essere prodotto sia attraverso l'utilizzo di un reattore che con un acceleratore di particelle, ovvero un ciclotrone. Normalmente la produzione di radionuclidi all'interno di un reattore avviene attraverso l'impiego di reazioni neutroniche a bassa energia e di un materiale bersaglio costituito dallo stesso elemento del radionuclide prodotto. La produzione di ^{64}Cu in reattore avviene invece per mezzo della reazione nucleare $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$ dove, per ottenere elevate attività specifiche di ^{64}Cu sono utilizzati neutroni ad alta energia per il bombardamento di un target di zinco naturale. Questo tipo di reazione provoca però la formazione di prodotti secondari tra i quali lo ^{65}Zn con $t_{1/2} = 245$ giorni limita fortemente la possibilità di utilizzare questo metodo di produzione⁽⁶⁵⁾.

La produzione di ^{64}Cu può essere ottenuta in modo molto più conveniente attraverso una reazione $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ in ciclotroni biomedicali e attualmente è proprio questa la modalità di produzione più comune⁽⁶⁶⁾. Un ciclotrone è uno strumento utilizzato per accelerare delle particelle elettricamente cariche in traiettoria circolare grazie all'applicazione di una differenza di potenziale tra due elettrodi e nel caso specifico viene sfruttato per accelerare un fascio di protoni che viene poi indirizzato ad un target specifico. La reazione prevede, infatti, il bombardamento protonico di un target arricchito di ^{64}Ni elettrodeposato in un disco di oro o rodio (Figura A3) e ha una resa elevata (2.3–5.0mCi/h). Il target viene poi sciolto a caldo con una soluzione di HCl 6M e il ^{64}Cu , ottenuto dopo purificazione con una colonna a scambio ionico (Figura A3) è caratterizzato da una elevata attività specifica. Sono infatti riportate sintesi di ^{64}Cu con ciclotroni da 12 MeV con una purezza radionuclidica superiore al 99%.

Grazie a questa efficace tecnica di produzione l'uso di questo radionuclide è potuto aumentare considerevolmente negli ultimi anni e la sua produzione è ormai un fatto consolidato.

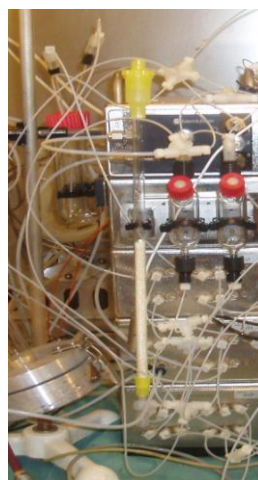


Fig. A3. Un target di oro con ^{64}Ni elettrodeposato e il modulo di purificazione con la colonna a scambio ionico.

A1.3 Sistemi chelanti per ^{64}Cu

La chimica del rame è dominata dai suoi stati di ossidazione più comuni, Cu(I) e Cu(II), mentre Cu(III) sussiste solo con leganti aventi come set di atomi coordinanti forti π -donatori.

Cu(I) ha configurazione elettronica $[\text{Ar}]3d^{10}$, è perciò diamagnetico e predilige leganti aventi gruppi donatori "soft" quali tioeteri, fosfine, alcheni, nitrili, isonitrili, cianuri, ioduri, tiolati... I complessi di coordinazione che si ottengono sono incolore e presentano numero di coordinazione 2 (geometria lineare), 3 (geometria planare trigonale) o 4 (geometria tetraedrica) a seconda principalmente dell'ingombro sterico e da esigenze conformazionali dei leganti. Cu(I) può formare anche una varietà di specie polinucleari mediante leganti a ponte.

La flessibilità stereochimica di Cu(I) rende piuttosto labili i legami coordinativi e il cambio di leganti è solitamente molto rapido a meno che non vi siano fattori sterici di impedimento. Complessi di Cu(I) con leganti monodentati hanno perciò una stabilità cinetica insufficiente per trovare applicazione come radiofarmaci.

Cu(II) ha configurazione elettronica $[\text{Ar}]3d^9$, è perciò paramagnetico e i complessi presentano preferenzialmente numero di coordinazione 4 a geometria planare quadrata o tetraedrica.

Complessi di Cu (II) sono più inerti alla sostituzione rispetto a quelli di Cu (I) a causa di un maggior effetto di stabilizzazione via campo dei leganti dovuto all'orbitale d insaturo, e per questo motivo essi presentano le caratteristiche adeguate per poter essere utilizzati nelle applicazioni radiofarmaceutiche. La scelta dei chelanti nella formazione di complessi cineticamente stabili rimane comunque molto importante.

Cu(II) è solitamente disponibile come sale cloruro CuCl_2 e nella maggior parte dei casi è sufficiente la semplice aggiunta dei leganti ad un opportuno pH a temperatura ambiente per ottenere il complesso voluto.

In particolare, l'utilizzo di leganti bifunzionali in grado di coordinare il radionuclide permette di sviluppare sistemi di *imaging target* specifico dal momento che questa tipologia di leganti possiede da un lato la capacità di coordinare il metallo radioattivo e dall'altro di legare covalentemente una molecola biologicamente attiva in grado di riconoscere in modo specifico determinate strutture recettoriali e quindi di veicolare il complesso in determinati distretti dell'organismo. Nella scelta dei leganti bifunzionali ha grande importanza la stabilità termodinamica dei complessi metallici risultanti che può essere valutata attraverso i valori della costante di associazione, espressa come $\log K$. Di sicura rilevanza è anche la velocità di complessazione dal momento che il radioisotopo continua a decadere durante tutte le fasi di preparazione e somministrazione. Ma soprattutto, la cinetica di dissociazione deve essere invece preferibilmente lenta dal momento che i sistemi biologici sono caratterizzati dalla presenza di una serie di agenti coordinanti e ioni metallici che possono partecipare a rispettivamente a reazioni di transchelazione e transmetallazione che, modificando le caratteristiche del radio complesso, potrebbero impedire che la

sonda radioattiva si localizzi a livello del tessuto bersaglio. Il legante deve essere inoltre caratterizzato da una elevata attività specifica, ovvero dalla capacità di formare il radio complesso anche se presenti in quantità estremamente ridotte. Infatti, l'utilizzo di un eccesso di legante comporta che le molecole bioattive ad esso legate competano con la sonda radioattiva nella localizzazione a livello dei recettori limitandone l'attività come agente diagnostico. Infine, è fondamentale che la reazione di marcatura avvenga in condizioni blande di pH e temperatura in modo tale che la delicata struttura chimica delle molecole biologiche non venga alterata e che quindi non sia più in grado di agire come sistema target specifico.

Riassumendo, le caratteristiche generali di un legante bi funzionale per l'imaging target specifico con ^{64}Cu sono⁽⁶⁴⁾:

- Coordinazione del metallo in modo veloce, quantitativo e a basse concentrazioni (10^{-6} , 10^{-9} M)
- Legame preferenziale a ^{64}Cu anche in presenza di altri metalli contaminanti
- Formazione di un numero discreto di complessi in modo tale da prevenire lunghe procedure di purificazione
- Coordinazione a ^{64}Cu in un *range* di pH tra 4 e 9
- Coordinazione a basse temperature (20-37°C)
- Stabilità nei confronti di reazioni di transchelazione con leganti fisiologici
- Stabilità nei confronti di reazioni di transmetallazione con ioni metallici in vivo quali Cu^{2+} e Zn^{2+}

Sulla base di queste considerazioni i chelanti maggiormente utilizzati per la coordinazione di ^{64}Cu con molecole biologicamente attive sono leganti di tipo tetra-azamacrociclico che sfruttano la loro struttura macrociclica e l'effetto chelante per aumentare la stabilità dei prodotti e che sono caratterizzati dalla presenza di catene laterali variamente funzionalizzate per la derivatizzazione con molecole *target* specifiche. In quest'ambito la classe di leganti più utilizzata è stata quella dei macrocicli poliamminocarbossilati ed, in particolare, il DOTA e il TETA, rappresentati in Figura A4. Ma mentre nel caso del DOTA la sua capacità di legare anche altri metalli di transizione e d un profilo di stabilità non particolarmente elevato lo hanno reso meno interessante^(67, 68), il legante TETA è stato invece diffusamente utilizzato come chelante del ^{64}Cu ^(69,70). Ad ogni modo, nonostante i complessi Cu-TETA si siano rivelati più stabili degli analoghi con il DOTA e dei complessi di rame con leganti aciclici, la loro instabilità in vivo è stata ampiamente documentata. Ad esempio il complesso Cu-TETA-octreotide iniettato in ratti sani Sprague-Dowley subisce reazioni di transchelazione per circa il 70% dopo circa 20 ore dall'iniezione⁽⁷¹⁾.

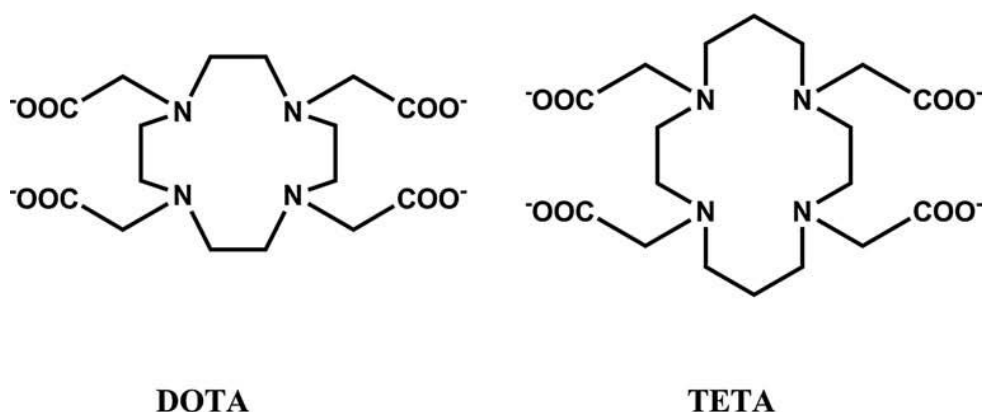


Fig. A4. I leganti tetraazamacrociclici DOTA e TETA

Un'altra classe di leganti che ha meritato attenzione come potenziali agenti chelanti per il ^{64}Cu sono gli esa-azamacrociclici, ovvero dei leganti a gabbia che fanno riferimento alla struttura del sepolcrato o della sarcofagina (Sar)⁽⁷²⁾. Entrambi questi sistemi sono sintetizzati attraverso la reazione di un complesso inerte di cobalto(III) e tris-etilendiamina con formalaldeide, derivata da una reazione con ammoniaca o nitro metano in condizioni basiche per generare rispettivamente i derivati del sepolcrato e della sarcofagina. Una serie di derivati della sarcofagina, riportati in Figura A5, con i diversi gruppi funzionali apicali come il legante SarAr sono stati sfruttati per determinare la velocità di complessazione con ^{64}Cu a pH compresi tra 4 e 9. I dati ottenuti indicano che la complessazione è quantitativa in pochi minuti, a temperature ambiente, a tutti i valori di pH testati. Dati di biodistribuzione sono stati ottenuti con i complessi Cu-Sar, Cu-diamSar e Cu-SarAr, in topi sani e immunosoppressi. Tutti e tre i composti vengono eliminati velocemente a livello sanguigno e presentano uno scarso uptake in diversi organi tra cui le ossa, il cuore, lo stomaco, la milza, i muscoli, i polmoni e il tratto gastrointestinale. L'escrezione epatica è buona a conferma del fatto che complessi di questo tipo sono stabili in vivo anche se l'escrezione a livello renale è decisamente più lenta⁽⁷³⁾.

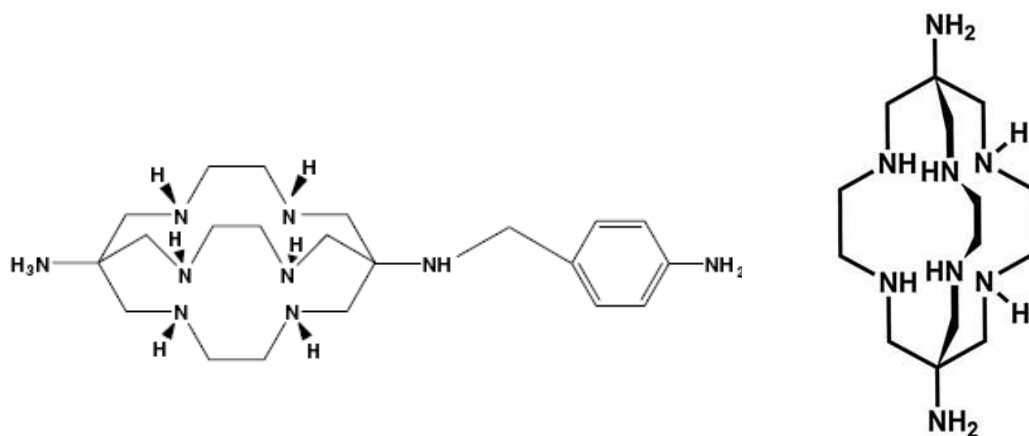


Fig. A5. I derivati della sarcofagina, SarAr e diamSar.

Un'altra interessante classe di leganti è rappresentata da tetra-ammine macrocicliche "cross-bridged", inizialmente sviluppate per complessare cationi metallici all'interno della loro cavità a forma di conchiglia⁽⁷⁴⁾. Numerosi complessi di rame con questo tipo di leganti sono stati preparati e in tutti i casi è stata verificata la prevista geometria di coordinazione *cis*. L'aggiunta di due catene laterali carbossimetiliche ai leganti di riferimento CB-cyclam e CB-cyclen consentono di ottenere rispettivamente i leganti CB-TE2A e CB-DO2A per lo sviluppo di complessi esacoordinati con ⁶⁴Cu^(75, 76). La serie dei leganti di tipo "cross-bridged" è riportata in Figura A6.

Mentre la misura delle costanti di stabilità evidenzia dei valori destralmente simili a quelli riscontrati per gli stessi leganti privi di legame a ponte, questa classe di composti si è dimostrata particolarmente interessante a causa di una elevata inerzia cinetica specialmente in soluzione acquosa.

A questo proposito è sufficiente sottolineare che in CB-cyclam e CB-TE2A la stabilità in condizione acide drastiche (5M HCl) è aumentata di circa 1 e 4 ordini di grandezza rispettivamente e, in particolare il complesso ⁶⁴Cu-TE2A è stabile alla degradazione in ambiente acido ancor più dei complessi derivati dalla sarcofagina⁽⁷⁷⁾.

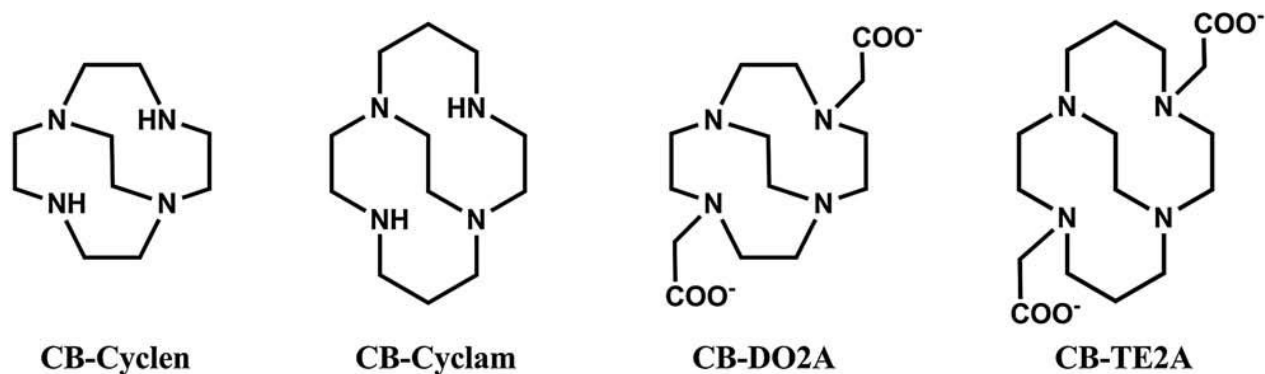


Fig. A6. I leganti tetra-ammino macrociclici "cross-bridged".

Pure gli studi di biodistribuzione hanno evidenziato risultati piuttosto incoraggianti per il complesso ⁶⁴Cu-TE2A che è caratterizzato da una rapida clearance epatica e renale e da una incidenza molto bassa di reazioni di transchelazione con proteine sieriche ed epatiche⁽⁷⁸⁾.

Infine, allo scopo di individuare agenti chelanti in grado di complessare il Cu(II) con una cinetica migliore mantenendo le stesse caratteristiche di stabilità sono stati studiate delle catene laterali con gruppi donatori di tipo fosfonico (Figura A7) in quanto è già noto che leganti di questo tipo hanno una maggiore selettività per il rame oltre ad una aumentata stabilità cinetica e termodinamica rispetto agli analoghi derivati dell'acido acetico⁽⁷⁹⁾. I leganti CB-TE2P e CB-TE1A1P sono quindi stati sintetizzati e marcati con ⁶⁴Cu per verificarne il loro comportamento in vivo. Mentre nel primo caso la complessazione quantitativa del ⁶⁴Cu richiede condizioni di temperatura elevata, per il legante CB-TE1A1P la resa di marcatura è quantitativa dopo un'ora di incubazione a 37°C. Anche studi preliminari hanno dimostrato profili di biodistribuzione

migliori per il complesso Cu-CB-TE1A1P rispetto all'analogo con CB-TE2A⁽⁸⁰⁾. Infine, è stato sintetizzato anche un chelante analogo monofosfonato "side-bridged", SB-TE1A1P. La biodistribuzione in topi sani del relativo complesso di ⁶⁴Cu, pur richiedendo condizioni di marcatura caratterizzate da una temperatura di 95°C, evidenzia che il radio complesso viene escreto rapidamente dal sangue e dagli altri tessuti suggerendo quindi una elevata stabilità in vivo simile a quella descritta per i sistemi chelanti "cross bridged"⁽⁸¹⁾.

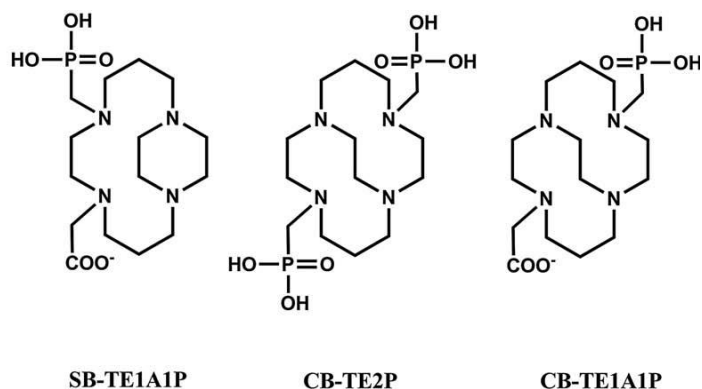


Fig. A7. I leganti tetra-ammino macrociclici con gruppi fosfonici.

Marcatatura con ⁶⁴Cu di molecole biologicamente attive:

La somatostatina è un peptide di 14 aminoacidi coinvolto nella regolazione e nel rilascio di diversi ormoni e i suoi recettori sono presenti in diversi organi tra cui il sistema nervoso centrale, il tratto gastrointestinale e il pancreas. Diversi tumori del sistema neuroendocrino, alla mammella e ai polmoni sono caratterizzati dall'espressione sulla superficie delle cellule tumorali di recettori della somatostatina. Per questo peptide analoghi della somatostatina sono stati coniugati a diversi sistemi chelanti e marcati con ⁶⁴Cu ed in particolare gli studi si sono concentrati sull'octreotide, un analogo di 8 aminoacidi, che ha dimostrato di avere una emivita biologica più lunga e di essere più efficace della somatostatina stessa nella soppressione della secrezione dell'ormone della crescita negli animali⁽⁸²⁾. Octreotide è quindi stato coniugato al legante bifunzionale TETA e il relativo complesso radiomarcato con ⁶⁴Cu è stato utilizzato per uno studio comparato con l'Octreoscan, un analogo agente per l'*imaging* di tipo SPECT a base di ¹¹¹In approvato per l'uso clinico come agente diagnostico in tumori neuroendocrini. Il complesso di rame ha determinato una maggiore sensibilità nell'*imaging* di tessuti tumorali neuroendocrini probabilmente anche a causa della tecnica diagnostica PET utilizzata⁽⁸³⁾.

Un analogo di seconda generazione della somatostatina, Y3-TATE, caratterizzato dalla sostituzione di una fenilalanina con una tirosina e dalla presenza della treonina C-terminale in forma protonato aveva già dimostrato di essere in grado di migliorare il targeting verso tessuti ricchi di recettori per la somatostatina⁽⁸⁴⁾. Il peptide è stato coniugato con TETA e con CB-TE2A ed in particolare in quest'ultimo caso il relativo complesso di ⁶⁴Cu ha dimostrato una maggiore affinità per cellule di tumore al pancreas di tipo AR42J esprimenti recettori per la somatostatina e un minor accumulo sia epatico che renale rispetto

all'analogo complesso con il legante TETA⁽⁸⁵⁾. I leganti e i peptidi analoghi della somatostatina utilizzati in questi studi sono riassunti in Figura A8.

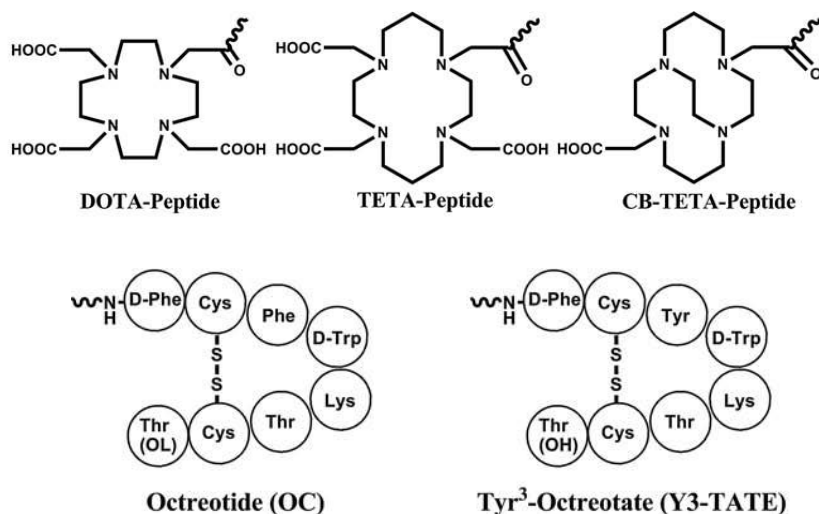


Fig. A8. Gli analoghi della somatostatina e la loro derivatizzazione con i chelanti per il ⁶⁴Cu

Le integrine sono delle proteine transmembrana che regolano interazioni tra cellule e matrice extracellulare e che hanno un ruolo molto importante nei processi di angiogenesi e di metastasi tumorale⁽⁸⁶⁾. Tra le 24 diverse integrine identificate, l'integrina α v β 3 è una delle più studiate dal momento che è fortemente espressa in cellule endoteliali coinvolte in meccanismi di angiogenesi ma non in cellule endoteliali quiescenti ed è quindi un valido biomarker dell'angiogenesi e per l'imaging tumorale⁽⁸⁷⁾. In particolare l'integrina α v β 3 si lega alle proteine extracellulari attraverso una specifica sequenza aminoacidica costituita dai residui di arginina (R), glicina (G) e acido aspartico (D)⁽⁸⁸⁾. Di conseguenza sono stati progettati e studiati una serie di peptidi RGD per la marcatura con ⁶⁴Cu e lo sviluppo di nuovi sistemi di imaging target specifico⁽⁸⁹⁾, di cui un esempio è riportato in Figura A9.

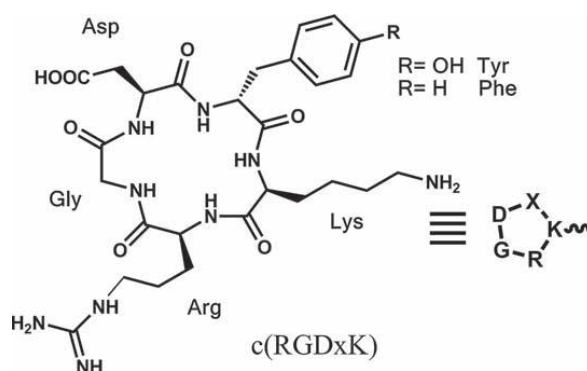


Fig. A9. Il peptide RGD utilizzato come biomarker per l'angiogenesi e l'imaging tumorale.

Il derivato DOTA-RGD marcato con ^{64}Cu ha dimostrato un *uptake* non particolarmente elevato in tumori alla mammella (1.44%) con significativa ritenzione epatica e renale⁽⁹⁰⁾. Per migliorare le caratteristiche di *uptake* si sono sviluppati derivati dimerici che hanno effettivamente determinato un aumentato accumulo a livello tumorale anche se la localizzazione a livello renale rimane troppo elevata per proporre ulteriori studi clinici. In questi complessi dimerici è stata valutata anche l'effetto di *linker* quali il tripeptide glicina, studiati in modo tale da permettere il legame simultaneo di due sequenze RGD a due strutture recettoriali con conseguenti benefici nei profili di *uptake* tumorale⁽⁹¹⁾.

Recentemente, un peptide RGD ciclico è stato coniugato anche al legante CB-TE2A e il relativo complesso di ^{64}Cu ha evidenziato un *uptake* selettivo a livello degli osteoclasti sovra espressi in lesioni osteolitiche e in metastasi ossee, aprendo quindi la possibilità di una ulteriore applicazione nell'ambito delle osteoartriti, osteoporosi e dell'*imaging* di metastasi ossee⁽⁹²⁾.

I recettori di membrana per il fattore di crescita epidermoide (EGF) sono un altro dei principali target tumorali dal momento che l'attivazione di queste strutture recettoriali contribuisce a diversi meccanismi utili nella proliferazione tumorale e la loro espressione è aumentata in tumori alla mammella, alla prostata e nel carcinoma testa-collo⁽⁹³⁾. Negli ultimi anni sono stati progettati una serie di anticorpi monoclonali in grado di impedire il legame dell'EGF ai propri recettori e tra questi, Cetuximab, è stato approvato dall'FDA per il trattamento di pazienti con carcinomi colon-rettali metastatici⁽⁹⁴⁾. Cetuximab è stato quindi impiegato nella coniugazione con il legante bifunzionale DOTA e per la successiva marcatura con ^{64}Cu ⁽⁹⁵⁾.

In topi portatori di adenocarcinoma a cellule squamose della cervice uterina A431 la costante di associazione del complesso ai recettori per EGF è analoga a quella dell'anticorpo non complessato evidenziando come questo sistema può essere un valido marker tumorale sfruttabile nella pianificazione di terapie paziente-specifiche e per il monitoraggio del trattamento terapeutico (Figura A10)

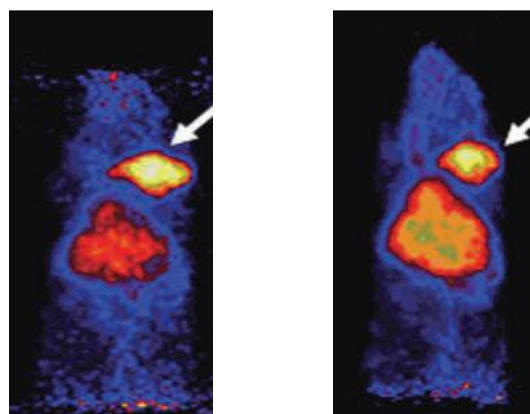


Fig. A10. Immagini PET ottenute con Cu(DOTA-Cetuximab) dopo 20 e 46 ore dall'iniezione in topi con adenocarcinoma A431.

Il chelante bifunzionale SarAr è stato invece impiegato per la coniugazione con l'anticorpo anti GD-2 in grado di riconoscere disialogangliosidi iperespressi nel melanoma e nel neuroblastoma⁽⁹⁶⁾. Studi *in vivo*

evidenziano valori di *uptake* tumorale tra il 15 e il 20% dopo 24 ore dall'iniezione associati a livelli di accumulo epatico decisamente bassi. Questi risultati uniti al fatto che la reazione di marcatura avviene in condizioni piuttosto blande rende questo sistema particolarmente interessante per lo sviluppo di agenti in grado di veicolare anticorpi monoclonali target specifici.

Anche le nanotecnologie negli ultimi anni sono state sfruttate in ambito biomedico per lo sviluppo nuovi agenti terapeutici e diagnostici.

Diversi sistemi nano particellari sono stati impiegati in test diagnostici, come agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare, come agenti di visualizzazione in chirurgia e anche come agenti terapeutici. Anche nell'ambito della medicina nucleare le nano particelle sono state coniugate a leganti bi funzionali dal momento che la loro elevata area superficiale consente di veicolare un numero elevato di radionuclidi per ciascuna particella con possibili vantaggi per l'affinità e l'attività specifica del sistema ^(97, 98).

I sistemi più interessanti sono ottenuti con nano particelle di ossido di ferro ricoperte di acido poliaspartico e funzionalizzate con 35 sequenze aminoacidi che RGD e 30 leganti bifunzionali DOTA⁽⁹⁹⁾ (Figura A11). In cellule tumorali di glioblastoma U87MG questi sistemi determinano un interessante *uptake* tumorale anche se l'accumulo a livello epatico non è trascurabile ed è probabilmente dovuto alla elevata dimensione idrodinamica della nano particelle (45 nm). Per superare questo tipo di problema sono stati sviluppati nanotubi in carbonio (Figura A11) a singola parete e l'addotto derivato marcato ⁶⁴Cu effettivamente evidenzia minori livelli di accumulo epatico associati ad elevati livelli di *uptake* tumorale⁽¹⁰⁰⁾.

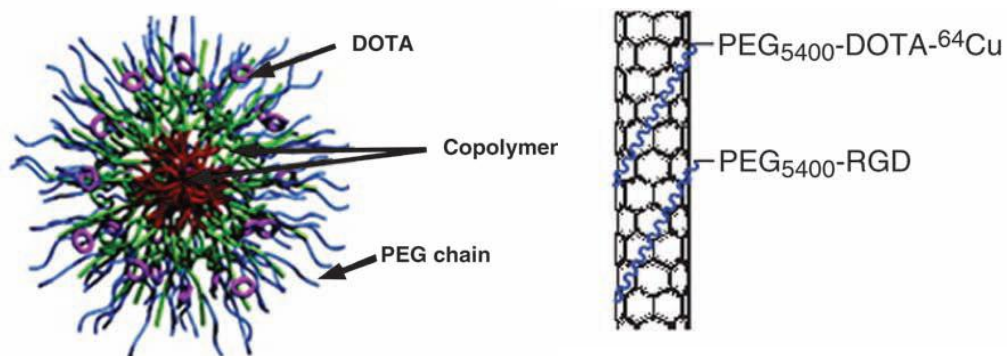


Fig. A11. Nanoparticelle funzionalizzate con leganti DOTA e nano tubi in carbonio a singola parete.

A1.4 [$^{64}\text{Cu}(\text{ATSM})$] per l'*imaging* di tessuti tumorali ipossici

Esiste una classe di radiofarmaci a base di ^{64}Cu in cui la stabilità dei complessi non è essenziale per la loro azione. Si tratta dei complessi con leganti tiosemicarbazoni, studiati come agenti di perfusione e per l'*imaging* di tessuti tumorali ipossici. I tiosemicarbazoni sono dei leganti tetradentati in grado di coordinare il centro metallico (Cu^{2+}) attraverso due atomi di azoto neutro e due atomi di zolfo negativo dando origine a complessi neutri di $\text{Cu}(\text{II})$. È noto infatti che l'ipossia è un fattore importante che può determinare un aumento dell'aggressività tumorale e l'attivazione di fattori di trascrizione che consentono la migrazione cellulare e la formazione di metastasi. Quindi, la possibilità di localizzare e quantificare i livelli di ipossia in tumori solidi attraverso l'impiego di tecniche di *imaging* non invasive può facilitare la diagnosi precoce e la scelta del trattamento terapeutico per il singolo paziente⁽¹⁰¹⁾.

A questo proposito sono stati testati una serie di complessi di rame con leganti tiosemicarbazoni variamente sostituiti a livello dell'azoto terminale e dello scheletro dichetonico⁽¹⁰²⁾. La selettività per l'ipossia di questi composti è stata misurata attraverso l'utilizzo di una sospensione cellulare di cellule di tumore alla mammella equilibrate in un ambiente ipossico o normossico per un'ora. I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che la selettività d'azione dipende dal potenziale redox del complesso che a sua volta è influenzato dal numero di gruppi alchilici presenti a livello dello scheletro dichetonico. Inoltre, il complesso deve essere caratterizzato da un certo grado di lipofilità che consenta il superamento della membrana fosfolipidica e l'internalizzazione cellulare. Tra tutti, il complesso $[\text{Cu}(\text{ATSM})]$ ottenuto con il legante tetradentato diaceti-2,3-bis(N4-metil-3-tiosemicarbazone), la cui struttura è riportata in Figura A12, si è dimostrato quello con la maggior selettività per le cellule ipossiche. Il suo basso peso molecolare, la lipofilità e planarità consentono, infatti, una rapida diffusione nelle cellule e il basso potenziale redox è responsabile dell'accumulo all'interno delle cellule ipossiche.

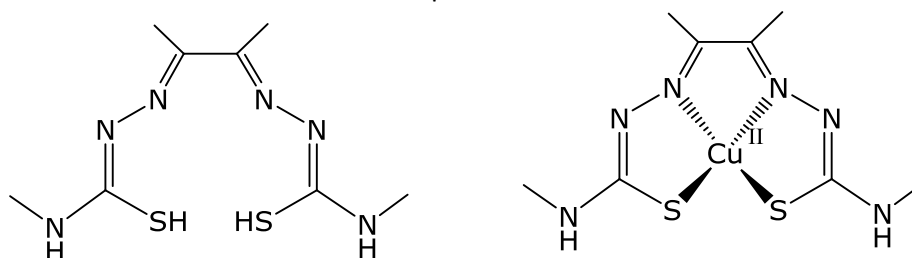


Fig. A12. Il legante $\text{H}_2\text{-ATSM}$ e il complesso $[\text{Cu-ATSM}]$

Una volta che il complesso Cu-ATSM si trova all'interno della cellula diversi ma in realtà analoghi meccanismi sono stati proposti per l'accumulo del rame come marcatore dell'ipossia cellulare. Il primo prevede la riduzione selettiva del rame nelle cellule ipossiche in modo tale che il complesso, assumendo una carica negativa, venga intrappolato irreversibilmente all'interno delle cellule⁽¹⁰³⁾. Il secondo meccanismo propone invece che la riduzione avvenga in tutte le cellule indipendentemente ma che poi,

soltanto nelle cellule sane in cui i livelli di ossigeno non sono diminuiti avvenga un processo di riossidazione grazie al quale il complesso è in grado di riattraversare la membrana cellulare. Nelle cellule ipossiche, invece, i bassi livelli di ossigeno non consentono la riossidazione, il complesso va incontro a reazioni di dissociazione e il rame viene così intrappolato in modo irreversibile⁽¹⁰⁴⁾.

L'efflusso del rame dalle cellule tumorali è dipendente dai livelli di espressione dei trasportatori deputati a a questo scopo, ATP7A e ATP7B. La variazione nell'espressione di queste proteine di trasporto può spiegare i diversi valori di uptake tumorale riscontrati per Cu-ATSM in diverse linee cellulari e perché la validità di questo composto come marcatore dell'ipossia è strettamente dipendente dal tipo di tumore che viene analizzato. Da un punto di vista clinico, il complesso [⁶⁴Cu-ATSM] è l'unico composto marcato con ⁶⁴Cu attualmente in sperimentazione clinica dal momento che presenta diversi vantaggi rispetto ad altri agenti attualmente in uso per la diagnosi dell'ipossia⁽¹⁰⁵⁾:

- metodo di sintesi piuttosto semplice
- rapidità di *clearance* dai tessuti non ipossici che consente di velocizzare i tempi tra l'iniezione del radiofarmaco e l'esecuzione dell'esame diagnostico
- metodo semplice di quantificazione

In particolare [⁶⁴Cu(ATSM)₂] è preparato aggiungendo ad una soluzione ⁶⁴Cu²⁺ in 0.1 M HCl 4 mL di una soluzione di Glicina 0.2 M. A questa soluzione sono aggiunti 200 µg di H₂-ATSM in 0.2 mL di DMSO. La soluzione è lasciata reagire a temperatura ambiente per pochi secondi. La purezza radiochimica, determinata per via cromatografica, è superiore al 99%⁽¹⁰⁶⁾. Il prodotto viene iniettato per l'esame diagnostico senza ulteriori manipolazioni. È stato sviluppato anche un kit liofilizzato (Figura A13) che permette la sintesi istantanea del complesso con una purezza radiochimica superiore al 95% semplicemente mescolando una soluzione di ⁶⁴Cu²⁺ con la soluzione ricostituita del kit. Non è richiesta alcuna ulteriore purificazione e una volta terminata la preparazione il prodotto rimane stabile in soluzione per almeno 4 ore. Il kit viene ricostituito con una soluzione 25 mM acetato di sodio/100 mM NaCl prima dell'aggiunta di ⁶⁴Cu in 0.1 M HCl.

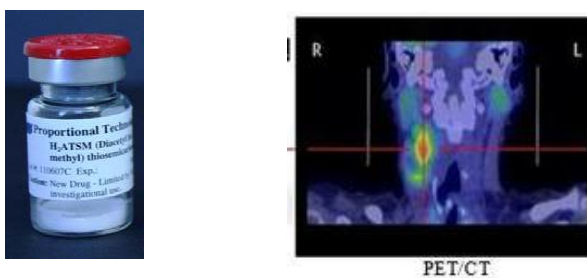


Fig. A13. Il kit liofilizzato per la sintesi di [⁶⁴Cu(ATSM)] e una immagine PET ottenuta con questo prodotto.

A2 IL RAME NELLA TERAPIA ANTITUMORALE

A2.1 Biochimica del rame

Il rame è un oligoelemento essenziale per molti organismi viventi, impiegato come cofattore strutturale e catalitico coinvolto in molte funzioni biologiche⁽¹⁰⁷⁾. Per questo motivo grande attenzione è stata posta nella comprensione dei meccanismi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione di questo metallo all'interno dell'organismo.

La concentrazione di rame nel corpo umano è finemente regolata dal momento che gli ioni liberi di rame sono potenzialmente tossici⁽¹⁰⁸⁾. Una volta assorbito a livello dello stomaco e dell'intestino tenue, la distribuzione del rame è regolata a livello circolatorio da due importanti proteine, la ceruloplasmina e l'albumina, responsabili del trasporto del rame a tutti i distretti dell'organismo. A questo punto sofisticati meccanismi di trasporto controllano il superamento delle membrane cellulari e la localizzazione nei diversi distretti cellulari (Figura A14). Tra questi la proteina trasportatore del rame (hCTR1) è deputata all'internalizzazione e i trasportatori ATP7A e ATP7B la cui modificazione genetica causa patologie correlate ad una alterazione della concentrazione di rame nell'organismo. Tutte queste proteine sono caratterizzate dalla presenza di diversi residui amminoacidici in grado di coordinare il rame quali la metionina, la cisteina e l'istidina.

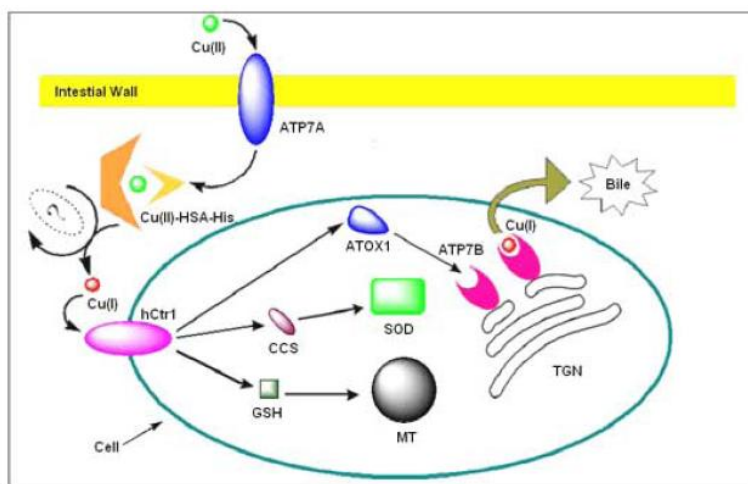


Fig. A14. L'omeostasi del rame.

Alterati livelli di rame nell'organismo sono spesso correlati a situazione patologiche connesse al mancato funzionamento di una delle proteine trasportatrici. La sindrome di Menkes è caratterizzata da una deficienza di rame dovuta a una serie di mutazioni a livello del gene che codifica per il trasportatore ATP7A mentre la sindrome di Wilson è caratterizzata da uno stato in cui si verifica un accumulo di rame dovuto a

un difetto nella localizzazione del gene che codifica per il trasportatore ATP7B. Inoltre, sovraccarichi di rame sono associati anche a diverse patologie neurodegenerative, all'artrite reumatoide, al diabete, all'epilessia e al cancro. Infatti, in numerosi tessuti tumorali la concentrazione di rame è decisamente superiore a quella fisiologica ed inoltre nel siero di pazienti affetti da tumore alla mammella i livelli di rame possono raggiungere 1.67 µg/mL, ovvero un valore decisamente superiore a quanto riscontrato nei pazienti sani (0.98 µg/mL)⁽¹⁰⁹⁾. I meccanismi molecolari dettagliati che sottendono a queste elevate concentrazioni di rame associate alla presenza di tumori non sono stati completamente chiariti. Ad ogni modo il rame sembra essere fortemente coinvolto nel processo di angiogenesi che consente l'accrescimento della massa tumorale e la formazione di metastasi diffuse⁽¹¹⁰⁾. L'angiogenesi consiste in un insieme di processi che promuovono la formazione di nuovi vasi sanguigni in risposta alle aumentate esigenze delle cellule tumorali che sono in rapida espansione. È stato dimostrato che il rame è un cofattore determinante a livello dell'angiogenesi in quanto stimola la produzione di citochine, la degradazione della matrice extracellulare, la proliferazione di cellule endoteliali e la loro migrazione mediata dalle integrine e dall'angiogenina. Ad esempio, infatti, l'affinità dell'angiogenina per le cellule endoteliali è fortemente aumentata in presenza di ioni rame⁽¹¹¹⁾.

Inoltre, è stato dimostrato che la metallo proteina a base di rame azzurina è in grado di entrare preferenzialmente nelle cellule tumorali piuttosto che nelle cellule sane e di formare al loro interno un complesso con un soppressore tumorale quale la proteina p53, stabilizzandola e aumentandone il livello intracellulare che, a seconda del tipo di cellula tumorale coinvolta, può indurre apoptosi o un arresto del ciclo cellulare in fase G1⁽¹¹²⁾.

Sulla base di queste considerazioni sono state proposte diverse strategie per lo sviluppo di nuovi agenti ad attività antitumorale che potessero agire in modo specifico sfruttando gli elevati livelli di rame riscontrati. Il controllo del processo angiogenetico, della crescita tumorale e delle metastasi può, infatti, essere effettuato sequestrando l'eccesso di rame presente. Per fare questo, sono state sintetizzate e strutturalmente modificate piccole molecole con capacità di legare il rame. Esempi sono la trientina e la D-penicilamina (Figura A15), che hanno dimostrato di avere la capacità di determinare una significativa inibizione della crescita tumorale associata alla soppressione dell'angiogenesi in topi con epatocarcinoma⁽¹¹³⁾. Analogamente un'altra molecola, il tetratiomolibdato la cui struttura è mostrata in Figura A15, ha evidenziato incoraggianti effetti antiangiogenetici e antitumorali in modelli animali con carcinoma a cellule squamose ed è quindi stata selezionata per la sperimentazione clinica nell'uomo⁽¹¹⁴⁾. Nonostante la potenziale attività nei confronti di alcune tipologie di tumore di queste classi di molecole, l'uso clinico di agenti chelanti del rame è stato ristretto a pazienti affetti da avvelenamento da metalli pesanti o da patologie connesse a forme di accumulo di metalli quali la sindrome di Wilson.

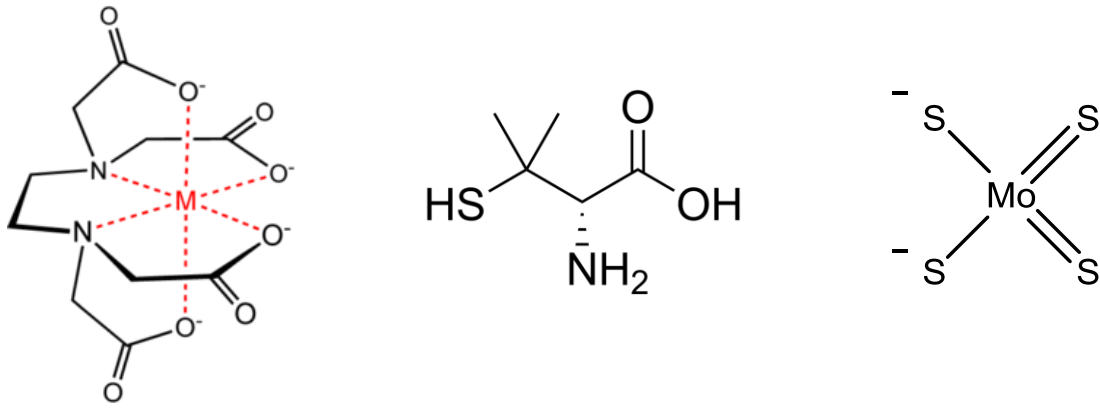


Fig. A15. Gli agenti chelanti trientina, D-penicillamina e tetratiomolibdato.

A2.2 Complessi di rame in terapia

Oltre che attraverso una terapia chelante, le cellule tumorali caratterizzate da una elevata concentrazione di rame possono diventare un target selettivo per agenti antitumorali a base di questo metallo. Inoltre, il rame è un oligoelemento essenziale⁽⁹⁾ per l'organismo e i suoi complessi potrebbero, quindi, essere ritenuti meno tossici rispetto a quelli di altri metalli quali il platino. Un altro aspetto molto importante è dovuto al fatto che composti di questo tipo potrebbero esplicare la loro attività con un meccanismo differente da quello del cis-platino e per questo motivo potrebbero avere uno spettro d'azione più ampio e risultare efficaci in tumori insensibili o resistenti ai farmaci convenzionali a base di platino.

Per il successo di questo approccio basato sull'utilizzo di complessi rame come agenti antitumorali la struttura chimica e il set di atomi donatori del legante sono di cruciale importanza dal momento che possono modulare le proprietà *hard/soft* del metallo, le caratteristiche di lipofilità e di solubilità del complesso risultante come anche la sua capacità di attraversare il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare.

Un altro fondamentale aspetto da tenere in considerazione è la stabilità dei prodotti nei confronti di reazioni di transchelazione con molecole fisiologiche poiché processi di questo tipo, alterando la struttura chimica del complesso di rame, potrebbero precludere il *targeting* a livello della massa tumorale.

Complessi con atomi donatori di zolfo:

I tiosemicarbazoni (TSC), noti per la loro attività come agenti antivirali, antifungini e antibatterici, sono coinvolti in un equilibrio tautomerico, riportato in Figura A16, tale per cui sono in grado di coordinare il centro metallico sia come tioni che in forma anionica. Tra i tiosemicarbazoni che agiscono nei confronti del rame come leganti bidentati attraverso un atomo di zolfo e uno di azoto, il 2-idrossi-8-propil-triciclo-[7.3.1.0]-tridecano-13-one-TSC (Figura A17) forma un complesso di rame che è stato testato in vitro e ha dimostrato un'attività antiproliferativa interessante con valori di IC₅₀ compresi tra 1 e 10 µM⁽¹¹⁵⁾. Questo composto, come del resto tutti i complessi di questa classe, agiscono come efficienti nucleasi chimiche associate alla formazione di specie reattive dell'ossigeno come l'acqua ossigenata.

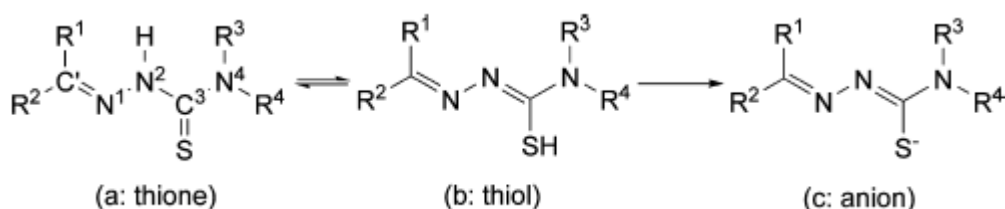


Fig. A16. L'equilibrio tautomerico dei tiosemicarbazoni.

Altri tiosemicarbazoni sono caratterizzati dalla presenza di sostituenti all'azoto imminico che consente loro di comportarsi come leganti tridentati. Tra questi attualmente i più promettenti dal punto di vista

terapeutico sono la triapina (3-aminopiridina-2-carbossialdeide TSC, Figura A17) e il di-2-piridinilchetone-4,4-dimetil-3-TSC. Studi sull'attività biologica di questi complessi hanno dimostrato che il ciclo ossidoriduttivo Cu(I)/Cu(II) svolge un ruolo molto importante a supporto dell'ipotesi che siano i complessi di rame piuttosto che il legante libero i reali responsabili dell'attività biologica riscontrata⁽¹¹⁶⁾.

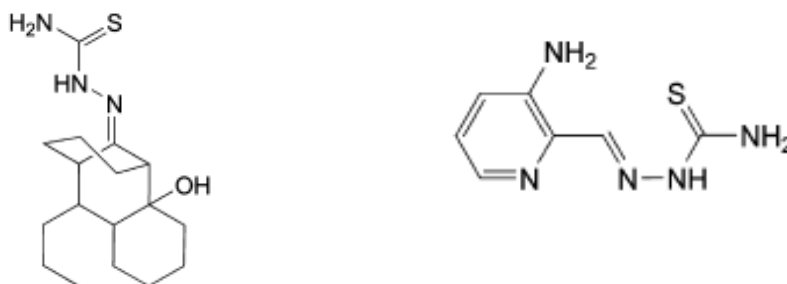


Fig. A17. TSC bidentati, il derivato triciclico e la triapina.

Altri tiosemicarbazoni agiscono invece come leganti tridentati e sono in grado di complessare ioni rame attraverso un atomo di azoto, uno di zolfo e uno di ossigeno, dove quest'ultimo tipicamente viene fornito da una specie di comprovata rilevanza biologica quale la salicilaldeide, l'1,2-naftochinone, il formiluracile o il piridossale. In particolare per i derivati del 5-formiluracile si ottengono complessi neutri e pentacoordinati a partire da rame cloruro (Figura A18), e complessi esacoordinati monocationici a partire da rame nitrato⁽¹¹⁷⁾. La variazione dei sostituenti alla funzione TSC essenzialmente non influenza la geometria di coordinazione mentre causa una significativa variazione nell'interazione a livello del DNA e nell'attività nucleasica. Infine, sono stati sintetizzati anche due derivati potenzialmente tetradentati che agiscono attraverso due atomi di azoto, uno di zolfo e uno di ossigeno per formare complessi neutri di rame. Tali composti inibiscono la proliferazione di cellule di neuroblastoma resistenti al cis-platino, arrestano il ciclo cellulare in fase S e causano apoptosi con aumentata espressione della proteina p53. Il complesso, la cui struttura è riportata in Figura A18, è caratterizzato dalla presenza di sostituente ammino terminale e mostra un'attività antitumorale ancora superiore⁽¹¹⁸⁾.

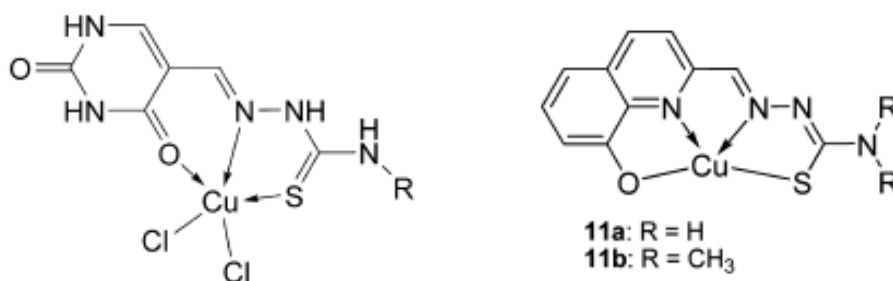


Fig. A18. Complessi di rame con TSC tridentati derivati del 5-formiluracile e tetradentati.

Complessi con atomi donatori di ossigeno:

Ammine eterocicliche e piridine N-ossido appartengono ad una classe di composti organici applicabili in campo medico per la loro attività antitumorale. Per questo motivo complessi mononucleari con leganti monodentati di questo tipo sono stati isolati a partire da rame nitrato. Si tratta in particolare di specie tetra o penta coordinate (Figura A19) la cui citotossicità è stata testata nei confronti di cellule di tumore alla mammella, SW707 e P-388. Tutti i complessi sono decisamente attivi e in tutti i casi la complessazione con il rame aumenta in modo evidente l'attività rispetto al legante libero⁽¹¹⁹⁾.

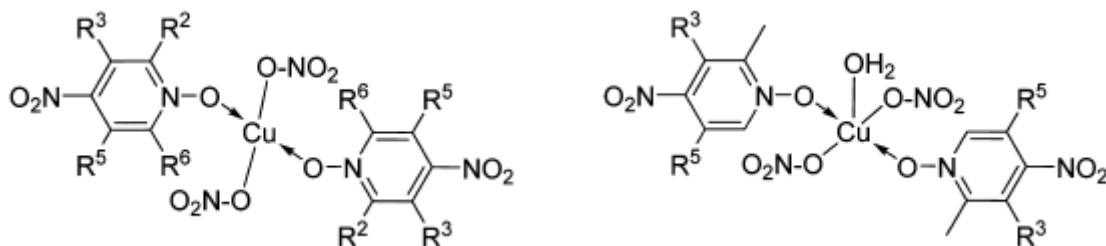


Fig. A19. I complessi tetra e pentacoordinati di rame con leganti piridine N-ossido.

Gli isoflavoni appartengono alla classe dei flavonoidi, molecole in grado esercitare una serie di attività biologiche ed anche una azione antitumorale. Si tratta inoltre di leganti bidentati che possono coordinare diversi metalli di transizione attraverso due atomi di ossigeno. Complessi di questo tipo mostrano una capacità superiore di legare il DNA e di esercitare attività citotossica rispetto all'isoflavone libero⁽¹²⁰⁾. Composti con altri flavonoidi quali l'esperetina, la narigenina e la quercetina (Figura A20) hanno evidenziato una buona attività antitumorale in cellule di tumore al fegato, allo stomaco e ai polmoni esplicita attraverso un danno di tipo ossidativo e una interazione specifica a livello del DNA^(121, 122).

Anche composti ad attività antibatterica come i fluorochinoloni possono agire come leganti bidentati che coordinano il metallo attraverso l'ossigeno chetonico e l'ossigeno carbossilato. Complessi neutri di rame di questo tipo, la cui struttura è riportata in Figura A20, hanno mostrato una elevata capacità di intercalazione nel DNA e di determinare una attività antiproliferativa *in vitro* nei confronti di cellule A549 con IC₅₀ pari a 5.4 µg/mL⁽¹²³⁾.

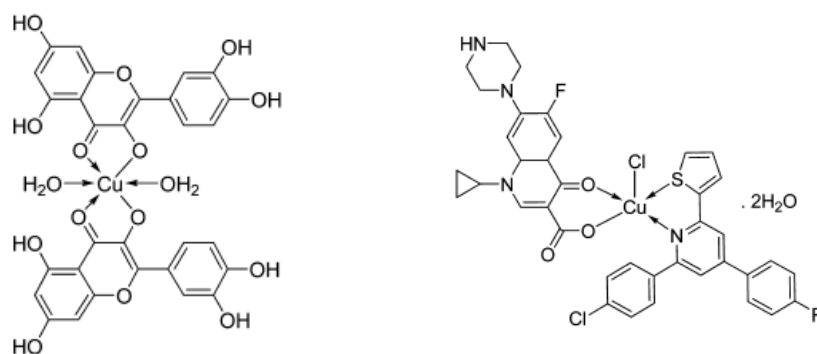


Fig. A20. Complessi di rame con la quercetina e con la ciprofloxacina.

Complessi con atomi donatori di azoto:

Leganti polidentati a base di azoto derivati del pirazolo con gruppi funzionali di natura organica a livello del carbonio a ponte hanno suscitato considerevole attenzione e la loro chimica di coordinazione con metalli di transizione è stata ampiamente studiata. In particolare due derivati eteroscorpionati di questo tipo, riportati in Figura A21, sono stati testati *in vitro* contro cellule di adenocarcinoma polmonare e di tumore al fegato mostrando una buona attività citotossica con valori di IC_{50} compresi tra 10 e 25 μM , mediata dalla capacità di intercalazione a livello delle basi azotate del DNA⁽¹²⁴⁾.

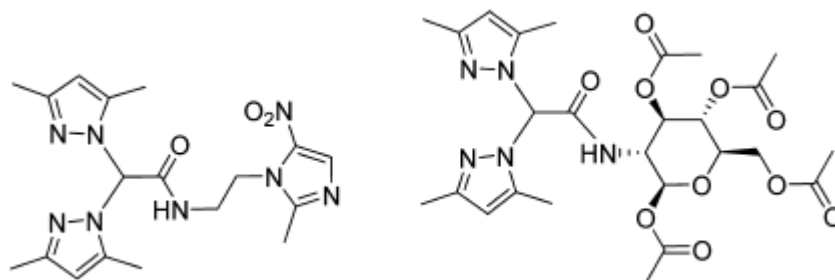


Fig. A20. I leganti derivati dal pirazolo.

Una serie di complessi di Cu(II) con leganti bis(2-metilbenzimidazoli) polidentati sono stati preparati e completamente caratterizzati. Tutti i leganti agiscono come donatori tridentati verso gli ioni rame attraverso il gruppo amminico centrale e gli atomi di azoto del benzimidazolo. In molti di questi complessi una molecola d'acqua e un gruppo perclorato definiscono una geometria ottaedrica distorta mentre in altri casi i complessi presentano geometria piramidale quadrata. L'attività antiproliferativa del primo complesso riportato in Figura A22 è tra tutte quella inferiore indicando che un sostituito ulteriore a livello dell'azoto centrale è necessario per determinare l'attività citotossica. Gli altri due complessi la cui struttura è mostrata in Figura A22 hanno un significativo effetto inibitorio su cellule leucemiche anche in virtù di una bassa tossicità evidenziata nei confronti di cellule sane di midollo osseo⁽¹²⁵⁾.

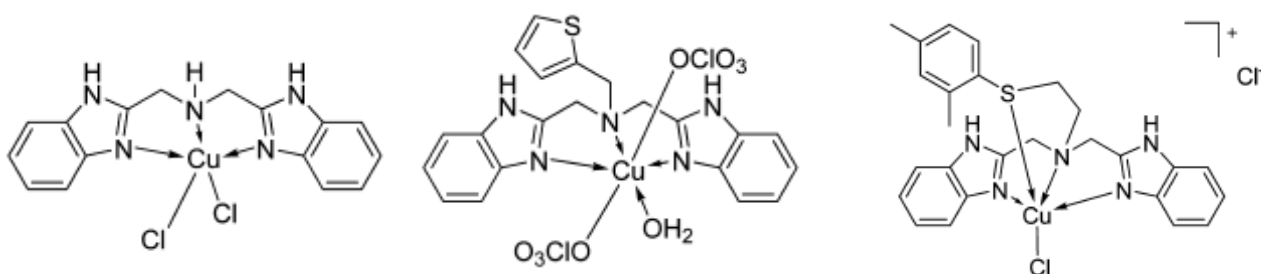


Fig. A22. I complessi di rame con leganti benzimidazolici tridentati.

Complessi con basi di Schiff:

Tra i leganti maggiormente studiati per la loro capacità di complessare il rame vi sono sicuramente le basi di Schiff che a seconda del tipo di sostituenti presenti possono coordinare il centro metallico in modo diverso. Tra i leganti imminici bidentati che complessano il rame attraverso due atomi di azoto, i composti riportati in Figura A23 hanno dimostrato una elevata capacità di agire come cationi lipofili in grado di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno a livello mitocondriale. Questo causa disfunzioni mitocondriali e una diminuzione dell'ATP che portano a fenomeni di apoptosi mediati da una chinasi adenosina monofosfato dipendente⁽¹²⁶⁾.

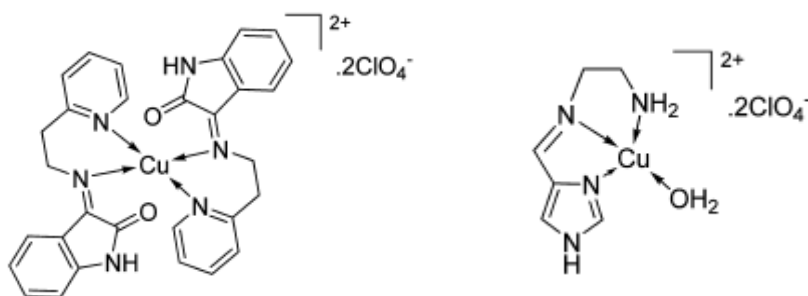


Fig. A23. Complessi di rame con basi di Schiff bidentate.

Complessi quadrato planari di Cu(II) sono stati ottenuti con basi di Schiff tridentate caratterizzate dalla presenza di anelli fenolici o piridinici e che sono in grado di coordinare il centro metallico attraverso due atomi donatori di azoto e uno di ossigeno. Essi sono in grado di agire a livello del DNA ed, in particolare, il complesso, la cui struttura è mostrata in Figura A24, ha dimostrato elevata attività antiproliferativa in cellule di carcinoma ovarico sensibili al cis-platino e anche in cellule analoghe cis-platino resistenti. In tutti i casi i valori di IC₅₀ piuttosto bassi confermano il fatto che questa classe di composti è in grado di superare la resistenza indotta dal cis-platino⁽¹²⁷⁾.

Il complesso [Cu(L70)(OAc)(H₂O)]·2H₂O presenta una geometria piramidale quadrata caratterizzata dalla presenza di una molecola d'acqua in posizione apicale, tre delle posizioni della base occupate dal legante tridentato e l'ultima da un atomo di ossigeno di un gruppo acetato (Figura A24) e ha dimostrato una discreta capacità di intercalazione nel DNA anche se la rottura ossidativa di quest'ultimo è piuttosto dovuta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno. Il composto inibisce la crescita di cellule di tumore alla cervice uterina con blocco del ciclo cellulare in fase S che innesca un meccanismo di morte cellulare di tipo apoptotico⁽¹²⁸⁾.

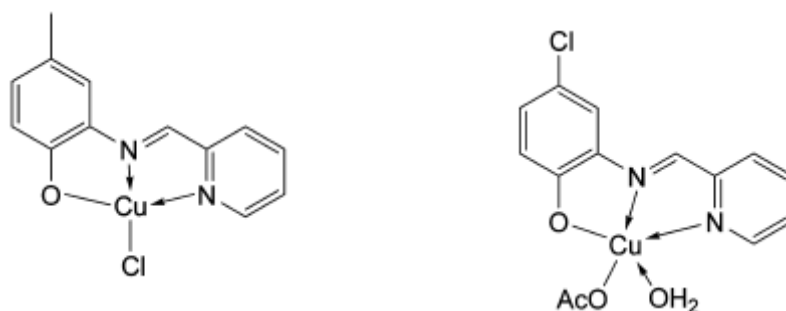


Fig. A24. Complessi di rame con basi di Schiff tridentate con un anello fenolico e uno piridinico.

Basi di Schiff tetradentate sono state invece ottenute dalla condensazione di 2-[N-alfa-picolil]-amino]benzofenone con diversi aminoacidi ed agiscono come leganti tetra dentati. I saggi di citotossicità indicano che la presenza di sostituenti a livello degli anelli aromatici influenzano fortemente l'attività biologica. In particolare, il complesso riportato in Figura A25 mostra la più alta citotossicità in cellule di adenocarcinoma di tumore al colon e al fegato. In generale tutti questi complessi sono più attivi della molecola riferimento, 5-fluorouracile, e agiscono attraverso meccanismi d'azione in grado di superare fenomeni di resistenza⁽¹²⁹⁾.

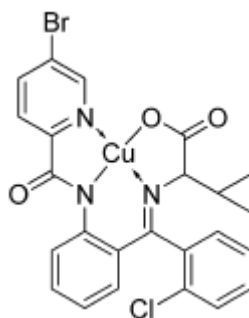


Fig. A25. Complesso di rame con una base di Schiff tetradentata.

Complessi con leganti di tipo dimminico:

Tra I leganti di natura dimminica sono state valutate le proprietà antiproliferative di una classe di complessi cationici con leganti misti detti "casiopeinas" e aventi formula generale $[Cu(N-N)(\alpha\text{-L-aminoacidato})]NO_3$ dove un legante è una diammina aromatica sostituita e un altro legante è un acetilacetato o un aminoacido^(130, 131), come evidenziato in Figura A26. Studi di relazione struttura-attività indicano che i composti più attivi sono le specie ossidanti più deboli che necessitano della presenza di un anello aromatico centrale mentre la natura del secondo legante ha scarsa influenza sull'attività biologica.

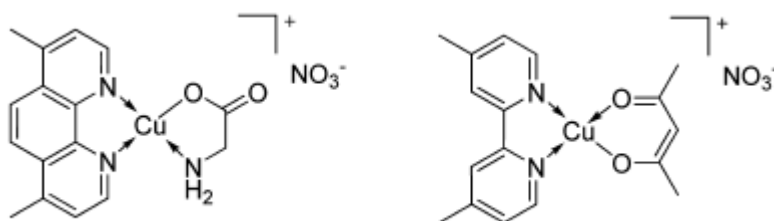


Fig. A26. I “casiopieinas” con un legante dimminico e una glicina o un acetilacetionato.

Infine, tra le diverse classi di complessi contenenti diimine bidentate e tridentate testate per la loro attività biologica, le terpiridine rappresentano una interessante classe di leganti tridentati (Figura A27). La presenza di due leganti di questo tipo determina la formazione di complessi a geometria ottaedrica che evidenziano la capacità di legare il DNA e una significativa attività antiproliferativa nei confronti di diverse linee cellulari tumorali con valori di IC₅₀ compresi tra 0.7 e 6.3 μM⁽¹³²⁾.

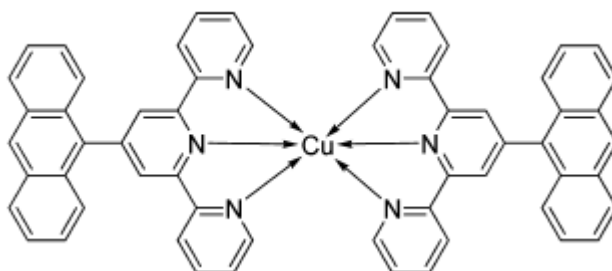


Fig. A27. Complesso ottaedrico di rame con due terpiridine tridentate.

Complessi con atomi donatori di fosforo:

La caratteristica distintiva di tutti i complessi caratterizzati dalla presenza di leganti di natura fosfinica è lo stato di ossidazione +1 del centro metallico che è tipicamente inserito in un sistema a geometria tetraedrica. Nonostante Cu(I) sia lo ione che viene effettivamente internalizzato mediante hCTR1 nelle cellule a livello fisiologico, ancora pochi studi riguardano complessi di Cu(I) come agenti antitumorali. Ciò è correlato alla difficoltà di stabilizzare i composti di questo tipo specialmente in soluzione acquosa. Solo la formazione di forti interazioni metallo-legante come quelle che avvengono nel caso di leganti fosfinici impediscono l'idrolisi e l'attivazione del sistema ossido-riduttivo.

Tra i complessi di rame con fosfine due diverse sfere di coordinazione sono state studiate in dettaglio, ovvero la specie monocationica [Cu(P)₄]⁺ e il sistema neutro e asimmetrico [Cu(N-N)(P)(X)] dove è presente un fosfina monodentata, una diammina aromatica e un alogenuro.

Diversi complessi del tipo [Cu(P)₄]⁺ sono stati preparati con fosfine idrofiliche quali la tris(idrossimetil)fosfina (Figura A28), la tris(idrossipropil)fosfina e 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano⁽¹³³⁾. Il composto più promettente della serie è stato testato *in vitro* ed ha dimostrato una elevata attività

citotossica, circa un ordine di grandezza superiore rispetto al cis-platino in particolare nei confronti di cellule di carcinoma al colon in differenti stadi di progressione dove è in grado anche di superare la resistenza indotta dal cis-platino.

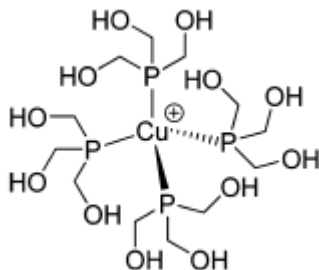


Fig. A28. Il complesso di Cu(I) con tri(idrossimetil)fosfina.

Nonostante il gran numero di composti che hanno dimostrato una significativa attività citotossica, solo in pochi casi si è cercato di correlare l'attività antitumorale riscontrata in vitro con le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti utilizzati in modo tale da approfondire il ruolo del metallo e del legante nel meccanismo d'azione. Perciò, un *design* razionale di complessi di rame ad azione antitumorale è ancora un obiettivo lontano vista anche l'assenza di un reale *lead compound* al quale fare riferimento.

In generale i complessi tetra e pentacoordinati appaiono più citotossici dei complessi esacoordinati e spesso i composti più attivi sono caratterizzati dalla presenza di uno o più gruppi labili nella sfera di coordinazione. Di conseguenza i complessi devono essere sufficientemente stabili da veicolare il metallo a livello delle cellule tumorali senza interagire con i diversi agenti fisiologici ma deve anche essere sufficientemente labile da permettere al metallo di agire una volta raggiunto il substrato bersaglio.

A2.3 Meccanismo d'azione

Una grande varietà di composti a base di rame ha quindi dimostrato di possedere un spettro d'azione più ampio e minore tossicità rispetto ai composti a base di platino suggerendo anche che possano superare la resistenza congenita o acquisita al cis-platino. Tutti questi aspetti sono in accordo con l'ipotesi che i complessi di rame abbiano meccanismi d'azione differenti rispetto al legame covalente al DNA tipico dei composti del platino. Al momento non sono disponibili molte informazioni circa le modalità d'azione di questi prodotti e la maggior parte degli studi si sono comunque concentrati sulla capacità di interazione dei composti a base di rame con il DNA. Ad ogni modo, anche altri componenti cellulari come le topoisomerasi e il proteasoma stanno emergendo come potenziali siti di azione.

Interazione con il DNA:

Da molti anni è nota l'affinità del rame per il DNA⁽¹³⁴⁾ e, analogamente a quanto verificato per il cis-platino, è stata ottenuta anche una struttura cristallografica che descrive la formazione di un addotto tra CuCl_2 e il DNA. Questa capacità di legarsi dipende dalle dimensioni del complesso, dall'affinità elettronica e dalla geometria dell'addotto finale che deve determinare una modifica irreversibile nella conformazione del DNA. Per alcune classi di composti a base di rame è stata descritta e ampiamente documentata questa abilità di legare il DNA attraverso la formazione di interazioni non covalenti piuttosto che veri e propri addotti di natura covalente. In quest'ambito particolare attenzione è stata posta su complessi di rame con atomi donatori di azoto quali leganti di tipo dimminico, descritti nel capitolo precedente, che hanno dimostrato una elevata capacità di interagire con il DNA correlata ad una interessante attività antitumorale⁽¹³⁵⁾.

In generale è stato dimostrato che le caratteristiche chimico-fisiche quali la planarità, l'idrofobicità e le dimensioni della dimmina, come la geometria di coordinazione hanno un ruolo decisamente importante nel determinare la modalità di legame del complesso al DNA. In generale leganti dimminici planari e non sostituiti possono interagire intercalandosi nel DNA e una estesa coniugazione promuove una maggiore inserzione all'interno della doppia elica mentre la presenza di anelli aromatici eterociclici non planari indebolisce drasticamente la capacità di intercalazione.

Un'altra classe di composti a base di rame che agiscono a livello del DNA è definita delle "nucleasi chimiche" che operano mediante ossidazione delle basi nucleotidiche, idrolisi dei legami fosfoesterei e ossidazione dello zucchero desossiribosio e conseguente degradazione della catena polinucleotodica^(136, 137). La risposta cellulare in seguito al danno comprende l'attivazione di diversi meccanismi di riparazione che nel momento in cui falliscono conducono alla morte cellulare per apoptosi.

Inibizione delle topoisomerasi:

Recenti studi circa l'abilità dei complessi di rame di inibire le topoisomerasi hanno permesso di rafforzare il potenziale di questa classe di composti come agenti antitumorali ma anche di ampliare il numero di potenziali target biochimici coinvolti. Le topoisomerasi sono importanti enzimi nucleari che regolano il grado di superavvolgimento della doppia elica del DNA e perciò svolgono un ruolo fondamentale nei processi di replicazione e trascrizione. In particolare le topoisomerasi creano scissioni transienti nel singolo (Topoisomerasi I) o nel doppio filamento di DNA (Topoisomerasi II) permettendo la conversione tra i diversi isomeri topologici⁽¹³⁸⁾. Le topoisomerasi nucleari sono state quindi identificate come importanti bersagli nella chemioterapia antitumorale e la loro inibizione è una componente fondamentale di diversi regimi terapeutici. Le molecole in grado di agire a questo livello sono divise in veleni e inibitori catalitici dal momento che i veleni sono in grado di stabilizzare in modo irreversibile il complesso covalente tra la topoisomerasi e il DNA mentre gli inibitori catalitici agiscono senza determinare un blocco irreversibile.

Nonostante ci sia un interesse crescente nello sviluppo di nuove molecole che agiscano su questi bersagli nucleari, l'interazione di complessi a base di rame con le topoisomerasi è un ambito di ricerca relativamente nuovo. Le prime osservazioni di questo tipo riguardano complessi di rame con ossime che agiscono come veleni delle topoisomerasi mostrando un'attività migliore rispetto al farmaco di riferimento etoposide⁽¹³⁹⁾. In alcuni casi è stato indicato che anche i complessi con tiosemicarbazoni alfa-eterociclici inibiscono in vitro ed in vivo la topoisomerasi II. In particolare recenti studi su una serie di tiosemicarbazoni con sostituenti eterociclici e sui loro composti di rame nei confronti di cellule di tumore alla mammella esprimono differenti livelli di topoisomerasi II indicano che i complessi sono degli inibitori decisamente più efficaci dei leganti liberi e che agiscono come inibitori interferendo con il meccanismo di idrolisi dell'ATP dell'enzima⁽¹⁴⁰⁾.

Complessi di rame sono stati studiati anche per la loro capacità di inibire la topoisomerasi I ed in particolare composti con leganti di tipo fenantrolinico planare hanno dimostrato un'attività di questo tipo molto simile a quella esercitata da alcuni composti organici antitumorali già noti per agire a questo livello⁽¹⁴¹⁾. Essi sono infatti in grado di occupare il sito di binding della topoisomerasi I impedendo l'associazione dell'enzima al DNA e quindi influenzandone la corretta attività enzimatica.

Inibizione del proteasoma:

Il proteasoma è un complesso multiproteico in grado di degradare selettivamente le proteine intracellulari. È costituito essenzialmente da un core, ovvero una cavità dove vengono degradate le proteine associate a dei domini regolatori caratterizzati dalla presenza di siti ad attività ATPasica e siti di legame per l'ubiquitina. Per essere riconosciuta e processata dal proteasoma una proteina deve, infatti, essere legata all'ubiquitina e poi, una volta riconosciuta e trasferita nel core catalitico vengono attivate una serie di funzioni peptidasiche⁽¹⁴²⁾. In particolare l'attività chimotripsinica opera rotture di legame successive a

residui amminoacidici idrofobici, l'attività tripsinica opera in presenza di residui amminoacidici basici ed una attività caspatica lavora in presenza di residui amminoacidici acidi⁽¹⁴³⁾.

Il proteasoma è quindi parte di un complesso meccanismo cellulare che regola la concentrazione e la stabilità di particolari proteine oltre a promuovere la degradazione di proteine non funzionanti. La degradazione proteica dipendente dal proteasoma è essenziale per molte funzionalità cellulari tra cui processi di primaria importanza per la carcinogenesi come l'apoptosi, l'angiogenesi e la formazione di metastasi. È stato inoltre dimostrato che le cellule tumorali sono più sensibili all'inibizione del proteasoma rispetto alle cellule sane e per questo motivo attualmente lo sviluppo di inibitori del proteasoma come nuovi agenti antitumorali è oggetto di intenso studio⁽¹⁴⁴⁾.

Il primo caso di complessi di rame in grado di inibire il proteasoma è riconducibile ad una decina di anni fa quando sono state descritte delle miscele di sali di rame e leganti bidentati della famiglia delle idrossichinoline e dei ditiocarbammati, come riportato in maggior dettaglio nel capitolo introduttivo, quali potenti inibitori dell'attività chimotripsinica del proteasoma, in grado di determinare processi apoptotici in modo selettivo nelle cellule tumorali ma non nelle cellule sane. Questi studi hanno messo in luce il fatto che l'elevata attività del proteasoma così come l'elevata concentrazione di rame sono caratteristiche uniche delle cellule tumorali che possono essere quindi sfruttati come *targets* per composti che agiscano come potenti e selettivi agenti citotossici. Questi studi suggeriscono che lo ione rame svolga un ruolo fondamentale all'interno di queste miscele nel conferire l'attività inibitoria anche se le informazioni circa i complessi di coordinazione che effettivamente si formano in situ sono piuttosto limitate. L'attività inibitoria del rame può comunque essere favorita dalla scelta di opportuni leganti bidentati ma anche ostacolata dalla presenza di chelanti polidentati troppo affini al metallo come l'EDTA. Questo aspetto denota che l'inerzia alla sostituzione nei complessi dove il rame è completamente sequestrato dal legante, non consente al metallo di esercitare la sua attività inibitoria in quanto non è più in grado di interagire con i substrati cellulari.

Più di recente sono stati investigati gli effetti di complessi di rame sintetizzati *ex vivo* e completamente caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico. In particolare sono stati scelti leganti metilpiridino-amino-metilfenoli, i cui relativi complessi di rame hanno evidenziato una significativa inibizione del proteasoma associata ad elevati livelli di proteine ubiquitinate in cellule di tumore alla prostata⁽¹⁴⁵⁾. Il proteasoma è stato identificato come principale target molecolare anche per una serie di complessi di rame(II) con leganti fosfinici idrofilici. Il complesso monocationico con trisdrossimetilfosfina, altamente solubile e stabile in acqua, ha dimostrato una elevata attività antiproliferativa in cellule di tumore al colon dal momento che è in grado di inibire l'attività chimotripsinica e caspatica del proteasoma con conseguente accumulo intracellulare di proteine poliubiquitinate⁽¹⁴⁶⁾.

In generale la soppressione del sistema proteasoma-ubiquitina innesca uno stress a livello del reticolo endoplasmatico accompagnato da una massiva vacuolizzazione citoplasmatica che portano all'innescare dei meccanismi di morte cellulare programmata⁽¹⁴⁷⁾, come evidenziato dal meccanismo proposto in Figura A29.

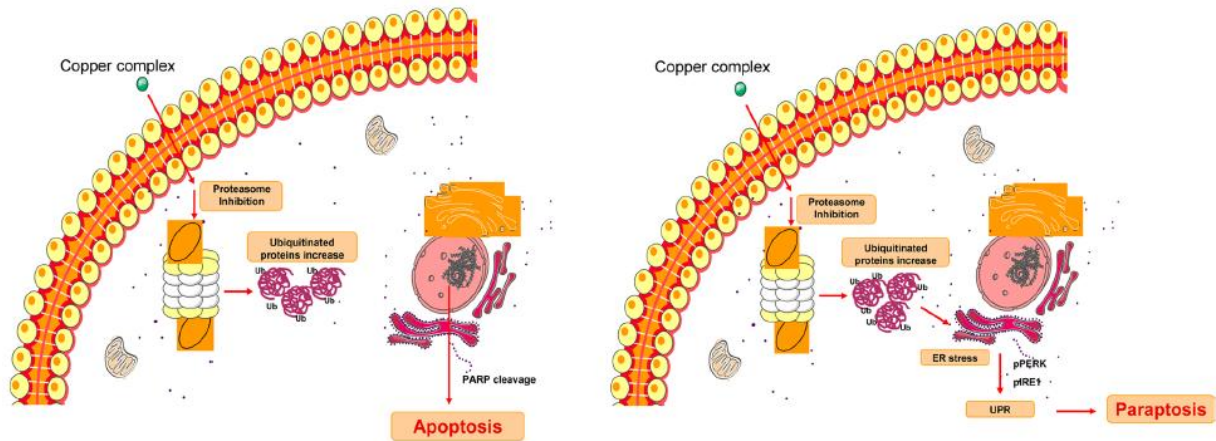


Fig. A29. Meccanismo di morte cellulare indotta da inibizione del proteasoma causata da complessi di rame.

A2.4 Studi *in vivo*

Nonostante la grande quantità di studi *in vitro* con numerosi complessi di rame, lo *step* fondamentale per valutare l'efficacia di un composto antitumorale rimane lo studio in modelli animali. Esistono infatti una serie di studi che dimostrano come la valutazione dell'attività citotossica *in vitro* non sia in realtà predittiva dell'efficacia *in vivo* della stessa molecola⁽¹⁴⁸⁾. I modelli animali presentano una serie di caratteristiche fondamentali come lo sviluppo dei vasi sanguigni tumorali e l'interazione con la matrice extracellulare che consentono di valutare la citotossicità in modo più rigoroso e di fornire dei dati circa la farmacocinetica dell'agente testato.

Nonostante il grande interesse nello sviluppo di composti a base di rame che sono scarsamente tossici e molto attivi come agenti antitumorali, ad oggi ci sono ancora pochi studi che indagano il comportamento *in vivo* di questi complessi. Infatti, sebbene diverse classi di complessi di rame sono stati proposti come promettenti agenti citotossici, per pochi di questi è stata dimostrata una significativa attività antitumorale *in vivo*.

Complessi di rame con tiosemicarbazoni sono tra le classi maggiormente studiate ma pochi sono i dati relativi alla loro attività *in vivo*. Topi con cellule leucemiche HL60 trattati con il complesso ottenuto con una piridina-tiosemicarbazone (Figura A30) hanno presentato una significativa riduzione delle dimensioni della massa tumorale anche se non ci sono differenze statisticamente rilevanti tra l'azione esercitata dal complesso e dal corrispondente legante libero⁽¹⁴⁹⁾. A livello molecolare i dati ottenuti indicano l'attivazione nelle cellule trattate di meccanismi che comprendono lo stress del reticolo endoplasmatico successivo all'inibizione del proteasoma.

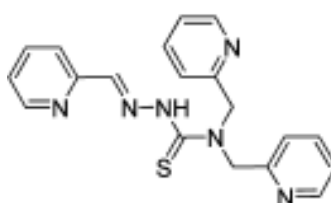


Fig. A30. Il tiosemicarbazone usato negli studi *in vivo*.

La classe dei composti "casiopinas" presenta una promettente attività *in vivo* descritta in casi di tumore colon rettale HCT-15. Il volume della massa tumorale mostra una crescita decisamente ridotta rispetto al controllo ed è associata ad induzione di morte cellulare per apoptosi. Sfortunatamente, analisi istologiche rivelano una irritazione cronica alla membrana peritoneale indotta dai complessi anche se non sono riscontrate significative differenze in termini di perdita di peso rispetto ai controlli⁽¹⁵⁰⁾.

Infine, il complesso riportato in Figura A31, è stato scelto tra una serie di complessi di rame mononucleari con leganti imminici per approfonditi studi *in vivo*⁽¹⁵¹⁾. Dopo un mese di trattamento in topi con carcinoma

ascitico di Ehrlich si è verificata una diminuzione di circa 2.5 volte della velocità di crescita tumorale rispetto al cis-platino. Il complesso induce apoptosi delle cellule tumorale e soprattutto la sua attività è resa ancor più interessante dal fatto che causa una tossicità sistemica marginale. Infatti non compaiono evidenti sintomi clinici di tossicità quali perdita di peso o letargia e le analisi istologiche non evidenziano alcun sintomo di tossicità a livello epatico e renale.

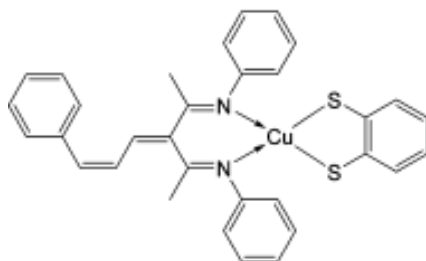


Fig. A31. Il complesso con legante imminico testato *in vivo*.

A3. PARTE SPERIMENTALE

A3.1 Materiali e strumentazione

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia) ed utilizzati senza ulteriore purificazione. Dietilditiocarbammato (DEDC) e pirrolidindiotcarbammato (PDTC) sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). PIPE-1 e ZnPR13 sono stati sintetizzati come indicato in letteratura⁽¹⁵²⁾.

Le analisi elementari (C, H, N,) sono state eseguite con un analizzatore Carlo Erba 1106.

Gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno spettrometro di massa API-TOF Mariner™, con sorgente *elettrospray* ed analizzatore a tempo di volo, ed elaborati con il *software* Mariner Data Explorer TM.

Analisi cromatografiche TLC (Thin Layer Chromatography) sono state condotte, al fine di valutare il grado di purezza dei complessi, su lastre SiO₂ F254S (Merck, Milano, Italy) usando le miscele eluenti indicate caso per caso.

Le analisi spettroscopiche IR sono state effettuate in pastiglie di KBr (1% di campione) con uno spettrofotometro 1700 FT-IR Perkin Elmer, utilizzando il programma Spectrum versione 5.0.1 (Perkin Elmer) per l'elaborazione degli spettri.

Gli studi HPLC per valutare la resa radiochimica (RCY) e la stabilità dei prodotti sono stati condotti con uno strumento Agilent 1100, equipaggiato con un detector UV e un detector radiometrico 500RT Series Packard. Le analisi HPLC sono state eseguite con una colonna RP-C8 Symmetry (5µm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min e una colonna RP-C18 Symmetry300™ (5µm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min.

sintetizzati come riportato nelle relazioni sull'attività degli anni precedenti.

Per i conteggi della radioattività è stato utilizzata una camera di misurazione CRC15 PET (Capintec Inc., Ramsey, NJ).

Per quanto riguarda i test di vitalità cellulare, effettuati in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Cristina Marzano e della Dr.ssa Valentina Gandin, tutti gli studi sono stati condotti considerando come sostanza di riferimento il cisplatino (Sigma Chemical St. Louis, MO. USA). Il colorante MTT (3-[4,5 dimetiliazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio bromuro) e i terreni di coltura (RPMI-1640, DMEM, Ham's-F12) e gli altri reattivi, dove non specificato, provengono dalla ditta Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Il siero fetale bovino, la tripsina, l' antibiotico (soluzione di penicillina 50 U mL⁻¹, streptomina 50 µg mL⁻¹) e la glutammina provengono dalla ditta Euroclone (Milano, Italia).

A3.2 Sintesi dei leganti ditiocarbammici. Procedure generali

In un pallone sono sciolti 262.7 mg di NaOH (idrossido di sodio, 2 equivalenti, 6.62 mmoli) in 40 mL di etanolo (EtOH) e alla miscela di reazione viene aggiunta l'ammina corrispondente (1 equivalente, 3.31 mmoli). Il pallone è posto in bagno di ghiaccio e sono aggiunti goccia a goccia 400 μ L di CS₂ (solfo di carbonio, 2 equivalenti, 6.62 mmoli). La reazione è lasciata reagire per circa 3 ore sotto costante agitazione magnetica e si osserva il viraggio della soluzione da trasparente a giallo chiaro. La miscela è portata a secco sotto flusso di N₂, il residuo ottenuto è ripreso con una minima quantità di etanolo e fatto precipitare con etere dietilico (Et₂O). Il precipitato viene filtrato, lavato con etanolo ed asciugato. Il prodotto viene infine purificato mediante cristallizzazione da una soluzione alcolica satura con vapori di Et₂O.

A3.2.1 Sintesi di piperidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L2)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Piperidina	85.15	3.31	281.7	327	0.862	1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 89.8% in prodotto sale sodico.

AE: calc. per C₆H₁₀NS₂Na (MW= 183.27): C, 39.32%; H, 7.64%; N, 5.50%; trovato: C, 40.97%; H, 6.01%; N, 7.56%.

ESI(-)-MS: 160.02 {100%, C₆H₁₀NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ): 1.41 (m, 4H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 1.55 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂CH₂piperidina); 4.27 (m, 4H, S₂CNCH₂CH₂piperidina).

¹³C NMR (MeOD, δ): 21.9 (S₂CNCH₂CH₂CH₂piperidina); 25.2 (S₂CNCH₂CH₂piperidina); 52.6

(S₂CNCH₂CH₂piperidina); 202.2 (C_{quat}).

A3.2.2 Sintesi di morfolin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L3)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Morfolina		3.31				1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 83.1% in prodotto sale sodico.

AE: calc. per C₅H₈NNaOS₂ (MW= 185.23): C, 32.42%; H, 4.35%; N, 7.56%; trovato: C, 33.03%; H, 4.88%; N, 7.13%.

ESI(-)-MS: 162.00 {100%, C₅H₈NOS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 3.69 (m, 4H, S₂CNCH₂CH₂morfolina); 4.27 (m, 4H, S₂CNCH₂CH₂morfolina).

¹³C NMR (MeOD, δ): 51.4 (S₂CNCH₂CH₂morfolina); 65.0 (S₂CNCH₂CH₂morfolina); 205.2 (C_{quat}).

A3.2.3 Sintesi di 4-etilpiperazin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L4)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Etilpiperazina	114.19	3.31	377.8			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.26	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 60.4 %

AE: calc. per C₇H₁₃N₂S₂Na (MW= 212.31): C, 39.60%; H, 6.17%; N, 13.20%; trovato: C, 40.97%; H, 7.58%; N, 13.86%.

ESI(-)-MS: 189.05 {100%, C₇H₁₃N₂S₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.05 (t, J = 7.30 Hz, 3H, NCH₂CH₃) ; 2.43 (q, J = 7.30 Hz, 2H, NCH₂CH₃) ; 2.52 (m, 4H, S₂CNCH₂CH₂piperazina); 4.32 (m, 4H S₂CNCH₂CH₂piperazina).

¹³C NMR (MeOD, δ): 10.0 (NCH₂CH₃); 49.8 (S₂CNCH₂CH₂piperazina); 50.7 (NCH₂CH₃); 50.9 (S₂CNCH₂CH₂piperazin); 202.1 (C_{quat}).

A3.2.4 Sintesi di 4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L9)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Eq.</i>
4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidina	211.69	3.31	700.3			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 78.1 %

AE: calc. per C₁₂H₁₃N S₂ONaCl (MW= 309.81): C, 46.52%; H, 4.23%; N, 4.52%; trovato: C, 44.98%; H, 4.91%; N, 4.06%.

ESI(-)-MS: 286.02 {100%, C₁₂H₁₃CINOS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.73 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 2.12 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 3.52 (m, 2H, S₂CNCH₂piperidina); 5.76 (m, 2H, S₂CNCH₂piperidina); 7.33 - 7.50 (*H*arom).

¹³C NMR (MeOD, δ): 35.0 (S₂CNCH₂CH₂piperidina); 42.8 (S₂CNCH₂piperidina); 71.5 (S₂CNCH₂CH₂COH); 127.7 - 128.9 (C_{arom}); 132.2 (ClC_{quat}arom); 143.1 (C_{quat}arom) 210.1 (CS₂).

A3.2.5 Sintesi di 2-carbossipirrolidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L10)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Prolina	115.13	3.31	380.9			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 95.3%

AE: calc. per C₆H₈NNaO₂S₂ (MW= 213.25): C, 33.79%; H, 3.78%; N, 6.57%; trovato: C, 31.89%; H, 4.21%; N, 6.11%.

ESI(-)-MS: 190.00 {100%, C₆H₈NO₂S₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.54 (m, 1H, S₂CNCH₂CH₂pirrolidina); 1.64 (m, 1H, S₂CNCH₂CH₂pirrolidina); 1.70 (m, 1H, S₂CNCH₂pirrolidina); 1.95(m, 1H, S₂CNCH₂pirrolidina); 2.71(m, 1H, S₂CNCH₂pirrolidina); 2.83 (m, 1H, S₂CNCH₂pirrolidina); 3.6 (m, 1H, S₂CNCHCOO⁻).

¹³C NMR (MeOD, δ): 23.8 (S₂CNCH₂CH₂pirrolidina); 27.9 (S₂CNCH₂pirrolidina); 52.2 (S₂CNCH₂pirrolidina); 71.8 (S₂CNCHCOO⁻); 175.9 (S₂CNCHCOO⁻); 211.8 (C_{quat}).

A3.2.6 Sintesi di 4-carbossipiperidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L13)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
4-carbossipiperidina		3.31				1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 87.3%

AE: calc. per C₇H₉NNa₂O₂S₂ (MW= 249.25): C, 33.73%; H, 3.64%; N, 5.62%; trovato: C, 32.55%; H, 4.06%; N, 5.23%.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.63 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 1.85 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 2.37 (m, 1H, S₂CNCH₂CH₂CHpiperidina); 2.88(m, 1H, S₂CNCH₂piperidina); 2.97 (m, 1H, S₂CNCH₂piperidina).

¹³C NMR (MeOD, δ): 29.6 (S₂CNCH₂CH₂piperidina); 44.9(S₂CNCHCOO⁻); 48.5 (S₂CNCH₂piperidina); 181.0 (S₂CNCHCOO⁻); 210.5 (C_{quat}).

A3.2.7 Sintesi di 4-(carbossietil)piperidin-ditiocarbammato sale di 4-carbossietilpiperidinio (DTC-L16)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
4-etossicarbonilpiperidina	157.21	3.31	520.1			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 45.6%

AE: calc. per C₁₇H₃₀N₂O₄S₂ (MW= 390.52): C, 52.28%; H, 7.74%; N, 7.17%; trovato: C, 52.46%; H, 7.81%; N, 7.08%.

ESI(-)-MS: 232,03 {100%, C₁₇H₃₀N₂O₄S₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.28 (m, 3H, CH₃CH₂O) ; 1.74 (m, 1H, CS₂NCH₂CH₂) ; 1.91 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂); 2.11 (m, 1H, CS₂NCH₂CH₂); 2.67 (m, 1H S₂CNCH₂CH₂CHpiperidina); 3.01 (m, 1H, CS₂NCH₂CH₂); 3.37 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂); 4.17 (m, 2H, CH₃CH₂O), 5.52 (m, 1H, CS₂NCH₂CH₂).

¹³C NMR (MeOD, δ): 13.1 (CH₃CH₂O); 25.6 (CS₂NCH₂CH₂); 27.9 (CS₂NCH₂CH₂); 40.7 (S₂CNCH₂CH₂CHpiperidina); 43.3 (S₂CNCH₂CH₂CH); 49.7 (S₂CNCH₂CH₂CH); 60.5 (CH₃CH₂O); 175.0 (CH₃CH₂OC=OCH); 210.8 (CS₂).

A3.2.8 Sintesi di 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]-decano-8-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L17)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decano	143.18	3.31	473.7			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 78.8%

AE: calc. per C₈H₁₂NS₂O₂Na (MW= 241.31): C, 39.82%; H, 5.01%; N, 5.80%; trovato: C, 40.55%; H, 5.33%; N, 6.02%.

ESI(-)-MS: 218.03 {100%, C₈H₁₂NO₂S₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.75 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂); 3.95 (s, 4H, OCH₂CH₂O); 4.35 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂).

¹³C NMR (MeOD, δ): 34.1 (CS₂NCH₂CH₂); 49.4 (CS₂NCH₂CH₂); 64.5 (OCH₂CH₂O); 107.5 (C_{quat}); 208.7 (CS₂).

A3.2.9 Sintesi di 3,5-dimetilmorfolin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L19)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
3,5-dimetilmorfolina		3.31				1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 78.8%

AE: calc. per C₇H₁₂NNaOS₂ (MW= 213.29): C, 39.42%; H, 5.67%; N, 6.57%; trovato: C, 40.07%; H, 5.90%; N, 6.12%.

ESI(-)-MS: 190.04 {100%, C₈H₁₂NO₂S₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.18 (m, 6H, S₂CNmorfolinaCH₃); 2.95 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂morfolina); 3.08. (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂morfolina); 3.62 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂morfolina).

¹³C NMR (MeOD, δ): 18.3 (S₂CNmorfolinaCH₃); 60.4 (S₂CNCH₂CH₂morfolina); 69.9 (S₂CNCH₂CH₂morfolina); 208.2 (C_{quat}).

A3.2.10 Sintesi di 4-morfolinipiperidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L20)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
4-morfolinipiperidina	170.25	3.31	563.3			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 80.2%

AE: calc. per C₁₀H₁₇N₂OS₂Na (MW= 268.38): C, 44.76%; H, 6.39%; N, 10.44%; trovato: C, 45.33%; H, 6.80%; N, 10.08%.

ESI(-)-MS: 245.08 {100%, per C₁₀H₁₇N₂OS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.60 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂); 2.05 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂); 2.75 (m, 4H, OCH₂CH₂Npiperidina); 3.20 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂); 3.85 (m, 4H, OCH₂CH₂Npiperidina); 5.71 (m, 1H, CS₂NCH₂CH₂CH).

¹³C NMR (MeOD, δ): 27.7 (CS₂NCH₂CH₂); 49.3 (CS₂NCH₂CH₂); 50.8 (OCH₂CH₂Npiperidina); 61.4 (CS₂NCH₂CH₂CH); 66.6 (OCH₂CH₂Npiperidina); 207.1 (CS₂).

A3.2.11 Sintesi di azepan-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L22)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Esametenimmina	99.17	3.31	328.1			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 69.9%

AE: calc. per C₇H₁₂NS₂Na (MW= 197.30): C, 42.61%; H, 6.13%; N, 7.10%; trovato: C, 43.11%; H, 6.66%; N, 6.94%.

ESI(-)-MS: 174.04 {100%, per C₇H₁₂NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.43 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂); 1.67 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂); 4.13 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (MeOD, δ): 26.7 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 28.1 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 53.2 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 213.2 (CS₂).

A3.2.12 Sintesi di azocan-ditiocarbammato sale sodico sale sodico (DTC-L23)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Eptametiliminina	113.20	3.31	374.5			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 75.4%

AE: calc. per C₈H₁₄NS₂Na (MW= 211.32): C, 45.47%; H, 6.68%; N, 6.63%; trovato: C, 45.91%; H, 7.07%; N, 7.00%.

ESI(-)-MS: 188.06 {100%, per C₈H₁₄NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.50 (m, 6H, CS₂NCH₂CH₂CH₂CH₂); 1.85 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂); 4.10 (t, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂);

¹³C NMR (MeOD, δ): 25.1 (CS₂NCH₂CH₂CH₂CH₂); 26.2 (CS₂NCH₂CH₂CH₂CH₂); 26.8 (CS₂NCH₂CH₂); 56.3 (CS₂NCH₂CH₂); 213.2 (CS₂).

A3.2.13 Sintesi di 4-N-4-metil-azepan-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L24)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
4-N-4-metilazepano		3.31				1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 73.9%

AE: calc. per C₇H₁₃NaN₂S₂ (MW= 212.30): C, 39.60%; H, 6.17%; N, 13.20%; trovato: C, 39.94%; H, 6.58%; N, 12.96%.

ESI(-)-MS: 189.06 {100%, per C₇H₁₂NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.78 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂CH₂); 2.10 (s, 3H, azepanoNCH₃); 2.47 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂N); 3.12 (m, 2H, CS₂NCH₂CH₂CH₂); 3.45 (m, 4H, CS₂NCH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (MeOD, δ): 25.5 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 53.9 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 44.9 (azepanoNCH₃); 58.7 (CS₂NCH₂CH₂CH₂); 60.3 (CS₂NCH₂CH₂N); 208.9 (CS₂).

A3.2.14 Sintesi di 4-benzil-piperidin-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L25)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
4-benzilpiperidina	175.27	3.31	579.9			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 95.5%

AE: calc. per C₁₃H₁₆NS₂Na (MW= 273.39): C, 57.11%; H, 5.90%; N, 5.12%; trovato: C, 58.00%; H, 6.22%; N, 5.04%.

ESI(-)-MS: 250.07 {100%, per C₁₃H₁₆NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.23 (m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 1.65(m, 2H, S₂CNCH₂CH₂piperidina); 1.88 (m, 1H, S₂CNCH₂CH₂CHpiperidina); 2.54 (m, 2H, S₂CNCH₂piperidina); 3.05 (m, 2H, CH₂Carom)5.35 (m, 2H, S₂CNCH₂piperidina); 7.23- 7.32 (m, 5H, Harom).

¹³C NMR (MeOD, δ): 29.2 (S₂CNCH₂CH₂piperidina); 39.9 (S₂CNCH₂CH₂CHpiperidina); 43.1 (CH₂Carom); 49.8 (S₂CNCH₂piperidina); 125.0 - 128.2(Carom); 140.0 (C_{quat}arom); 209.4 (CS₂).

A3.2.15 Sintesi di 4-(2-metossi)fenilpiperazin-ditiocarbammato sale sodico (PIPE-1)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
2-metossifenilpiperazina	192.26	3.31	636.1			1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 90%.

AE: calc. per C₁₂H₁₅N₂OS₂Na (MW= 290.38): C, 49.63%; H, 5.21%; N, 9.65%; trovato: C, 50.97%; H, 5.99%; N, 9.89%.

ESI(-)-MS: 267.06 {100%, C₁₂H₁₅N₂OS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 2.95(m, 4H, CS₂NCH₂CH₂piperazina); 3.74 (s, 3H, CH₃OCarom); 4.37 (m, 4H, CS₂NCH₂piperazina); 6.96 - 7.01 (Harom).

¹³C NMR (MeOD, δ): 53.2 (S₂CNCH₂CH₂Npiperazina); 57.95 (OCH₃); 62.0 (CS₂NCH₂piperazina); 115.5- 125.3 (Carom); 143.42 (C_{quat}-N); 155.2 (C_{quat}-OCH₃); 214.10 (CS₂).

A3.2.16 Sintesi di dipropil-ditiocarbammato sale sodico (DPDC)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>Mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>Equivalenti</i>
Dipropilammina	101.19	3.31	334.8	454	0.738	1
CS ₂	76.14	6.62	503.8	400	1.266	2
NaOH	39.99	6.62	264.6			2

Resa: 88.6%

AE: calc. per C₇H₁₄NS₂Na (MW= 199.31): C, 42.18%; H, 7.08%; N, 7.03%; trovato: C, 43.03%; H, 6.99%; N, 7.22%.

ESI(-)-MS: 176.06 {100%, C₇H₁₄NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ): 0.88 (t, J= 7.36 Hz, 6H, CH₃CH₂CH₂N); 1.74 (m, 4H, CH₃CH₂CH₂N); 3.93 (m, 4H, CH₃CH₂CH₂N);

¹³C NMR (MeOD, δ): 11.5 (CH₃CH₂CH₂N); 22.1 (CH₃CH₂CH₂N); 56.2 (CH₃CH₂CH₂N); 206.8 (CS₂).

A3.3 Sintesi di complessi del tipo [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] con leganti ditiocarbammici ciclici. Procedura generale

I complessi sono stati ottenuti seguendo la procedura sintetica riportata in letteratura⁽¹⁵³⁾ per la sintesi di $[\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$. L'ambiente di reazione è stato opportunamente modificato sulla base della diversa solubilità dei leganti ditiocarbammici e per avvicinarsi alle possibili condizioni di marcatura con ^{64}Cu .

Metodo A: ad una soluzione dell'opportuno ditiocarbammato (2 equivalenti, 0.12 mmoli) in 5 mL di acqua, o metanolo se il legante non è solubile in acqua, è stata aggiunta una soluzione di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.06 mmoli) in 5 ml di acqua, sotto costante agitazione magnetica. Si osserva l'immediata formazione di un abbondante precipitato marrone. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, quindi, filtrata e il solido marrone ottenuto è stato lavato abbondantemente con acqua e asciugato sotto vuoto.

Metodo B: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.06 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di una soluzione di acido cloridrico (HCl) 0.1M. A questa soluzione è stata aggiunto l'opportuno ditiocarbammato (2 equivalenti, 0.12 mmoli) sciolto in 5 mL di una soluzione di acetato di sodio 3M. Si osserva l'immediata formazione di un abbondante precipitato marrone. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, quindi, filtrata e il solido marrone ottenuto è stato lavato abbondantemente con acqua e asciugato sotto vuoto.

Metodo C: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.06 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di una soluzione di acido cloridrico (HCl) 0.1M. A questa soluzione è stata aggiunto l'opportuno ditiocarbammato (2 equivalenti, 0.12 mmoli) sciolto in 5 mL di una soluzione di glicina 0.2 M. Si osserva l'immediata formazione di un abbondante precipitato marrone. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, quindi, filtrata e il solido marrone ottenuto è stato lavato abbondantemente con acqua e asciugato sotto vuoto.

Metodo D: un'opportuna quantità di NaOH (idrossido di sodio, 4 equivalenti, 0.47 mmoli) è sciolta in 15 mL di etanolo, con l'aggiunta di qualche mL di acqua per favorirne la dissoluzione. Alla soluzione sono aggiunti 5 mL di una soluzione alcolica dell'ammina corrispondente in forma cloridrata (2 equivalenti, 1.65 mmoli). Si apprezza quasi immediatamente la formazione di un precipitato e la reazione viene lasciata per qualche minuto sotto costante agitazione magnetica. La soluzione è centrifugata, il surnatante viene prelevato e trasferito in un secondo pallone. Il pallone viene messo in bagno di ghiaccio e si procede con l'aggiunta, goccia a goccia del CS_2 (solfo di carbonio, 2 equivalenti, 0.94 mmoli); la reazione viene lasciata sotto agitazione per almeno 3 ore. In seguito si aggiungono 2 mL di una soluzione alcolica di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (rame cloruro, 1 equivalente, 0.12 mmoli). Si osserva l'immediata formazione di un precipitato bianco che viene centrifugato, lavato, sospeso con un volume minimo di diclorometano (CH_2Cl_2), trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

A3.3.1 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(PDTC)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
PDTC NH ₄ ⁺	164.29	0.117	19.3	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando i primi tre metodi di reazione.

Resa media: 93.1%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.5

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 15.2 min

AE: calc. per C₁₀H₁₆CuN₂S₄ (MW: 356.05): C, 33.73%; H, 4.53%; N, 7.87%; trovato: C, 34.00%; H, 4.36%; N, 7.64%.

ESI(+)-MS: m/z: 354.96 {100%, [Cu(PDTC)₂]⁺}

UV-Vis: max 267 nm, 433 nm

A3.3.2 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L2)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L2 Na ⁺	183.27	0.117	21.5	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando i primi tre metodi di reazione.

Resa media: 88.8%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 16.6 min

AE: calc. per C₁₂H₂₀CuN₂S₄ (MW: 384.11): C, 37.52%; H, 5.25%; N, 7.29%; trovato: C, 37.66%; H, 5.15%; N, 7.18%.

ESI(+)-MS: m/z: 382.97 {100%, [Cu(DTC-L2)₂]⁺}

A3.3.3 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L3)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L3 Na ⁺	185.24	0.117	21.7	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 86.3%

Solubilità: poco solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.3

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 18.1 min

AE: calc. per C₁₀H₁₆CuN₂O₂S₄ (MW: 388.05): C, 30.95%; H, 4.16%; N, 7.22%; trovato: C, 30.99%; H, 4.04%; N, 7.08%.

UV-Vis: max 270 nm, 430 nm

A3.3.4 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L4)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L4 Na ⁺	212.31	0.117	24.9	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 90.7%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.2

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 13.4 min

AE: calc. per C₁₄H₂₆CuN₄S₄ (MW: 442.19): C, 38.08%; H, 5.93%; N, 12.67%; trovato: C, 38.31%; H, 5.88%; N, 12.40%.

ESI(+)-MS: m/z: 221.54 {100%, [Cu(DTC-L4)₂]⁺ + H⁺}, 441.05 {60%, [Cu(DTC-L4)₂]⁺}

UV-Vis: max 272 nm, 434 nm

A3.3.5 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L9)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L9 Na ⁺	309.81	0.117	36.3	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando i primi tre metodi di reazione.

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

Resa media: 93.3%

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.5

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 17.6 min

AE: calc. per C₂₄H₂₆Cl₂CuN₂O₂S₄ (MW: 637.19): C, 45.24%; H, 4.11%; N, 4.40%; trovato: C, 44.83%; H, 3.90%; N, 4.57%.

ESI(+)-MS: m/z: 636.95 {100%, [Cu(DTC-L9)₂]⁺}

UV-Vis: max 271 nm, 434 nm

A3.3.6 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L10)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L10 Na ⁺	213.24	0.117	25.0	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 86.4%

Solubilità: insolubile in CH₂Cl₂, H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.9

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 9.8 min

AE: calc. per C₁₂H₁₆CuN₂O₄S₄ (MW: 444.07): C, 32.46%; H, 3.63%; N, 6.31%; trovato: C, 32.71%; H, 3.44%; N, 6.12%.

ESI(+)-MS: m/z: 442.94 {30%, [Cu(DTC-L10)₂]⁺}

UV-Vis: max 271 nm, 435 nm

A3.3.7 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-13)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L13 Na ⁺	227.27	0.117	26.7	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 87.8%

Solubilità: insolubile in CH₂Cl₂, H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.9

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 9.1 min

AE: calc. per C₁₄H₂₀CuN₂O₄S₄ (MW: 472.13): C, 35.62%; H, 4.27%; N, 5.93%; trovato: C, 35.89%; H, 4.11%; N, 6.04%.

UV-Vis: max 271 nm, 433 nm

A3.3.8 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L15)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
4-piperidone monoidrato·HCl	153.61	0.352	54.1	2		
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo D.

Resa: 90.2%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.7

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 14.1 min

AE: calc. per C₁₃H₁₆CuN₂O₂S₄ (MW: 412.06): C, 34.98%; H, 3.91%; N, 6.80%; trovato: C, 35.27%; H, 4.19%; N, 6.48%.

ESI(+)-MS: m/z: 410.94 {100%, [Cu(DTC-L15)₂]⁺}

UV-Vis: max 270 nm, 436 nm

A3.3.9 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L16)₂]

Reagente	MW	mmol	Peso (mg)	Equivalenti
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L16 sale di etossicarbonilpiperidinio	390.56	0.117	45.8	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando i primi tre metodi di reazione.

Resa media: 96.1%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.7

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 15.3 min

AE: calc. per C₁₈H₂₈CuN₂O₄S₄ (MW: 528.23): C, 40.93%; H, 5.34%; N, 5.30%; trovato: C, 41.66%; H, 5.56%; N, 5.77%.

ESI(+)-MS: m/z: 527.01 {100%, [Cu(DTC-L16)₂]⁺}

UV-Vis: max 271 nm, 434 nm

A3.3.10 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L17)₂]

Reagente	MW	mmol	Peso (mg)	Equivalenti
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L17 Na ⁺	241.31	0.117	28.3	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 91.9%

Solubilità: solubile in DMSO, parzialmente solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 13.3 min

AE: calc. per C₁₆H₂₄CuN₂O₄S₄ (MW: 500.18): C, 38.42%; H, 4.84%; N, 5.60%; trovato: C, 38.80%; H, 5.11%; N, 5.29%.

ESI(+)-MS: m/z: 498.99 {100%, [Cu(DTC-L17)₂]⁺}

UV-Vis: max 273 nm, 430 nm

A3.3.11 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L19)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L19 Na ⁺	213.30	0.117	25	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 90.7%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 15.8 min

AE: calc. per C₁₄H₂₄CuN₂O₂S₄ (MW: 444.16): C, 37.86%; H, 5.45%; N, 6.31%; trovato: C, 38.08%; H, 5.23%; N, 6.22%.

ESI(+)-MS: m/z: 443.02 {100%, [Cu(DTC-L19)₂]⁺}

UV-Vis: max 274 nm, 433 nm

A3.3.12 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L20)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L20 Na ⁺	268.37	0.117	31.5	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 88.4%

Solubilità: poco solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.3

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 16.3 min

AE: calc. per C₂₀H₃₄CuN₄O₂S₄ (MW: 554.32): C, 43.34%; H, 6.18%; N, 10.11%; trovato: C, 43.55%; H, 6.11%; N, 10.23%.

UV-Vis: max 272 nm, 434 nm

A3.3.13 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L22)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L22 Na ⁺	197.30	0.117	23.1	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 88.7%

Solubilità: solubile in DMSO e parzialmente solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.5

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 18.9 min

AE: calc. per C₁₄H₂₄CuN₂S₄ (MW: 412.16): C, 40.80%; H, 5.87%; N, 6.80%; trovato: C, 41.10%; H, 5.99%; N, 6.33%.

ESI(+)-MS: m/z: 411.01 {100%, [Cu(DTC-L22)₂]⁺}

UV-Vis: max 271 nm, 432 nm

A3.3.14 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L23)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L23 Na ⁺	227.43	0.117	26.7	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 88.3%

Solubilità: solubile in DMSO, parzialmente solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.4

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 15.8 min

AE: calc. per C₁₆H₂₈CuN₂S₄ (MW: 440.21): C, 43.66%; H, 6.41%; N, 6.36%; trovato: C, 43.95%; H, 6.89%; N, 6.01%.

ESI(+)-MS: m/z: 439.04 {100%, [Cu(DTC-L23)₂]⁺}

UV-Vis: max 274 nm, 434 nm

A3.3.15 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L24)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L24 Na ⁺	212.30	0.117	24.9	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 83.3%

Solubilità: parzialmente solubile in DMSO, , insolubile in H₂O, CH₂Cl₂, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0

AE: calc. per C₁₄H₂₆CuN₄S₄ (MW: 442.18): C, 38.03%; H, 5.93%; N, 12.67%; trovato: C, 38.51%; H, 6.29%; N, 12.08%.

ESI(+)-MS: m/z: 441.03 {100%, [Cu(DTC-L24)₂]⁺}

UV-Vis: max 269 nm, 433 nm

A3.3.16 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(DTC-L25)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
DTC-L25 Na ⁺	273.39	0.117	32.1	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 94.1%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.5

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 17.9 min

AE: calc. per C₂₆H₃₂CuN₂S₄ (MW: 564.35): C, 55.33%; H, 5.72%; N, 4.96%; trovato: C, 55.76%; H, 5.41%; N, 5.06%.

ESI(+)-MS: m/z: 563.06 {100%, [Cu(DTC-L25)₂]⁺}

UV-Vis: max 278 nm, 435 nm

A3.3.17 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(PIPE-1)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.059	10	1
PIPE-1 Na ⁺	290.37	0.117	34.1	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando i primi tre metodi di reazione.

Resa media: 93.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, insolubile in H₂O, alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.7

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 17.8 min

AE: calc. per C₂₄H₃₀CuN₄O₂S₄ (MW: 598.33): C, 48.18%; H, 5.05%; N, 9.36%; trovato: C, 48.32%; H, 4.90%; N, 9.52%.

UV-Vis: max 271 nm, 434 nm

A3.4 Sintesi di complessi del tipo [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] con leganti ditiocarbammici lineari. Procedura generale

Metodo A: ad una soluzione dell'opportuno ditiocarbammato (2 equivalenti, 0.12 mmoli) in 5 mL di acqua, o metanolo se il legante non è solubile in acqua, è stata aggiunta una soluzione di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.06 mmoli) in 5 ml di acqua, sotto costante agitazione magnetica. Si osserva l'immediata formazione di un abbondante precipitato marrone. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, quindi, filtrata e il solido marrone ottenuto è stato lavato abbondantemente con acqua e asciugato sotto vuoto.

Metodo B: Un'opportuna quantità di NaOH (idrossido di sodio, 4 equivalenti, 0.47 mmoli) è sciolta in 5 mL di acqua. Alla soluzione sono aggiunti 5 mL di una soluzione alcolica dell'ammina corrispondente (2 equivalenti, 0.24 mmoli). Il pallone viene messo in bagno di ghiaccio e si procede con l'aggiunta di 2 mL di una soluzione alcolica di CS_2 (solfo di carbonio, 4 equivalenti, 0.47 mmoli) e la reazione viene lasciata sotto agitazione per almeno 3 ore. In seguito si aggiungono 5 mL di una soluzione acquosa di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (rame cloruro, 1 equivalente, 0.12 mmoli). Si osserva l'immediata formazione di un precipitato marrone che viene centrifugato, lavato, sospeso con un volume minimo di diclorometano (CH_2Cl_2), trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

Metodo C: ad una sospensione di un complesso di zinco dell'opportuno ditiocarbammato, sintetizzato come descritto in letteratura, (1 equivalenti, 0.12 mmoli) in 5 mL di acqua è stata aggiunta una soluzione di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.12 mmoli) in 5 ml di acqua, sotto costante agitazione magnetica. In pochi minuti si osserva la formazione di un abbondante precipitato marrone. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 30 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, quindi, filtrata e il solido marrone ottenuto è stato lavato abbondantemente con acqua e asciugato sotto vuoto.

A3.4.1 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	170.45	0.059	10	1
DEDC NH_4^+	166.31	0.117	19.5	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 95%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , insolubile in H_2O , alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C_{18} , CH_3CN): $R_f = 0.7$

HPLC (A H_2O , B CH_3CN ; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): $t_r = 16.3$ min

AE: calc. per $C_{10}H_{20}CuN_2S_4$ (MW: 360.09): C, 33.36%; H, 5.60%; N, 7.78%; trovato: C, 33.36%; H, 5.41%; N, 7.66%.

ESI(+)-MS: m/z: 358.97 {100%, $[Cu(DED C)_2]^+$ }

UV-Vis: max 269 nm, 432 nm

A3.4.2 Sintesi e caratterizzazione di $[Cu(DPDC)_2]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	170.45	0.059	10	1
DPDC Na^+	166.31	0.117	19.5	2

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo A.

Resa: 93.5%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H_2O , acetonitrile, n-esano.

TLC (C_{18} , CH_3CN): $R_f = 0.5$

HPLC (A H_2O , B CH_3CN ; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): $t_r = 19.3$ min

AE: calc. per $C_{14}H_{28}CuN_2S_4$ (MW: 416.19): C, 40.40%; H, 6.78%; N, 6.73%; trovato: C, 40.92%; H, 7.00%; N, 6.55%.

ESI(+)-MS: m/z: 415.04 {100%, $[Cu(DPDC)_2]^+$ }

UV-Vis: max 269 nm, 432 nm

A3.4.3 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(NOMe)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
4-piperidone monoidrato·HCl	153.61	0.352	54.1	2		
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 95.0%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.8

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 11.2 min

AE: calc. per C₆H₁₂CuN₂O₂S₄ (MW: 335.96): C, 21.45%; H, 3.60%; N, 8.34%; trovato: C, 21.96%; H, 3.96%; N, 8.03%.

ESI(+)-MS: m/z: 334.91 {100%, [Cu(NOMe)₂]⁺}

UV-Vis: max 272 nm, 435 nm

A3.4.4 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(ISOMe)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
N-isopropil-N-metossietilammina	117.19	0.352	41.2	2	0.818	50
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 90.6%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 16.0 min

AE: calc. per C₁₄H₂₈CuN₂O₂S₄ (MW: 448.19): C, 37.52%; H, 6.30%; N, 6.25%; trovato: C, 37.87%; H, 6.69%; N, 5.98%.

ESI(+)-MS: m/z: 447.03 {100%, [Cu(ISOMe)₂]⁺}

UV-Vis: max 270 nm, 434 nm

A3.4.5 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(POMe)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
N-propil-N-metossietilammina	117.19	0.352	41.2	2	0.818	50
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 85.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 16.5 min

AE: calc. per C₁₄H₂₈CuN₂O₂S₄ (MW: 448.16): C, 37.52%; H, 6.30%; N, 6.25%; trovato: C, 37.86%; H, 6.65%; N, 6.05%.

ESI(+)-MS: m/z: 447.03 {100%, [Cu(POMe)₂]⁺}

UV-Vis: max 272 nm, 436 nm

A3.4.6 Sintesi e caratterizzazione di [Cu(POEt)₂]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
N-etil-N-metossietilammina	103.16	0.352	36.3	2	0.820	44
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 90.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 14.5 min

AE: calc. per $C_{12}H_{24}CuN_2O_2S_4$ (MW: 420.14): C, 34.31%; H, 5.76%; N, 6.67%; trovato: C, 34.59%; H, 6.01%; N, 6.13%.

ESI(+)-MS: m/z: 419.00 {100%, $[Cu(POEt)_2]^+$ }

UV-Vis: max 270 nm, 431 nm

A3.4.7 Sintesi e caratterizzazione di $[Cu(DPODC)_2]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
N,N-etossimetilammina	133.19	0.352	46.9	2	0.902	52
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 88.4%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C₁₈, CH₃CN): R_f = 0.6

HPLC (A H₂O, B CH₃CN; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): t_r = 13.1 min

AE: calc. per $C_{14}H_{28}CuN_2O_4S_4$ (MW: 480.19): C, 35.02%; H, 5.88%; N, 5.83%; trovato: C, 35.56%; H, 6.00%; N, 5.31%.

ESI(+)-MS: m/z: 479.02 {100%, $[Cu(DPODC)_2]^+$ }

UV-Vis: max 273 nm, 434 nm

A3.4.8 Sintesi e caratterizzazione di $[Cu(DBODC)_2]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>Densità(g/mL)</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	76.14	0.704	53.6	4	1.266	42
N,N-etossietilammina	161.24	0.352	56.8	2	0.885	64
NaOH	39.99	0.704	28.1	4		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.45	0.176	30	1		

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo B.

Resa: 87.7%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, parzialmente solubile negli alcoli, insolubile in H₂O, acetonitrile, n-esano.

TLC (C_{18} , CH_3CN): $R_f = 0.5$

HPLC (A H_2O , B CH_3CN ; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): $t_r = 17.2$ min

AE: calc. per $C_{18}H_{36}CuN_2O_2S_4$ (MW: 536.30): C, 40.31%; H, 6.77%; N, 5.22%; trovato: C, 40.79%; H, 7.12%; N, 5.10%.

ESI(+)-MS: m/z: 535.09 {100%, $[Cu(DBODC)_2]^+$ }

UV-Vis: max 270 nm, 431 nm

A3.4.9 Sintesi e caratterizzazione di $[Cu(PR13)_2]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	170.45	0.059	10	1
$[Zn(PR-13)_2]$	449.92	0.059	26.4	1

Il complesso è stato ottenuto in alta resa utilizzando il Metodo D.

Resa: 86.1%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , insolubile in H_2O , alcoli, acetonitrile, n-esano.

TLC (C_{18} , CH_3CN): $R_f = 0.9$

HPLC (A H_2O , B CH_3CN ; 0 min, 50% B; 1-16 min 50-95% B; 16-21 min 95% B; 21-22 min, 50% B): $t_r = 10.1$ min

AE: calc. per $C_{12}H_{20}CuN_2O_2S_4$ (MW: 448.09): C, 32.17%; H, 4.50%; N, 6.25%; trovato: C, 32.51%; H, 4.78%; N, 6.04%.

ESI(+)-MS: m/z: 446.96 {100%, $[Cu(PR13)_2]^+$ }

UV-Vis: max 267 nm, 432 nm

A3.5 Test di vitalità cellulare

Tutte le linee cellulari utilizzate in questo studio sono state fornite dal laboratorio della Prof.ssa Cristina Marzano e della Dr.ssa Valentina Gandin, del Dipartimento di Scienze del Farmaco di Padova.

A3.5.1 Linee cellulari e condizioni di crescita

La linea cellulare HCT-15 rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma colon-rettale avente tempo di duplicazione di 22 ore.

La linea cellulare MCF-7 corrisponde ad una linea cellulare umana di tumore alla mammella, avente tempo di duplicazione di 29 ore.

La linea cellulare A431 corrisponde ad una linea cellulare umana di carcinoma della cervice uterina avente tempo di duplicazione di circa 24 ore.

La linea cellulare A549 corrisponde ad una linea cellulare umana di carcinoma polmonare “non a piccole cellule” avente tempo di duplicazione di circa 22 ore.

La linea cellulare 2008 corrisponde ad una linea cellulare di carcinoma ovarico umano avente tempo di duplicazione di circa 24 ore mentre C13* corrisponde alla variante resistente al cis-platino.

Tutte le cellule descritte crescono in adesione al substrato e vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici e del 10% di siero fetale bovino. Le colture sono preparate in fiasche da 25 cm² o da 75 cm² e mantenute in fase logaritmica a 37 °C in stufa termostatica a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO₂ e in ambiente fortemente umidificato.

A3.5.2 MTT Test

Il test dell'MTT è ampiamente utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare nei protocolli di *drug screening*⁽¹⁵⁴⁾. Questo test si basa sulla capacità delle cellule di ridurre un sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), ad opera di un enzima respiratorio mitocondriale, la succinato tetrazolio reduttasi⁽⁵⁵⁾. Tale riduzione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, nelle quali risulta compromessa la funzione mitocondriale, determinante per la trasformazione dell'indicatore. La riduzione dell'MTT comporta, oltre che una modifica strutturale, anche un cambiamento di colore dell'indicatore, da giallo a blu-viola. Le cellule (3·10³ per pozzetto nel caso di 2008 e C13*; 5·10³ per tutte le altre linee cellulari) vengono seminate in micropiastre da 96 pozzetti in 90 µl

di terreno ed incubate a 37 °C in atmosfera controllata. Dopo 24 ore, le cellule sono trattate in triplo con concentrazioni crescenti del complesso da testare e nuovamente incubate (il test è stato eseguito anche dopo 72 ore). Trascorso il tempo di contatto previsto, a ciascun pozzetto vengono aggiunti 10 µL di una soluzione salina 5 mg/ml di MTT in PBS. Dopo 5 ore di incubazione, ogni pozzetto è trattato con 100 µL di una soluzione al 10% di SDS in HCl 0.01 M. Si lascia quindi incubare *overnight*. Il giorno seguente, la piastra viene letta mediante lettore BioRad 680 a 570 nm.

A3.6 Sintesi dei complessi del tipo [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] con il tracciante radioattivo ^{64}Cu

Tutte le procedure di produzione, purificazione (effettuate dal Dr. Gianfranco Cicoria) e di manipolazione del radionuclide ^{64}Cu sono state eseguite all'interno dell'unità di Medicina Nucleare dell'Ospedale Sant'Orsola Malpighi di Bologna, con la supervisione del Dr. Stefano Boschi.

^{64}Cu è stato estratto dal target di ^{64}Ni come $^{64}\text{CuCl}_2$ in soluzione acquosa e purificato dal ^{64}Ni per mezzo di una colonna cromatografica a scambio ionico.

Una soluzione acquosa di $^{64}\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ è stata preparata diluendo la soluzione acquosa di $^{64}\text{CuCl}_2$ in 1 M HCl con un ugual volume di una soluzione di acetato di sodio 3M a pH 5.5. Questa soluzione, così ottenuta, è stata usata per gli esperimenti di marcatura.

I leganti utilizzati per gli esperimenti di marcatura sono: DEDC NH^{4+} , PDTC NH^{4+} , DTC-L16 sale di carbossietilpiperidinio, PIPE-1 Na^+ e $[\text{Zn}(\text{PR13})_2]$.

Metodo 1 (soluzione idro-alcolica): DTC-Ln (1 mg/0.1 mL H_2O o DMSO) è stato aggiunto ad una provetta di propilene contenente $^{64}\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0.5 mL, 37 MBq) e etanolo (0.5 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente e la formazione del complesso [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] è stata osservata dopo 15 minuti.

La reazione di marcatura è stata condotta in un range di pH 1-6.

La formazione del prodotto è stata verificata per via cromatografica HPLC con una colonna RP-C8 Symmetry (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min. Condizioni cromatografiche: solvente A H_2O , solvente B CH_3CN . Gradiente: 0 min, %B = 50; 1-16 min, %B = 95; 16-21 min, %B = 95; 21-22 min, %B = 50.

Metodo 2 (soluzione acquosa): DTC-Ln (10 μg /0.12 mL H_2O) è stato aggiunto ad una provetta di propilene contenente $^{64}\text{Cu}^{2+}$ (0.5 mL, 37 MBq), MES 1.5 M (0.15 mL), γ -ciclodestrina 12,5 mg/mL (0.08 mL). Il volume finale della reazione è 0.5 ml e il pH 6. La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente e la formazione del complesso [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] è stata osservata dopo 15 minuti.

La formazione del prodotto è stata verificata per via cromatografica HPLC con una colonna RP-C18 Symmetry300TM (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min. Condizioni cromatografiche: solvente A H_2O 0.1% TFA, solvente B CH_3CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.7 Efficienza di marcatura

L'efficienza di marcatura dei leganti DEDC NH^{4+} e PDTC NH^{4+} è stata determinata seguendo le operazioni di marcatura descritte nel paragrafo precedente, Metodo 2. La concentrazione dei due leganti è stata progressivamente diminuita in un range tra 1 mg (6×10^{-3} mmol) - 1 μg (6×10^{-6} mmol). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente e la formazione del complesso $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ è stata osservata dopo 15 minuti.

La formazione del prodotto è stata verificata per via cromatografica HPLC con una colonna RP-C8 Symmetry ($5\mu\text{m}$ 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min. Condizioni cromatografiche: solvente A H_2O , solvente B CH_3CN . Gradiente: 0 min, %B = 50; 1-16 min, %B = 95; 16-21 min, %B = 95; 21-22 min, %B = 50.7

A3.8 Purificazione dei complessi $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDTC})_2]$ e $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$

I composti sono stati purificati dall'eccesso dei reagenti presenti in soluzione attraverso la seguente metodica. Una cartuccia C18 (Sep-Pak, Waters) è stata attivata con 5 mL di etanolo seguiti da 5 mL di H_2O . Il prodotto radioattivo, diluito con 2 mL di acqua, è stato caricato sulla cartuccia. Circa il 95% della radioattività inizialmente caricata viene trattenuta dalla cartuccia. Dopo lavaggio della cartuccia con soluzione salina (20 mL) e etanolo al 30% (5 mL), il complesso è stato eluito utilizzando una miscela etanolo/salina 90/10 (1.5 mL). Il 90% della radioattività caricata viene raccolta. La purezza del prodotto, determinata per via cromatografica, è superiore al 98%. Il prodotto è stato diluito in PBS (tampone fosfato salino) per ottenere una soluzione isotonica contenente meno del 10% di etanolo. Tale soluzione viene è stata usata per studi di stabilità *in vitro* del complesso.

A3.9 Studi di stabilità *in vitro*

La stabilità dei complessi [$^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$] e [$^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$], una volta purificati, è stata valutata nei confronti di reazioni di traschelazione e transmetallazione, in siero umano, nel terreno di coltura cellulare RPMI-1640 e nel *buffer* utilizzato per la lisi cellulare.

Studi di transchelazione: gli esperimenti di transchelazione sono stati condotti sui complessi purificati impiegando un eccesso di glutatione (GSH), cisteina (Cys), Istidina (His) ed EDTA. Un'aliquota (50 μL) di una soluzione acquosa di GSH 10mM è stata aggiunta ad una provetta di propilene contenente PBS (400 μL , pH 7.4) e il complesso (50 μL). La miscela è stato incubata a 37°C per 24 ore. In parallelo è stata studiata una reazione di controllo, contenente un volume uguale di acqua al posto di GSH. Aliquote della miscela di reazione sono controllate per via cromatografica a 30 minuti, 1, 3 e 24 ore. Una procedura simile è stata applicata utilizzando cisteina (50 μL , 10mM), istidina (50 μL , 10mM) ed EDTA (50 μL , 10 e 1 mM).

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O, solvente B CH₃CN. Gradiente: 0 min, %B = 50; 1-16 min, %B = 95; 16-21 min, %B = 95; 21-22 min, %B = 50.

Studi di transmetallazione: Gli esperimenti di transmetallazione sono stati condotti incubando il prodotto purificato [$^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$] con un eccesso di $^{63/65}\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o di ZnSO₄. Un'aliquota (50 μL) di una soluzione acquosa di CuCl₂·2H₂O 1mM è stata aggiunta ad una provetta di propilene contenente PBS (400 μL , pH 7.4) e il complesso (50 μL). La miscela è stato incubata a 37°C per 24 ore. In parallelo è stata studiata una reazione di controllo, contenente un volume uguale di acqua al posto di CuCl₂·2H₂O. Aliquote della miscela di reazione sono controllate per via cromatografica a 30 minuti, 1, 3 e 24 ore. Una procedura simile è stata applicata utilizzando ZnSO₄ (50 μL , 10 e 1 mM).

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O, solvente B CH₃CN. Gradiente: 0 min, %B = 50; 1-16 min, %B = 95; 16-21 min, %B = 95; 21-22 min, %B = 50.

Studi in siero umano: 50 μL di prodotto radiomarcato (modalità *carrier free*) oppure 50 μL di prodotto radiomarcato e 10 μL di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO (modalità *carrier added*) sono incubati con 450 μL di siero umano a 37° per 30 minuti. Aliquote di 100 μL sono state prelevate a 5, 15 e 30 minuti. Le aliquote prelevate sono state trattate con 250 μL di etanolo per provocare la precipitazione delle proteine sieriche e quindi centrifugate a 12000 giri/min per 3 minuti. L'operazione viene ripetuta una seconda volta e i surnatanti sono riuniti. Viene contata la radioattività presente nel *pellet* proteico e nel surnatante che è anche controllato per via cromatografica TLC e HPLC.

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

Terreno di coltura: 10 μ l di prodotto radiomarcato oppure .10 μ l di prodotto radiomarcato e 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO sono incubati con 100 μ l di terreno di coltura RPMI-1640 a 37° per un'ora. Aliquote di 100 μ l sono state prelevate dopo 30 minuti e un'ora.

Le aliquote prelevate sono state centrifugate a 4°C, 500 giri/min per 5 minuti. La purezza del composto nel surnatante è stata controllata per via cromatografica.

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

Buffer di lisi: 10 μ l di prodotto radiomarcato oppure 10 μ l di prodotto radiomarcato e 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO sono incubati con 100 μ l di *buffer* di lisi a 37° per un'ora. Aliquote di 100 μ l sono state prelevate dopo 30 minuti e un'ora.

Aliquote delle miscele sono controllate per via cromatografica a 15 e 30 minuti.

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.10 Esperimenti di *uptake* in cellule tumorali MCF-7

Uptake dei complessi non radioattivi: $5 \cdot 10^6$ cellule di tumore alla mammella MCF7 sospese in 2 ml di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per 3 ore con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del composto è 10 μ M. Dopo 1, 2 e 3 ore sono state prelevate delle aliquote, centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è stato separato dal *pellet* cellulare e controllato per via cromatografica HPLC.

Uptake in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule di tumore alla mammella MCF7 sospese in 2 ml di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per 1 ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$]. Dopo un'ora di incubazione la sospensione cellulare è centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Uptake in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule di tumore alla mammella MCF7 sospese in 2 ml di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per 1 ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del composto è 10 μ M. Dopo un'ora di incubazione la sospensione cellulare è centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.11 Esperimenti di *uptake* temperatura dipendente in cellule tumorali MCF-7

Uptake in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 4°C per due ore con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$].

Dopo 15, 30, 60 e 120 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto incubando le cellule MCF7 a 37°C per due ore.

Uptake in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 4°C per due ore con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del composto è 10 μ M.

Dopo 15, 30, 60 e 120 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto incubando le cellule MCF7 a 37°C per due ore.

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.12 Esperimenti di competizione per i trasportatori del rame in cellule tumorali MCF-7

A3.12.1 Inibizione di hCTR1

Uptake in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e 10 μ l di una soluzione acquosa 2 mM di AgNO_3 . La concentrazione finale dello ione Ag^+ è 10 μM .

Dopo un'ora la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto in assenza di AgNO_3 .

Uptake in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per due ore con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$], con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO e con 10 μL di una soluzione acquosa 2 mM di AgNO_3 . La concentrazione finale del complesso di rame e dello ione Ag^+ è 10 μM .

Dopo un'ora la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto in assenza di AgNO_3 .

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5 μm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H_2O 0.1% TFA, solvente B CH_3CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.12.2 Inibizione di DMT1

$5 \cdot 10^6$ cellule di tumore alla mammella MCF-7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO e 10 μ l di una soluzione acquosa 2 mM di ZnSO_4 . La concentrazione finale del complesso e dello ione Zn^{2+} è 10 μM . Dopo un'ora la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare e controllato per via cromatografica HPLC e TLC.

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.13 Esperimento di *uptake* a concentrazioni crescenti in cellule tumorali MCF-7

5 \cdot 10⁶ cellule di tumore alla mammella MCF-7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per due ore con 10 μ l di una soluzione 6 mM di [^{63/65}Cu(DTC-Ln)₂] in DMSO. La concentrazione finale del complesso è 30 μ M.

In modo analogo utilizzando 20 μ l di soluzioni 6, 8 e 10 mM di [^{63/65}Cu(DTC-Ln)₂] in DMSO si ottengono concentrazioni finali rispettivamente di 60, 80 e 100 μ M.

In tutti i casi, dopo 15, 30, 60 e 120 minuti sono state prelevate delle aliquote e la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare e controllato per via cromatografica HPLC e TLC

Condizioni cromatografiche: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.14 Esperimenti di efflusso in cellule tumorali MCF-7

Cinetica di efflusso in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$]. Dopo un'ora la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) e risospeso con 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640. Dopo 30 e 60 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Cinetica di efflusso in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del complesso è 10 μ M.

Dopo un'ora la sospensione cellulare viene centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) e risospeso con 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640. Dopo 30 e 60 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.15 Esperimenti di *uptake* in cellule non tumorali HEK

Uptake in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule HEK sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per due ore con 10 µl del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$].

Dopo 15, 30, 60 e 120 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto incubando le cellule HEK a 4°C per due ore.

Gli esperimenti di *uptake* in "carrier free" a 4°C e 37°C sono stati contemporaneamente effettuati anche su cellule di tumore alla mammella MCF7.

Uptake in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule HEK sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per due ore con 10 µl del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e con 10 µl di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del composto è 10 µM.

Dopo 15, 30, 60 e 120 minuti sono state prelevate delle aliquote e centrifugate a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare, controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività contenuta. Il *pellet* cellulare è lavato con tampone fosfato salino (PBS) ed è contata la radioattività presente.

Lo stesso esperimento è stato condotto incubando le cellule MCF-7 a 4°C per due ore.

Gli esperimenti di *uptake* in *carrier added* a 4°C e 37°C sono stati contemporaneamente effettuati anche su cellule di tumore alla mammella MCF7.

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5µm 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.16 Esperimenti di *uptake* e lisi cellulare

Esperimento in "carrier free": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$]. Dopo un'ora di incubazione la sospensione cellulare è centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare ed è contata la radioattività presente. Il *pellet* cellulare, dopo lavaggio con PBS, è sottoposto ad un trattamento di *shock* termico con due cicli consecutivi di raffreddamento a -20°C e riscaldamento a temperatura ambiente per una durata totale di 40 minuti. Al termine le cellule sono trattate con 800 μ l di buffer di lisi che provoca la lisi delle membrane cellulari. I campioni vengono centrifugati a 4°C, 12000 giri/min per 5 minuti in modo tale da separare il lisato cellulare, contenente il citoplasma e gli organelli cellulari, dal *pellet* costituito dalle membrane cellulari. Il lisato è controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività presente. Il *pellet* è lavato con PBS e impiegato per il conteggio della radioattività contenuta.

Esperimento in "carrier added": $5 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sospese in 2 mL di terreno di coltura RPMI-1640 sono state incubate a 37°C per un'ora con 10 μ l del complesso radiomarcato [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] e con 10 μ l di una soluzione 2 mM di [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] in DMSO. La concentrazione finale del composto è 10 μ M. Dopo un'ora di incubazione la sospensione cellulare è centrifugata a 4°C, 500 giri/min. Il surnatante è separato dal *pellet* cellulare ed è contata la radioattività presente. Il *pellet* cellulare, dopo lavaggio con PBS, è sottoposto ad un trattamento di *shock* termico con due cicli consecutivi di raffreddamento a -20°C e riscaldamento a temperatura ambiente per una durata totale di 40 minuti. Al termine le cellule sono trattate con 800 μ l di buffer di lisi che provoca la lisi delle membrane cellulari. I campioni vengono centrifugati a 4°C, 12000 giri/min per 5 minuti in modo tale da separare il lisato cellulare, contenente il citoplasma e gli organelli cellulari, dal *pellet* costituito dalle membrane cellulari. Il lisato è controllato per via cromatografica HPLC e TLC ed è contata la radioattività presente. Il *pellet* è lavato con PBS e impiegato per il conteggio della radioattività contenuta.

Condizioni cromatografiche in tutti gli esperimenti: colonna RP-C8 Symmetry (5 μ m 4.6x250 mm), flusso 1 mL/min; solvente A H₂O 0.1% TFA, solvente B CH₃CN 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

A3.17 Accumulo di rame nelle cellule tumorali MCF-7

$2 \cdot 10^6$ cellule MCF7 sono seminate in fiasche da 75 cm^2 e, dopo 24 ore di incubazione a 37°C in atmosfera controllata, sono incubate con il complesso $[\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$. Il monostrato cellulare è stato raccolto, trasferito in provetta graduata e centrifugato a 100 g per 7 minuti. il *pellet* cellulare, dopo lavaggio con PBS, è sottoposto ad un trattamento di *shock* termico con cinque cicli consecutivi di raffreddamento a -20°C e riscaldamento a temperatura ambiente. Successivamente diverse aliquote sono trattate con $100 \mu\text{l}$ di un *buffer* di lisi al 50% che provoca la lisi delle membrane cellulari. I campioni vengono centrifugati a 4°C , 10000g per 15 minuti per 5 minuti in modo tale da separare il lisato cellulare, contenente il citoplasma e gli organelli cellulari, dal *pellet* costituito dalle membrane cellulari. Aliquote di lisato cellulare sono state analizzate mediante lettura spettrofotometrica a 570 nm ed è stato possibile ricavare il contenuto totale di proteine in ogni campione attraverso il test di Bradford (BioRad).

In seguito i campioni sono stati aggiunti di $200 \mu\text{L}$ di acido nitrico ultra puro ($\text{Cu} \leq 0,5 \text{ ug/Kg}$), lasciandoli mineralizzare *overnight* per eliminare la componente organica.

La quantità di rame internalizzata dalle cellule di ciascun campione è stata ricavata attraverso GF-AAS ad una lunghezza d'onda di 327.4 nm . I valori ottenuti, espressi in ng/L di Cu, sono stati riportati alla quantità di proteine calcolata nei diversi campioni al fine di ricavare i ng di rame/ mL / mg di proteina.

Lo stesso tipo di esperimento è stato condotto con cellule 2008 e C13*.

Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti anche in assenza del complesso come controllo e in presenza del ditiocarbammato non complessato DEDC NH_4^+ .

A4 RISULTATI E DISCUSSIONE

A4.1 Sintesi e caratterizzazione dei leganti ditiocarbammici

In generale i leganti ditiocarbammici sono stati preparati attraverso una semplice procedura sintetica che permette la conversione dei gruppi amminici primari o secondari in ditiocarbammati, attraverso l'attacco dell'azoto amminico, nucleofilo, al carbonio elettrofilo del solfuro di carbonio (CS_2) (Figura A32).

Le ammine di partenza e i prodotti ottenuti sono riportati in Tabella 6. I solventi utilizzati per questo tipo di reazioni sono solventi polari, quali etanolo, metanolo o acqua. Scelti grazie alla loro capacità di solvatare la coppia ionica ditiocarbammato-catione che si viene a formare, permettendo il procedere dell'equilibrio di reazione verso destra. Inoltre, la reazione è favorita da un ambiente basico, in quanto vi è la liberazione di un protone che può essere neutralizzato. Durante la procedura di sintesi è stato utilizzato come base l'idrossido di sodio (NaOH).

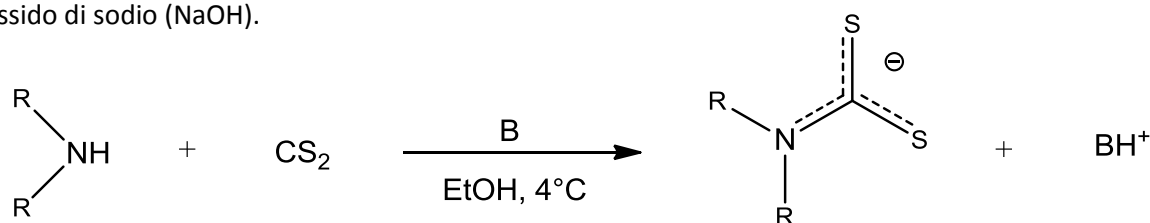
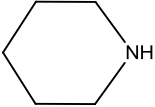
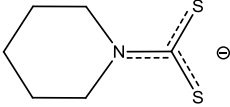
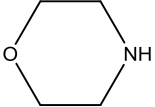
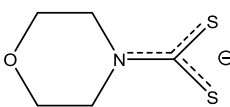
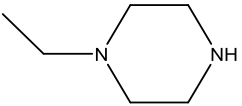
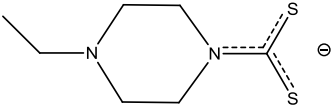
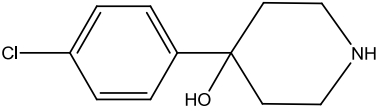
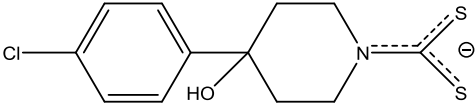
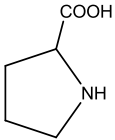
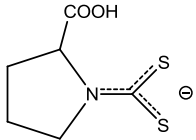
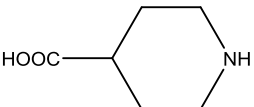
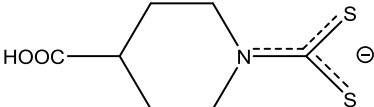
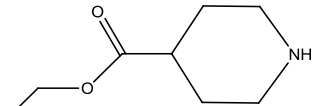
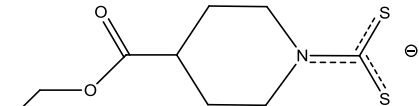

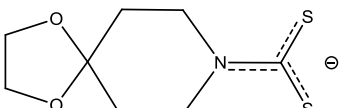
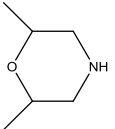
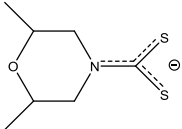
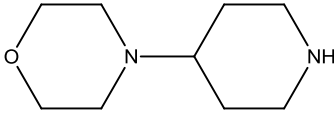
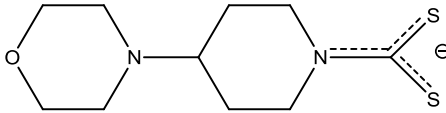
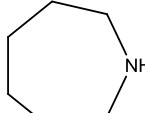
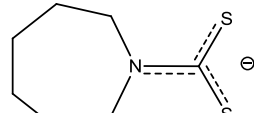
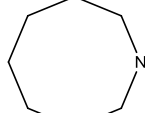
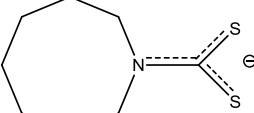
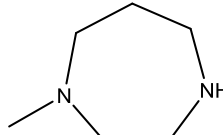
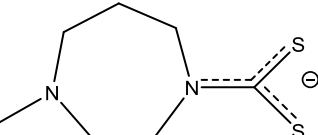
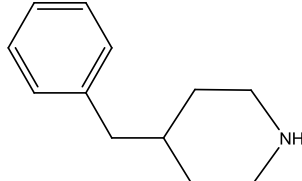
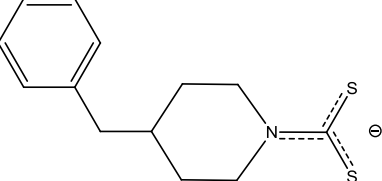
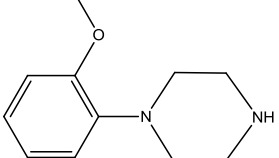
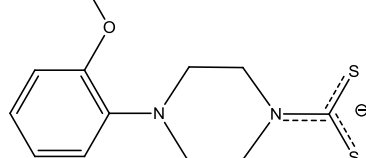
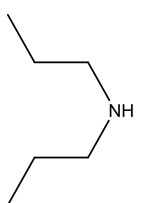
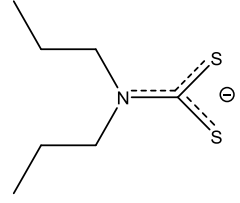


Fig. A32. Schema generale di sintesi di un ditiocarbammato

I leganti sintetizzati in questo lavoro sono riportati in Tabella A1.

Ammina di partenza	Ditiocarbammato
 <p>Piperidina</p>	 <p>DTC-L2</p>
 <p>Morfolina</p>	 <p>DTC-L3</p>
 <p>Etilpiperazina</p>	 <p>DTC-L4</p>
 <p>4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidina</p>	 <p>DTC-L9</p>
 <p>Prolina</p>	 <p>DTC-L10</p>
 <p>4-carbossi-piperidina</p>	 <p>DTC-L13</p>
 <p>4-etossicarbonil-piperidina</p>	 <p>DTC-L16</p>
 <p>1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]-decano</p>	 <p>DTC-L17</p>
 <p>3,5-dimetil-morfolina</p>	 <p>DTC-L19</p>

 <p>4-morfolinopiperidina</p>	 <p>DTC-L20</p>
 <p>Esametilenimina</p>	 <p>DTC-L22</p>
 <p>Eptametenimina</p>	 <p>DTC-L23</p>
 <p>4-N-4-metil-esametilenimina</p>	 <p>DTC-L24</p>
 <p>4-benzilpiperidina</p>	 <p>DTC-L25</p>
 <p>2-(metossi)ifenilpiperazina</p>	 <p>PIPE-1</p>
 <p>Dipropilammina</p>	 <p>DPDC</p>

Tab. A1. Elenco dei ditiocarbammati sintetizzati e delle relative ammine di partenza.

I ditiocarbammati sintetizzati sono stati ottenuti in alta resa, ad eccezione di DTC-16. In questo caso particolare non è possibile eseguire la reazione in ambiente basico, in quanto è possibile che si verifichi l'idrolisi basica del gruppo estereo legato alla piperidina.

I leganti ottenuti sono stati caratterizzati tramite analisi elementare, spettrometria di massa ESI(-) e spettroscopia NMR monodimensionale (^1H , ^{13}C) e bidimensionale (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC). L'analisi elementare dei diversi leganti (DTC-Ln) risulta in perfetto accordo con la formulazione proposta. Gli spettri di massa ESI(-) sono di immediata interpretazione, non evidenziano alcuna frammentazione e si apprezza un unico segnale ad m/z corrispondente all'esatto peso molecolare del ditiocarbammato non salificato (Figura A33).

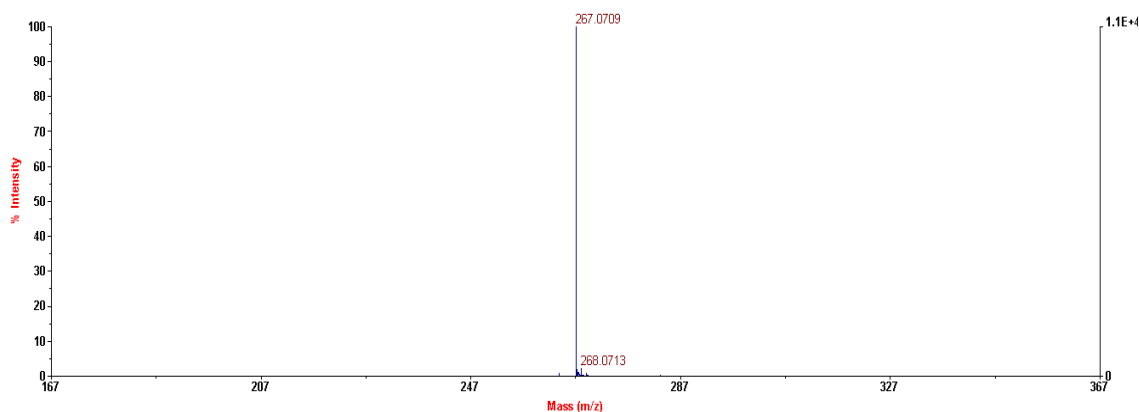


Fig. A33. Spettro di massa ESI(-) di PIPE-1.

Per quanto riguarda l'analisi NMR, gli spettri ^1H NMR non differiscono significativamente dagli spettri delle relative ammine di partenza. Negli spettri ^{13}C NMR un segnale diagnostico della formazione del ditiocarbammato è quello relativo al carbonio quaternario (CS_2), che cade in genere tra i 190 e i 220 ppm. Dal momento che si tratta di un segnale a bassa intensità, è stato utile eseguire l'analisi bidimensionale ^1H - ^{13}C HMBC nel quale si evidenzia un picco di correlazione *long-range* con i protoni in α all'azoto e il carbonio quaternario del ditiocarbammato con i quali accoppia secondo una $^3J_{\text{CH}}$, come evidenziato nel caso di DTC-L17 in Figura A34.

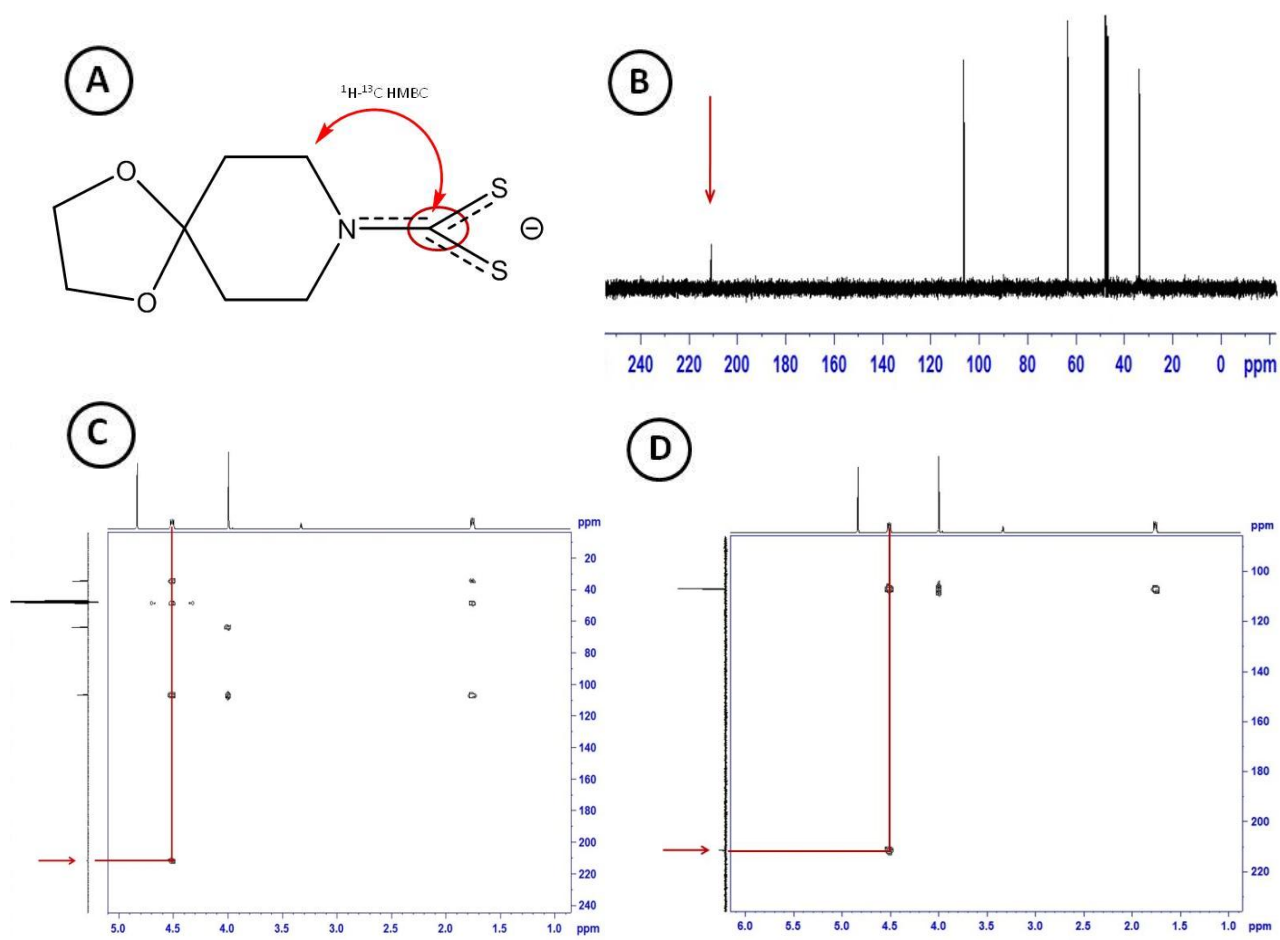


Fig. A34. Caratterizzazione NMR del legante DTC-L17. A) Struttura del ditiocarbammato con in evidenza la correlazione ^1H - ^{13}C HMBC tra carbonio ditiocarbammico e i protoni in α all'atomo di azoto. B) Spettro ^{13}C -NMR in cui si evidenzia il segnale relativo al CS_2 . C) Spettro ^1H - ^{13}C HMBC in cui è sottolineata la correlazione *long range* tra carbonio ditiocarbammico e i protoni in α all'atomo di azoto. D) Ingrandimento della zona di principale interesse dello spettro ^1H - ^{13}C HMBC.

Nella sintesi di DTC-L16 la presenza del gruppo estereo non permette di utilizzare condizioni di reazione estremamente basiche, causate dall'uso di idrossidi, in quanto ne determinerebbero una rapida idrolisi, con conseguente abbattimento della resa di reazione.

Per risolvere questo problema, la reazione viene condotta in assenza di idrossido e il ditiocarbammato che si ottiene forma una coppia ionica con l'ammina di partenza protonata, che in questo modo non è più disponibile ad attaccare ulteriormente il CS_2 , come indicato in Figura A35. Per questo motivo si ottengono valori di resa massima di poco inferiori al 50%. I dati NMR confermano la formazione del legante come sale di 4-carbossietilpiperidinio, come evidenziato dallo spettro ^1H di cui è possibile apprezzare la presenza dei picchi relativi al catione amminico (Figura A36).

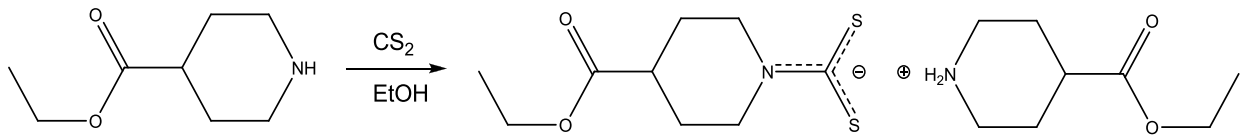


Fig. A35. Schema di sintesi di DTC-L16

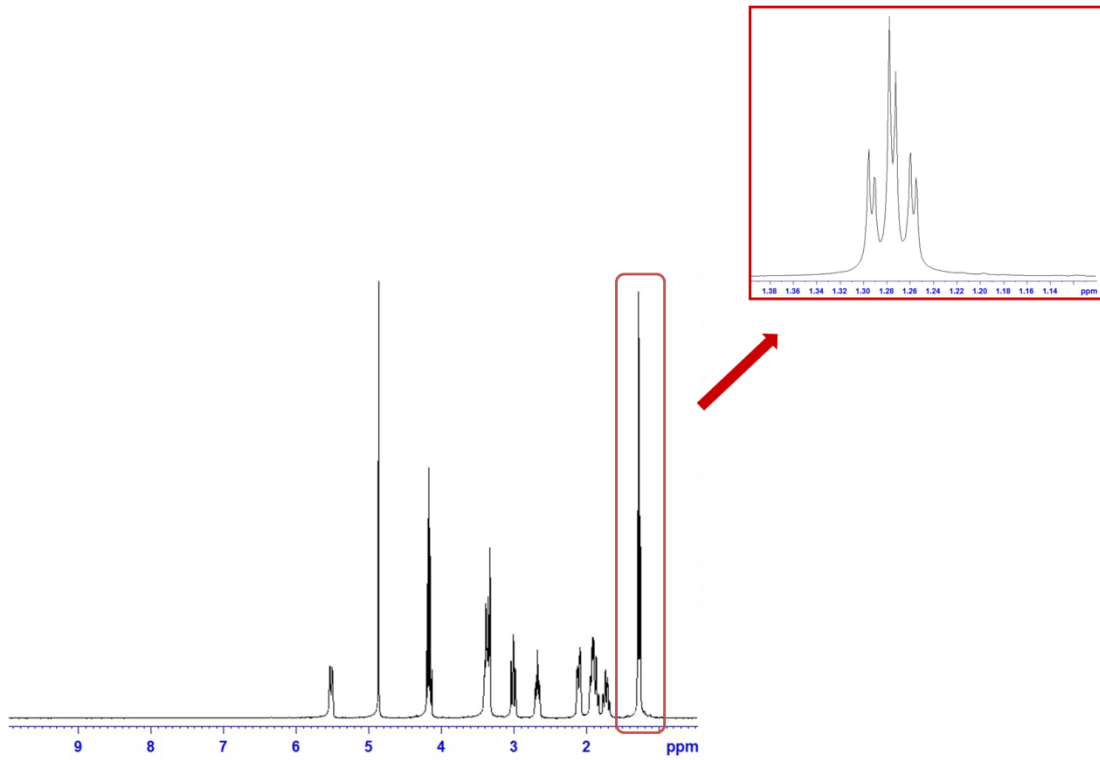


Fig. A36. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di DTC-L16. Nell'ingrandimento è evidenziato lo sdoppiamento del picco relativo al gruppo $-\text{CH}_3$ dovuto alla presenza del catione 4-carbossietilpiperidinio.

A4.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi del tipo [$^{63/65}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$]

La sintesi dei complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ con leganti ditiocarbammici ciclici è stata effettuata aggiungendo il sale di rame CuCl_2 ad una soluzione acquosa del ditiocarbammato scelto ed utilizzato in rapporto metallo-legante 1:2 (Figura A37). In alcuni casi la reazione è stata eseguita in metanolo dal momento che alcuni dei ditiocarbammati utilizzati non erano solubili in ambiente acquoso. La reazione avviene istantaneamente a temperatura ambiente con la semplice formazione del legame di coordinazione tra i 2 atomi di zolfo dei leganti bidentati e lo ione metallico, con la formazione di un complesso a numero di coordinazione 6 in cui la sfera di coordinazione è completata dai 4 atomi di zolfo.

Sono state valutate due ulteriori procedure sintetiche alternative allo scopo di testare condizioni di reazione simili a quelle che possono essere utilizzate nelle reazioni di marcatura con il radionuclide ^{64}Cu .

La procedura di produzione e purificazione di questo radioisotopo comporta, infatti, che ^{64}Cu sia disponibile in soluzione acida come ione Cu^{2+} dal momento che viene purificato attraverso eluizione di una colonna a scambio ionico con una soluzione di acido cloridrico (HCl) 1M.

Per questo motivo il sale di rame CuCl_2 è stato sciolto in una soluzione di HCl 1 M ma in questo modo non può essere direttamente aggiunta una soluzione acquosa del legante ditiocarbammico dal momento che quest'ultimo in ambiente acido va incontro a degradazione con liberazione del solfuro di carbonio (CS_2) e dell'ammina libera corrispondente. Per questo il ditiocarbammato scelto è stato sciolto in una soluzione di acetato di sodio 3M, come riportato nelle reazioni di marcatura con altri leganti labili a pH acido, allo scopo di ottenere un sistema tampone che permetta di effettuare la reazione di complessazione a valori di pH blandamente acidi, prossimi al fisiologico.

Con un obiettivo analogo nell'ultima procedura sintetica approfondita il ditiocarbammato è stato sciolto in una soluzione di glicina 0.2 M, che è il sistema utilizzato nella marcatura di ^{64}Cu con ATSM per la produzione dell'unico agente di *imaging* a base di ^{64}Cu attualmente in sperimentazione clinica.

In entrambi i casi i complessi sono ottenuti in alta resa e a temperatura ambiente senza evidenti variazioni rispetto alle reazioni di sintesi effettuata in ambiente acquoso e pH autogeno. L'acetato di sodio e la glicina sono quindi in grado di consentire il normale andamento della reazione di complessazione senza competere con il ditiocarbammato nella coordinazione del centro metallico.

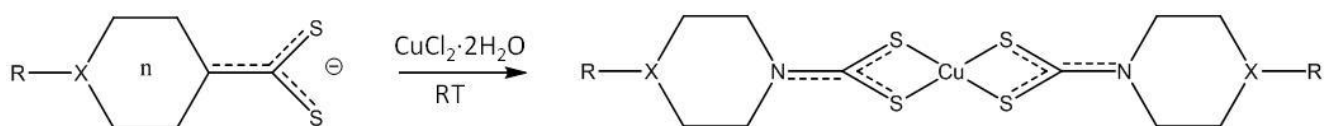


Fig. A37. Schema di sintesi di un complesso di rame del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ con un ditiocarbammato ciclico.

Per quanto riguarda invece la sintesi dei complessi con ditiocarbammati lineari, poiché la purificazione dei leganti è risultata in molti casi difficoltosa, si è deciso di sintetizzare direttamente i complessi senza passare per l'isolamento del ditiocarbammato, come riportato nello schema di sintesi in Figura A38.

In questo particolare caso, la sintesi è stata condotta in ambiente idroalcolico, in modo tale da favorire, in seguito all'aggiunta di CuCl_2 , la precipitazione dei corrispondenti complessi dal momento che questa classe di composti è caratterizzata da una discreta solubilità in etanolo. Non è stato possibile lavorare in un ambiente totalmente acquoso perché CS_2 , decisamente lipofilo, richiede una certa componente alcolica per rimanere in soluzione senza che si osservi alcuna separazione di fase che impedirebbe la formazione della funzione ditiocarbammica.

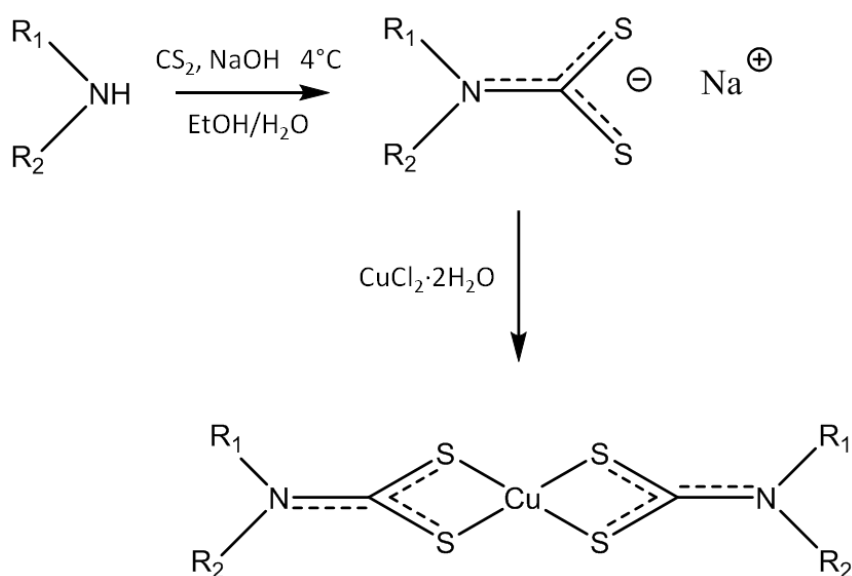


Fig. A38. Schema di sintesi di un complesso di rame del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ con un ditiocarbammato lineare.

È da sottolineare, infine, il caso dei due leganti $[\text{Zn}(\text{Pr-13})_2]$ e DTC-L15 che hanno richiesto delle procedure sintetiche differenti. $[\text{Zn}(\text{Pr-13})_2]$ è un complesso di zinco che è stato sfruttato per verificare la possibilità che l'analogo complesso di rame si possa formare anche in seguito ad una reazione di transmetallazione. Una volta aggiunta una soluzione di CuCl_2 la reazione di transmetallazione è effettivamente molto rapida e in pochi minuti porta alla quantitativa formazione del complesso di rame (Figura A39). Questo comportamento è particolarmente interessante dal momento che indica come il rame sia più affine dello zinco per questo tipo di leganti e ciò potrebbe essere molto importante per evitare fenomeni di transmetallazione nei fluidi biologici.

Per quanto riguarda DTC-L15, il fatto che l'ammina di partenza fosse disponibile in forma cloridrata, ha creato alcune difficoltà per quanto riguarda la sintesi e l'isolamento del corrispondente ditiocarbammato. Nella sintesi del legante, in seguito all'aggiunta dell'ammina nella soluzione alcalina di NaOH , lentamente si apprezza la formazione di un precipitato, dovuto molto probabilmente alla formazione di NaCl , che risulta

molto poco solubile in alcol. La soluzione è stata quindi centrifugata ed è stato separato il surnatante dal precipitato. Il surnatante, contenente l'ammina libera in ambiente comunque alcalino dal momento che l'idrossido di sodio viene utilizzato in eccesso, è stata utilizzato per produrre il ditiocarbammato e, senza passare per l'isolamento di quest'ultimo, si è aggiunto il sale di rame che ha portato all'immediata formazione del complesso desiderato. In Figura A40 è mostrato lo schema di sintesi per il complesso $[\text{Cu}(\text{DTC-L15})_2]$.

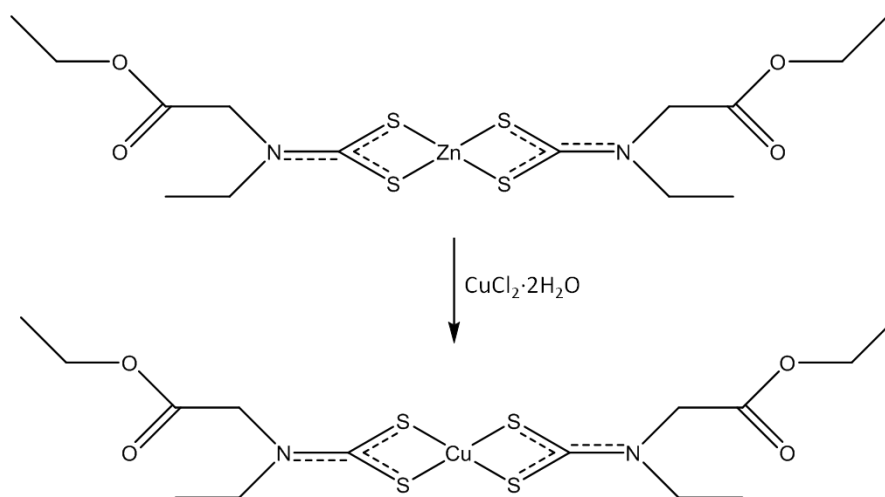


Fig. A39. La reazione di transmetalazione nella sintesi di $[\text{Cu}(\text{PR13})_2]$

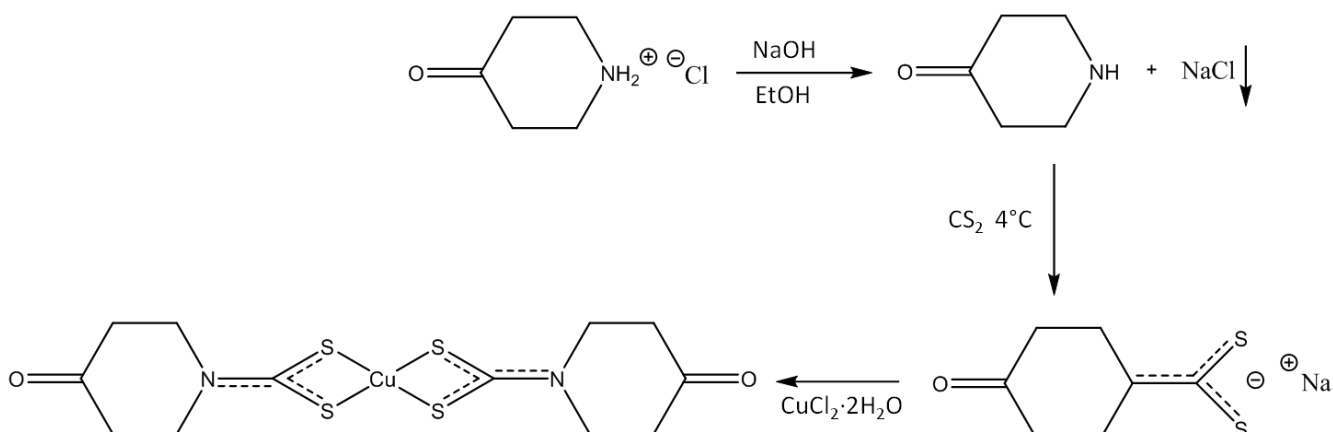


Fig. A40. Schema di sintesi di $[\text{Cu}(\text{DTC-L15})_2]$

Tutti i complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ sono stati ottenuti in alta resa (80-90%) nei diversi ambienti di reazione e sono stati caratterizzati mediante analisi elementare, spettroscopia IR, spettrometria di massa ESI(+) e spettrofotometria UV-Vis.

In tutti i casi l'analisi dei complessi risulta essere in accordo con la formulazione proposta.

L'analisi di spettrometria di massa ESI(+) non dovrebbe essere la tecnica analitica più idonea per questa classe di prodotti, dal momento che sono neutri e, ad eccezione di $[\text{Cu}(\text{DTC-L4})_2]$, privi di gruppi potenzialmente protonabili. Nonostante questo, è stato possibile identificare alcuni dei complessi per i quali l'analisi spettrometrica ha rivelato un segnale a valore di m/z corrispondente al peso molecolare della specie indagata. In particolare, si osserva un unico segnale, con *pattern* isotopico caratteristico del rame, attribuibile alla specie $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]^+$ monocationica non protonata, come nell'esempio di Figura A41. Questo dato è unicamente giustificabile ritenendo che in camera di ionizzazione si verifichi l'estrazione di un elettrone dal metallo determinata dalla differenza di potenziale positiva a livello dell'ugello dell'*elettrospray*. La conseguente ossidazione del metallo con passaggio da Cu(II) a Cu(III) conferisce natura cationica alla molecola.

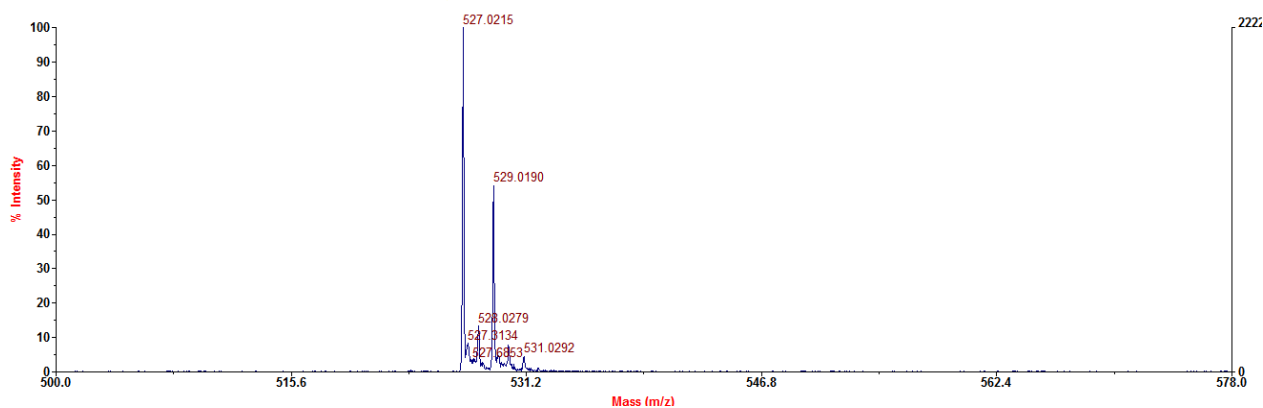


Fig. A41. Segnale ESI(+) relativo al complesso $[\text{Cu}(\text{DTC-L16})_2]$

Per il complesso $[\text{Cu}(\text{DTC-L4})_2]$ si osservano due segnali con *pattern* isotopico tipico del Rame. Il primo è un segnale meno intenso (60%), assegnabile alla specie monocationica $[\text{Cu}(\text{DTC-L4})_2]^+$, mentre il secondo ha una intensità relativa del 100% ed è riconducibile alla specie bicationica monoprottonata (Figura A42). Ciò è in accordo con il fatto che DTC-L4 è un ditiocarbammato diverso dai precedenti, poiché possiede un gruppo amminico terziario che rappresenta effettivamente un sito di potenziale protonazione.

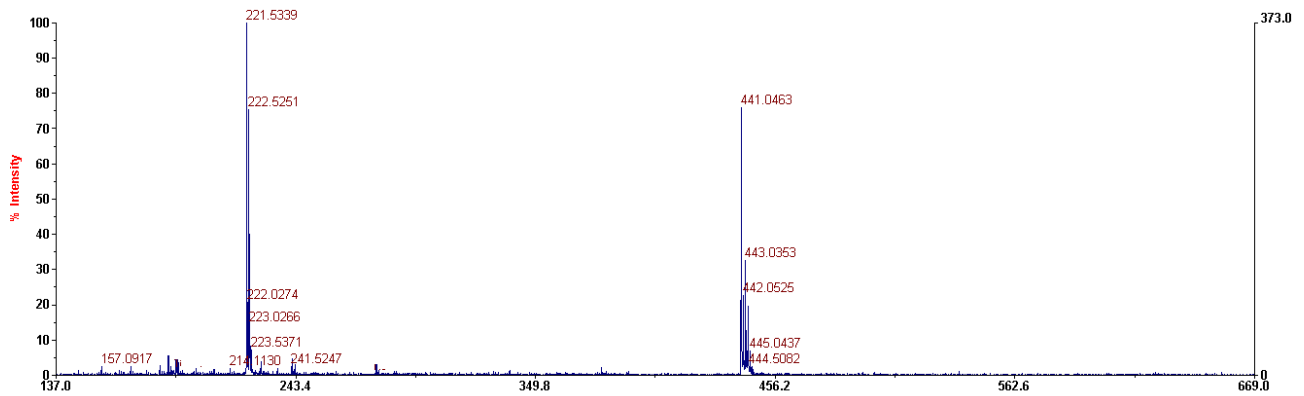


Fig. A42. Spettro di massa ESI(+) del complesso $[\text{Cu}(\text{DTC-L4})_2]$

La spettroscopia IR non è diagnostica per verificare la formazione del complesso poiché lo *stretching* del legame Cu-S avviene a numeri d'onda (circa 250 cm^{-1}), inferiori al limite di rivelazione (400 cm^{-1}) dello strumento a disposizione.

È possibile, comunque, utilizzare tale tecnica di analisi per confermare la presenza dei leganti ditiocarbammici nei prodotti. Gli spettri registrati per i complessi e i leganti liberi sono piuttosto simili a conferma della presenza dei ditiocarbammati nei prodotti finali. Di particolare interesse risultano essere due zone dello spettro (Figura A43). La prima, quella tra 1580 e 1450 cm^{-1} , è la regione in cui si può notare la banda relativa allo *stretching* asimmetrico del legame C-N. Tale banda definisce un ordine di legame intermedio tra C ed N rispetto ad un legame singolo ($1350\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) e un legame doppio ($1690\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$), dovuto alla delocalizzazione elettronica tipica dei ditiocarbammati. Nel passaggio da ditiocarbammato libero a complesso questa banda subisce uno *shift* ad energie più elevate dimostrando un ulteriore incremento del carattere di doppio legame.

La seconda zona, tra 1060 e 940 cm^{-1} , è la regione in cui si osserva la banda di assorbimento relativa allo *stretching* asimmetrico del legame C-S tipico della funzione ditiocarbammica. In particolare per i complessi ottenuti si osserva un'unica banda di assorbimento in questa zona che è diagnostica della presenza di un sistema altamente simmetrico dovuto alla coordinazione di due leganti bidentati al centro metallico. In caso di coordinazione asimmetrica di un solo ditiocarbammato al metallo si sarebbe osservato uno sdoppiamento della banda di assorbimento con una separazione di almeno 20 cm^{-1} ⁽¹⁵⁵⁾.

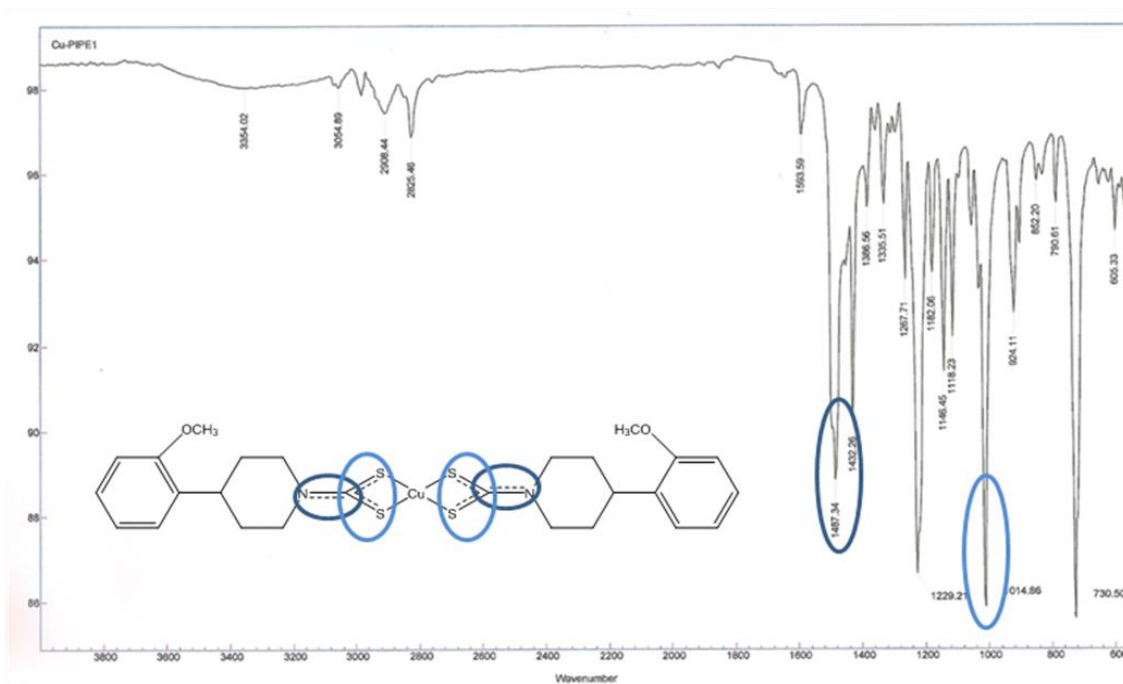


Fig. A43. Spettro IR del complesso $[\text{Cu}(\text{PIPE-1})_2]$. In evidenza le zone dello spettro più interessanti.

I complessi ottenuti presentano degli spettri di assorbimento UV-Vis caratterizzati da un massimo di assorbimento assoluto a circa 270 nm ed un massimo relativo a circa 430 nm. In particolare, il secondo picco di assorbimento è probabilmente dovuto ad una transizione elettronica che avviene tra gli orbitali *d* del metallo che non sono più degeneri a causa della geometria imposta dalla coordinazione dei leganti. Si tratta quindi di una transizione elettronica diagnostica della formazione del complesso.

Non è stato possibile eseguire una caratterizzazione NMR in quanto i complessi di Cu(II) sono paramagnetici.

A4.3 Test di vitalità cellulare

L'attività antitumorale dei complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ è stata valutata su diverse linee cellulari tumorali coltivate *in vitro*. La scelta di utilizzare differenti tipologie di linee cellulari di origine umana è dovuta alla possibilità di stabilire una eventuale specificità d'azione su isotipi diversi.

In particolare lo *screening* ha previsto l'utilizzo delle seguenti linee cellulari tumorali:

- HCT-15, corrisponde ad una linea cellulare umana di adenocarcinoma colon-rettale avente tempo di duplicazione di circa 22 ore
- MCF-7, corrisponde ad una linea cellulare umana di tumore alla mammella avente tempo di duplicazione di circa 29 ore
- A431, corrisponde ad una linea cellulare umana di carcinoma della cervice uterina avente tempo di duplicazione di circa 24 ore
- A549, corrisponde ad una linea cellulare umana di carcinoma polmonare "non a piccole cellule" avente tempo di duplicazione di circa 22 ore.

L'attività citotossica promossa dai complessi è stata testata mediante il test dell'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), un test colorimetrico largamente utilizzato in molti protocolli di *screening* della vitalità cellulare, in funzione dell'attività mitocondriale delle cellule stesse. L'MTT agisce, infatti, come un indicatore che, nelle cellule vive, è ridotto dall'enzima mitocondriale succinato tetrazolio reduttasi formando un cristallo di formazano, insolubile in acqua e di colore viola (Figura A44).

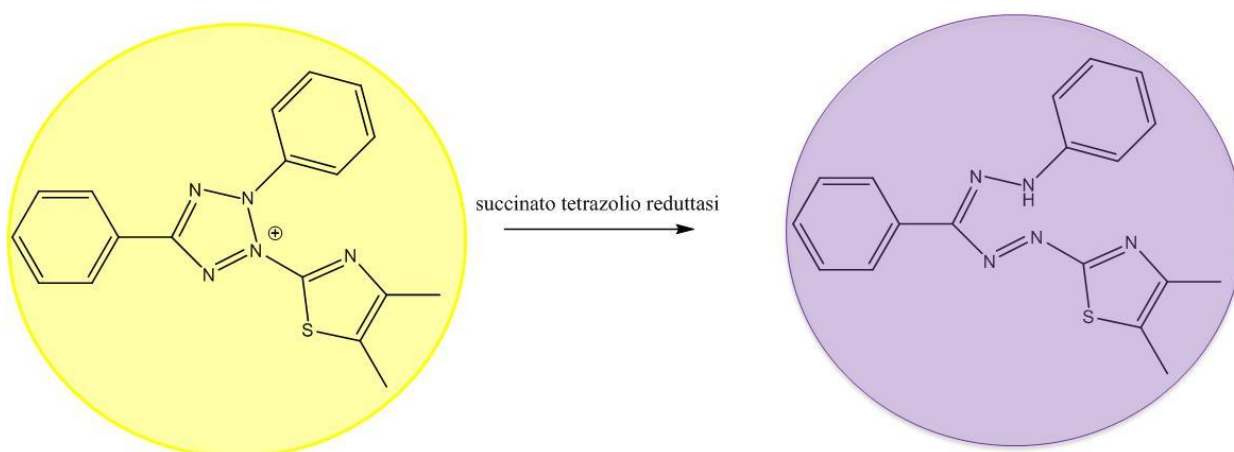


Fig. A44. Riduzione dell'MTT a formazano nelle cellule vive.

Le cellule ($3 \cdot 8 \cdot 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$), in terreno e in condizioni di crescita esponenziale, sono state seminate e trattate per 72 ore con concentrazioni crescenti dei complessi di rame. Al termine dell'esposizione le cellule sono state trattate con MTT per 5 ore e poi lisate *overnight*. Le concentrazioni di formazano sono state

determinate mediante lettura spettrofotometrica a 570 nm. I dati ottenuti sono stati elaborati al fine di ottenere i valori di IC₅₀, ovvero della concentrazione alla quale la vitalità cellulare è diminuita del 50%, che son riportati in Tabella A2.

Sigla	Composto	IC ₅₀ (μM) ± S.D.			
		HCT-15	MCF7	A431	A549
Cu2	[Cu(PDTC) ₂]	0.71 ± 0.54	0.17 ± 0.05	0.36 ± 0.09	0.57 ± 0.17
Cu3	[Cu(DTC-L2) ₂]	0.55 ± 0.03	0.31 ± 0.09	0.37 ± 0.12	0.58 ± 0.19
Cu4	[Cu(DTC-L3) ₂]	15.87 ± 2.05	12.23 ± 2.35	15.33 ± 2.12	11.16 ± 1.32
Cu5	[Cu(DTC-L4) ₂]	6.22 ± 2.05	3.45 ± 1.16	3.23 ± 1.18	4.35 ± 1.15
Cu6	[Cu(DTC-L9) ₂]	1.01 ± 0.25	0.65 ± 0.33	0.45 ± 0.10	0.22 ± 0.08
Cu7	[Cu(DTC-L10) ₂]	21.87 ± 3.26	13.54 ± 4.17	17.64 ± 3.14	8.36 ± 1.27
Cu8	[Cu(DTC-L13) ₂]	12.21 ± 2.63	4.45 ± 2.15	9.74 ± 2.25	3.52 ± 1.24
Cu9	[Cu(DTC-L15) ₂]	1.48 ± 0.32	0.98 ± 0.34	0.56 ± 0.43	1.12 ± 0.74
Cu10	[Cu(DTC-L16) ₂]	1.11 ± 0.63	0.52 ± 0.28	0.32 ± 0.11	0.63 ± 0.15
Cu11	[Cu(DTC-L17) ₂]	0.85 ± 0.32	1.11 ± 0.53	1.52 ± 0.96	2.38 ± 0.87
Cu12	[Cu(DTC-L19) ₂]	4.34 ± 1.25	1.56 ± 0.46	1.18 ± 0.83	0.98 ± 0.23
Cu13	[Cu(DTC-L20) ₂]	13.56 ± 3.14	4.97 ± 2.61	7.52 ± 2.94	5.65 ± 1.86
Cu14	[Cu(DTC-L22) ₂]	0.64 ± 0.13	0.61 ± 0.16	0.28 ± 0.14	0.99 ± 0.35
Cu15	[Cu(DTC-L23) ₂]	3.26 ± 1.32	4.09 ± 2.01	3.59 ± 1.12	3.27 ± 1.15
Cu16	[Cu(DTC-L24) ₂]	1.68 ± 0.35	2.08 ± 1.01	1.19 ± 0.77	1.12 ± 0.71
Cu17	[Cu(DTC-L25) ₂]	6.34 ± 2.05	2.16 ± 1.09	5.69 ± 2.02	4.53 ± 3.11
Cis	Cisplatino	12.34 ± 2.25	8.80 ± 2.31	2.31 ± 0.54	12.64 ± 0.81

Tab. A2. Citotossicità, espressa in valori di IC₅₀, dei complessi con ditiocarbammati ciclici.

I dati, riportati in grafico anche in Figura A45, riguardano la citotossicità dei composti ottenuti con ditiocarbammati ciclici e sono confrontati con quelli relativi al cis-platino, molecola inorganica impiegata diffusamente come agente antitumorale usata come riferimento.

In generale i valori di IC₅₀ ottenuti sono inferiori a quelli del cis-platino e molto interessanti soprattutto per i composti più attivi. Considerando i complessi con leganti ciclici, il complesso più attivo risulta essere [Cu(PDTC)₂], dove il ditiocarbammato presenta un anello pirrolidinico, già descritto in studi precedenti⁽¹⁵⁶⁾ per questo motivo utilizzato come riferimento per questa classe di composti. Tale complesso presenta valori medi di IC₅₀ compresi tra 0.17 e 0.71 μM, inferiori rispetto a quelli ottenuti con il cis-platino ed, in particolare, la linea cellulare MCF-7 risulta essere circa 50 volte più sensibile all'azione di questo complesso (IC₅₀ = 0.17±0.05 μM) rispetto al cis-platino. Dai dati riportati in Tabella A2, si può notare che il complesso

[Cu(DTC-L2)₂] presenta un'attività citotossica paragonabile al complesso di riferimento, con una IC₅₀ media pari circa a 0.5 μM. In questo caso, la sostituzione dell'anello pirrolidinico con una piperidina non comporta modifiche nell'attività citotossica del complesso e, quindi, la diversa natura dell'eterociclo non determina una variazione dell'attività finale del complesso. L'aggiunta di un gruppo carbossilico, quindi di un gruppo facilmente ionizzabile, come avviene nei complessi [Cu(DTC-L10)₂] e [Cu(DTC-L13)₂], comporta una diminuzione significativa dell'attività citotossica rispetto al complesso di riferimento ed, in modo particolare, nel caso di [Cu(DTC-L10)₂], in seguito al legame del gruppo carbossilico all'anello pirrolidinico, si ottengono valori di IC₅₀ molto elevati, che superano addirittura quelli ottenuti con il cis-platino. Al contrario, per i complessi [Cu(DTC-L15)₂] e [Cu(DTC-L16)₂], dove in posizione 4 all'anello piperidinico è legato rispettivamente un gruppo carbonilico e un gruppo carbossietilico, l'attività antiproliferativa viene mantenuta. In entrambi i casi, la linea cellulare A431 di carcinoma squamoso della cervice uterina, risulta essere la più sensibile all'azione dei due complessi (rispettivamente IC₅₀ = 0.56±0.43 μM e IC₅₀ = 0.32±0.11 μM). Quindi, la presenza di gruppo polare meno ionizzabile rispetto al carbossile nell'anello eterociclico non comporta una variazione dell'attività del complesso. D'altra parte, l'introduzione di un altro eteroatomo, come un ossigeno o un ulteriore atomo di azoto, a livello dell'anello piperidinico determina una riduzione dell'attività citotossica. Infatti, i complessi [Cu(DTC-L3)₂] e [Cu(DTC-L4)₂], dove all'azoto ditiocarbammico vengono legati rispettivamente una morfolina e una 4-etilpiperazina, presentano valori di IC₅₀ maggiori rispetto al complesso di riferimento. In particolar modo nel caso della morfolina questo effetto risulta particolarmente evidente. Se la sostituzione dell'anello pirrolidinico con una piperidina non comporta una diminuzione dell'attività citotossica, il legame di un altro anello alla piperidina porta alla formazione di complessi meno attivi, come si evince nel caso dei complessi [Cu(DTC-L20)₂], [Cu(DTC-L25)₂] e [Cu(DTC-L9)₂] che si differenziano per il legame in posizione 4 dell'anello piperidinico rispettivamente di una morfolina, un benzile e un 4-clorobenzene.

Nel caso del complesso [Cu(DTC-L17)₂], la presenza di un nucleo spiranico determina una lieve diminuzione dell'attività del complesso, che presenta valori di IC₅₀ compresi tra 0.80 e 2.38 μM. Oltre alla sostituzione della pirrolidina, si è pensato anche di sintetizzare degli omologhi superiori del PDTC aumentando il numero degli atomi di carbonio dell'eterociclo, ottenendo così i complessi [Cu(DTC-L22)₂], [Cu(DTC-L23)₂] e [Cu(DTC-L24)₂]. Negli ultimi due casi, dove i leganti sono caratterizzati rispettivamente dalla presenza di un anello a 8 atomi di carbonio e un anello a 7 atomi di carbonio con l'aggiunta di un atomo di azoto e un gruppo metilico in posizione 4 rispetto all'azoto ditiocarbammico, presentano un'attività citotossica minore rispetto al complesso [Cu(DTC-L22)₂], caratterizzato invece da un anello a 7 atomi e che risulta essere particolarmente efficace nei confronti della linea cellulare A431 (IC₅₀ = 0.28 μM).

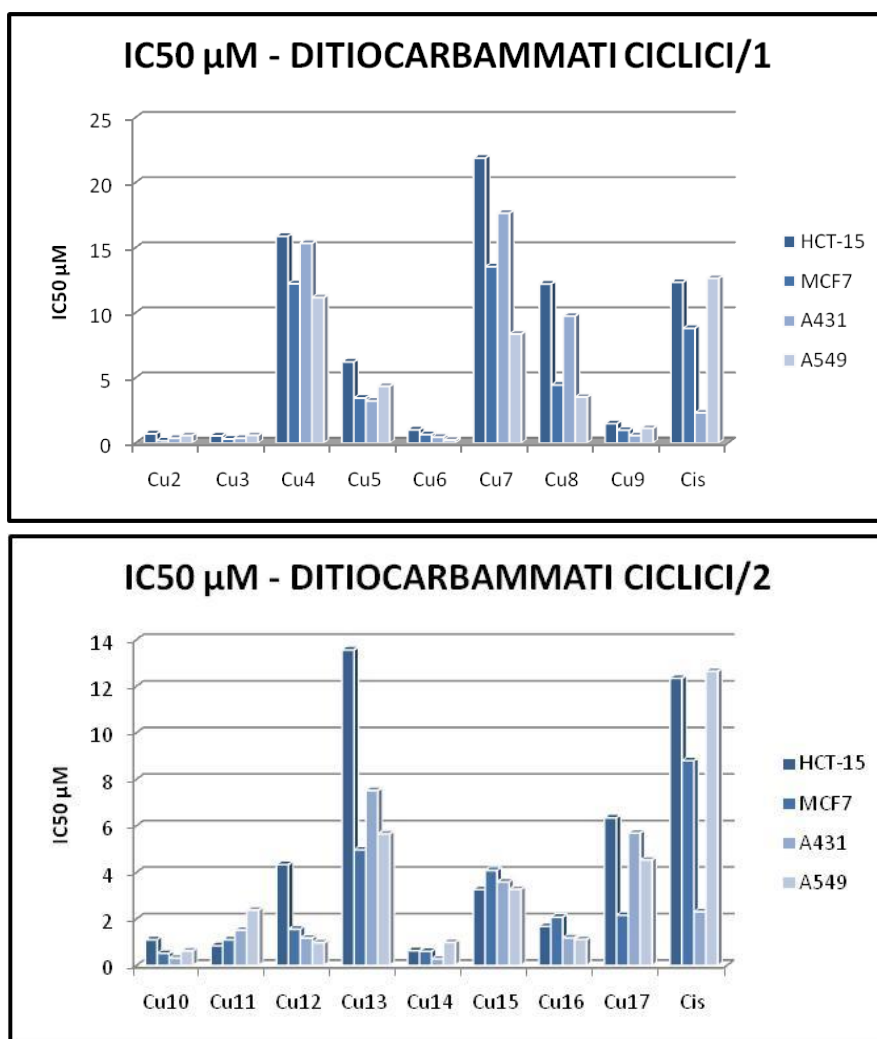


Fig. A45. IC₅₀ dei complessi [Cu(DTC-Ln)₂] con ditiocarbammati ciclici

I dati riportati in Tabella A3 e nel grafico in Figura A46, riguardano invece la citotossicità dei complessi con ditiocarbammati lineari, confrontati con quelli relativi al cis-platino. È evidente che in generale questa classe di composti è ancora più attiva nei confronti delle cellule tumorali rispetto ai complessi con ditiocarbammati ciclici.

In particolare, tutti i complessi con ditiocarbammati lineari presentano un'attività citotossica simile, con valori medi di IC₅₀ compresi tra 0.1 e 0.9 µM, decisamente inferiori rispetto al cis-platino. Il complesso [Cu(DEDCA)₂], utilizzato come riferimento per questa classe di composti poiché già studiato da altri autori (157), presenta una citotossicità con valori medi di IC₅₀ che variano da 0.09 µM a 0.55 µM ed, in particolare nei confronti della linea cellulare MCF-7 risulta essere circa 100 volte più attivo rispetto al cis-platino. Il complesso [Cu(POEt)₂], che presenta un legante ditiocarbammico asimmetrico con legato all'atomo di azoto una catena etilica e un gruppo metossietilico, risulta essere il composto più attivo, con una IC₅₀ media pari a 0.09 µM. È interessante notare che nella linea cellulare HCT-15, notoriamente poco sensibile al cis-platino, il complesso [Cu(POEt)₂] è circa 150 volte più attivo (IC₅₀ = 0.08±0.01 µM) rispetto al chemioterapico di riferimento. In ogni caso, dai risultati ottenuti si può affermare che il legame all'azoto

ditiocarbammico di catene alchiliche lipofile, come l'introduzione di un gruppo etero al fine di modificare il profilo di lipofilità del composto finale, non comporta variazioni significative dell'attività antiproliferativa *in vitro* dei corrispondenti complessi di rame che in tutti casi è estremamente elevata.

Sigla	Composto	IC ₅₀ (μM) ± S.D.			
		HCT-15	MCF7	A431	A549
Cu1	[Cu(DED ₂) ₂]	0.43 ± 0.23	0.09 ± 0.02	0.19 ± 0.09	0.55 ± 0.15
Cu18	[Cu(DPDC ₂) ₂]	1.31 ± 0.54	0.65 ± 0.22	0.65 ± 0.33	0.19 ± 0.05
Cu19	[Cu(NOMe ₂) ₂]	0.63 ± 0.17	0.55 ± 0.16	0.50 ± 0.17	1.15 ± 0.33
Cu20	[Cu(ISOMe ₂) ₂]	1.25 ± 0.51	0.28 ± 0.11	0.58 ± 0.14	1.29 ± 0.45
Cu21	[Cu(POEt ₂) ₂]	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Cu22	[Cu(POMe ₂) ₂]	0.88 ± 0.10	0.20 ± 0.07	0.43 ± 0.12	0.46 ± 0.08
Cu23	[Cu(DBODC ₂) ₂]	0.47 ± 0.13	0.35 ± 0.54	0.14 ± 0.04	0.42 ± 0.15
Cu24	[Cu(DPODC ₂) ₂]	0.52 ± 0.21	0.21 ± 0.06	0.69 ± 0.14	0.62 ± 0.21
Cis	Cisplatino	12.34 ± 2.25	8.80 ± 2.31	2.31 ± 0.54	12.64 ± 0.81

Tab. A3. Citotossicità, espressa in valori di IC₅₀, dei complessi con ditiocarbammati lineari.

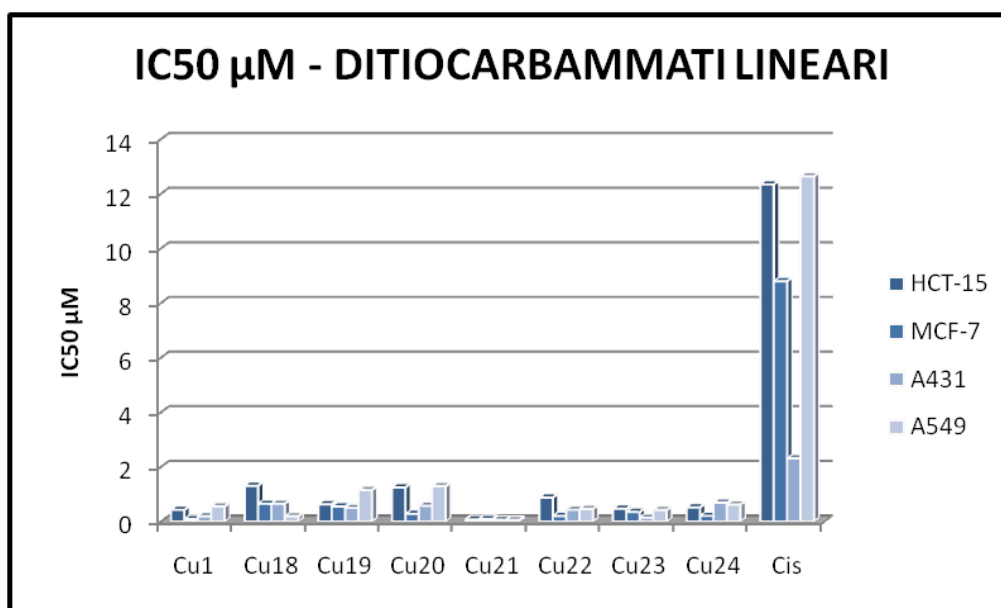


Fig. A46. IC₅₀ dei complessi [Cu(DTC-Ln)₂] con ditiocarbammati lineari.

Studi di resistenza crociata

Lo studio delle proprietà citotossiche dei complessi ditiocarbammici di rame(II) è stato valutato anche in linee cellulari tumorali opportunamente selezionate per la loro resistenza al *cis*-platino, in modo tale da evidenziare un'eventuale resistenza crociata al farmaco di riferimento.

Il test di chemiosensibilità è stato effettuato su due linee cellulari umane di carcinoma ovarico: 2008 variante sensibile e la corrispettiva variante resistente C13*, ottenuta *in vitro* mediante progressivo aumento della concentrazione di *cis*-platino nel terreno di coltura e successiva selezione dei cloni divenuti resistenti⁽¹⁵⁸⁾.

Entrambe le linee cellulari sono state seminate in micro piastre da 96 pozzetti, trattate con i composti in esame a concentrazioni crescenti per 72 ore, considerando anche in questo caso il *cis*-platino come farmaco di riferimento, e la vitalità cellulare è stata poi determinata mediante MTT test.

Nelle Tabelle A4 e A5 sono riportati i profili di resistenza crociata espressi in termini di IC₅₀, che sono stati poi utilizzati per il calcolo del Fattore di Resistenza (F.R.) definito come il rapporto tra il valore di IC₅₀ ottenuto nella linea cellulare resistente e quello calcolato per la linea sensibile. I complessi di Cu(II) esaminati presentano valori di citotossicità paragonabili nelle linee cellulari sensibili e resistenti, risultando in quest'ultime, nella maggior parte dei casi, più attivi del farmaco di riferimento, ovvero il *cis*-platino. Inoltre, tutti i complessi superano la resistenza al *cis*-platino, infatti mostrano un F.R. inferiore a 2, valore che in letteratura viene indicato come indice di superamento della farmaco resistenza⁽¹⁵⁹⁾. Questi risultati suggeriscono che il meccanismo d'azione alla base dell'inibizione della crescita cellulare da parte di questi complessi possa essere diverso da quello identificato per il cisplatino. In particolare, per quanto riguarda il complesso ditiocarbammico, i valori di F.R. ricavati sono circa 25 volte inferiori rispetto a quelli del *cis*-platino, indicando come tale complesso non presenti resistenza crociata con il chemioterapico di riferimento. Alla luce di questi risultati, il complesso [Cu(POET)₂] è risultato essere il più interessante della serie.

Sigla	Composto	IC ₅₀ (μM) ± S.D.		
		2008	C13*	F.R.
Cu1	[Cu(DEDCl) ₂]	0,14±0,08	0,23±0,11	1,64
Cu18	[Cu(DPDCl) ₂]	0,44±0,11	0,13±0,08	0,29
Cu19	[Cu(NOMe) ₂]	0,99±0,414	0,95±0,25	0,95
Cu20	[Cu(ISOMe) ₂]	1,25±0,51	0,41±0,21	0,33
Cu21	[Cu(POEt) ₂]	0,25±0,01	0,08±0,02	0,32
Cu22	[Cu(POMe) ₂]	0,88±0,10	0,24±0,09	0,27
Cu23	[Cu(DBODCl) ₂]	0,25±0,95	0,17±0,04	0,68
Cu24	[Cu(DPODCl) ₂]	0,27±0,94	0,09±0,01	0,33
Cis	Cisplatino	2,22±0,74	16,32±3,14	8,0

Tab. A4. Profili di resistenza crociata valutati con MTT test dei complessi con ditiocarbammati lineari.

Sigla	Composto	IC50 (μM) \pm S.D.		
		2008	C13*	F.R.
Cu2	[Cu(PDTC) ₂]	0,46 \pm 0,18	0,41 \pm 0,21	0,89
Cu3	[Cu(DTC-L2) ₂]	0,28 \pm 0,23	0,46 \pm 0,08	1,64
Cu4	[Cu(DTC-L3) ₂]	8,63 \pm 2,42	17,98 \pm 3,14	2,08
Cu5	[Cu(DTC-L4) ₂]	1,31 \pm 0,54	2,21 \pm 1,07	1,68
Cu6	[Cu(DTC-L9) ₂]	1,02 \pm 0,53	0,39 \pm 0,19	0,38
Cu7	[Cu(DTC-L10) ₂]	15,18 \pm 2,91	13,43 \pm 3,25	0,88
Cu8	[Cu(DTC-L13) ₂]	9,23 \pm 2,13	5,51 \pm 3,26	0,60
Cu9	[Cu(DTC-L15) ₂]	0,70 \pm 0,20	0,89 \pm 0,51	1,27
Cu10	[Cu(DTC-L16) ₂]	0,39 \pm 0,12	0,65 \pm 0,47	1,6
Cu11	[Cu(DTC-L17) ₂]	0,47 \pm 0,13	0,65 \pm 0,47	1,38
Cu12	[Cu(DTC-L19) ₂]	1,65 \pm 1,25	3,32 \pm 1,54	2,01
Cu13	[Cu(DTC-L20) ₂]	3,13 \pm 1,04	4,97 \pm 2,61	1,58
Cu14	[Cu(DTC-L22) ₂]	0,38 \pm 0,86	0,32 \pm 0,13	0,84
Cu15	[Cu(DTC-L23) ₂]	3,56 \pm 1,34	2,97 \pm 1,33	0,83
Cu16	[Cu(DTC-L24) ₂]	1,68 \pm 0,35	1,52 \pm 0,95	0,90
Cu17	[Cu(DTC-L25) ₂]	2,19 \pm 0,75	1,12 \pm 1,09	0,51
Cis	Cisplatino	2,22 \pm 0,74	16,32 \pm 3,14	8,0

Tab. A5. Profili di resistenza crociata valutati con MTT test dei complessi con ditiocarbammati ciclici.

A4.4 Sintesi e caratterizzazione dei complessi radiomarcati [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$]

Per le prime marcature con ^{64}Cu in ambiente idro-alcolico sono stati scelti innanzitutto i due ditiocarbammati DEDC e PDTC, ovvero i leganti più semplici rispettivamente della serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici e per questo motivo utilizzati come riferimento. Inoltre è stato scelto DTC-L16 poiché presenta un gruppo estereo in catena laterale che, oltre a modulare la solubilità del complesso finale, può essere coinvolto in meccanismi di idrolisi *in vivo* pH-dipendenti tali da favorire un potenziale intrappolamento del complesso finale in alcuni specifici distretti dell'organismo. Reazioni di marcatura sono state effettuate anche con il legante PIPE-1, quale derivato 2-metossifenilpiperazinico che rappresenta un esempio di biomolecola attiva coniugabile al metallo attraverso la funzione ditiocarbammica (vedi Scopo, pag. 47). Infine, è stata valutata la marcatura con ^{64}Cu attraverso l'utilizzo del complesso $[\text{Zn}(\text{PR13})_2]$ per verificare la possibilità che si verifichi una reazione di transmetallazione anche in condizioni di concentrazioni di rame estremamente basse come avviene tipicamente nelle reazioni di marcatura (10^{-9} M). In tutti i casi le reazioni sono state effettuate dopo che la soluzione acida con cui $^{64}\text{Cu}^{2+}$ viene purificato da una colonna a scambio ionico, è stata opportunamente diluita e tamponata con una soluzione di acetato di sodio 3M. In questo modo, lavorando a valori di pH compresi tra 5 e 6, i prodotti sono stati ottenuti in alta resa radiochimica (RCY), determinata per via cromatografica, dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente. I valori di RCY dei prodotti sintetizzati, con i rispettivi tempi di ritenzione (t_r), sono riportati in Tabella A6. Nelle medesime condizioni di analisi il materiale di partenza, $^{64}\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, ha un tempo di ritenzione di 2.30 minuti.

Solo $^{64}\text{Cu}(\text{PR13})_2$, ottenuto tramite reazione di transmetallazione, ha una RCY dopo 15 minuti a temperatura ambiente, non particolarmente elevata (56.3%). Ciò potrebbe essere dovuto non tanto ad una scarsa efficienza della reazione di transmetallazione quanto ad una incompleta solubilizzazione del complesso $[\text{Zn}(\text{PR13})_2]$ nell'ambiente di reazione, che risulta piuttosto torbido.

Composto	t_r , min	%RCY
$^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$	16.3	99.6
$^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$	15.2	99.7
$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-L16})_2$	15.3	97.1
$^{64}\text{Cu}(\text{PIPE-1})_2$	17.8	99.4
$^{64}\text{Cu}(\text{PR13})_2$	10.1	56.3

Tab. A6. Tempi di ritenzione (t_r) e resa radiochimica (RCY) dei complessi ottenuti con ^{64}Cu

Condizioni cromatografiche: solvente A H_2O , solvente B CH_3CN .

Gradiente: 0 min, %B = 50; 1-16 min, %B = 95; 16-21 min, %B = 95; 21-22 min, %B = 50.

L'identità chimica dei complessi, ottenuti in concentrazione nanomolare, è stata assegnata per confronto delle proprietà cromatografiche con quelle degli analoghi complessi di $^{63/65}\text{Cu}$, preparati in concentrazione millimolare. Dall'analisi dei cromatogrammi è possibile assegnare ai complessi sintetizzati con l'isotopo β^+ emittente ^{64}Cu , la stessa formulazione chimica dei complessi con $^{63/65}\text{Cu}$, poiché essi mostrano, nelle medesime condizioni d'analisi, gli stessi tempi di ritenzione, come si vede in Figura A47. I composti così ottenuti sono stati purificati dall'eccesso di legante e dalle altre molecole presenti nell'ambiente di reazione attraverso l'utilizzo di una colonna C18 (Sep-Pak, Waters). I complessi lipofili vengono trattenuti dalla colonna, mentre, gli altri componenti vengono eluiti con una soluzione di etanolo al 30%. I composti vengono successivamente eluiti con etanolo al 90% e sono utilizzati per successivi studi di stabilità in vitro nei confronti di reazioni di transchelazione e transmetallazione.

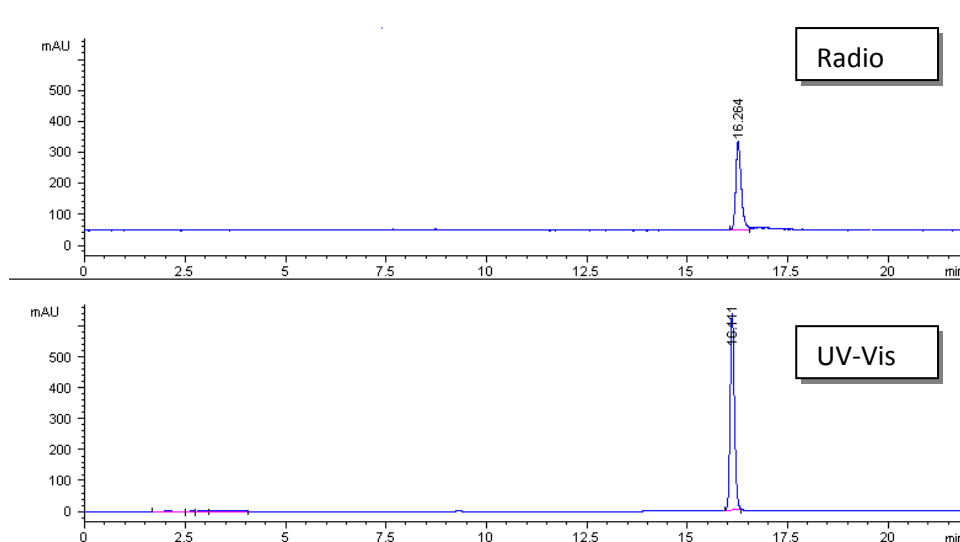
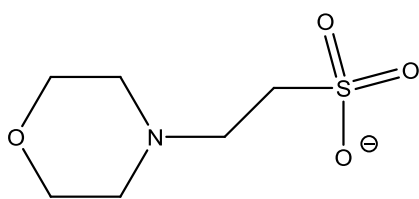


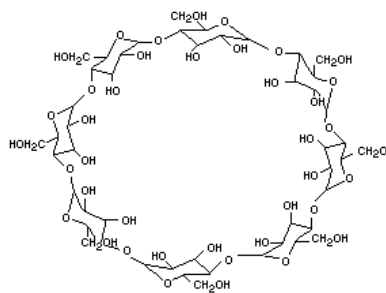
Fig. A47. Corrispondenza dei tempi di ritenzione tra il complesso $^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$ (in alto) e l'analogo con $^{63/65}\text{Cu}$ (in basso).

Successivamente è stata sviluppata una nuova metodica di sintesi per i complessi del tipo $^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$ con l'obiettivo di ottenere i prodotti in modo tale da poterli direttamente utilizzare con campioni di siero umano e con cellule tumorali senza dover provvedere ad una purificazione. In questo modo vengono semplificate di molto le operazioni e si può lavorare con dosi di radioattività più facilmente registrabili, anche in seguito a diluizioni. Gli esperimenti sono condotti con $^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$ e $^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$, quali complessi di riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici.

Dal momento che la reazione avviene solo a pH superiori a 5, invece di utilizzare l'acetato di sodio l'acidità è stata controllata con un tampone ad uso fisiologico, il MES (morfolin-etansolfonato, pKa 6.15, Figura A48) ed inoltre è stata utilizzata una soluzione di γ -ciclodestrina come agente solubilizzante per evitare qualsiasi rischio di precipitazione del prodotto nell'ambiente di marcatura (Figura A48).



A



B

Fig. A48. A) Struttura di MES B) Struttura di γ -ciclodestrina

Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente prodotti sono stati ottenuti in alta resa radiochimica, determinata per via cromatografica. I valori di RCY dei prodotti sintetizzati, con i rispettivi tempi di ritenzione (t_r), sono riportati in Tabella A7. Nelle medesime condizioni di analisi il materiale di partenza, $^{64}\text{Cu}^{2+}$, ha un tempo di ritenzione di 2.30 minuti.

Composto	t_r , min	%RCY
$[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$	21.1	99.0
$[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$	19.5	98.4

Tab. A7. Tempi di ritenzione (t_r) e resa radiochimica (RCY) dei complessi ottenuti con ^{64}Cu .

Condizioni cromatografiche: solvente A H_2O 0.1% TFA, solvente B CH_3CN 0.1% TFA.

Gradiente: 0 min, %B = 15; 2-20 min, %B = 95; 20-25 min, %B = 95; 25-26 min, %B = 15.

L'identità chimica dei complessi, ottenuti in concentrazione nanomolare, è stata assegnata in modo del tutto analogo a quanto fatto in precedenza, per confronto delle proprietà cromatografiche con quelle degli analoghi complessi di $^{63/65}\text{Cu}$, preparati in concentrazione millimolare, come evidenziato in Figura A49.

La possibilità di ottenere questi complessi radiomarcanti con ^{64}Cu a temperatura ambiente, in pochi minuti e in condizioni di marcatura fisiologiche è estremamente interessante per una potenziale applicazione di questo sistema nell'ambito della medicina nucleare ed in particolare della pratica clinica quotidiana che richiede metodiche di sintesi semplici e rapide, possibilmente applicabili ad una formulazione in *kit* alla quale è sufficiente aggiungere estemporaneamente il radionuclide per ottenere il radiofarmaco da iniettare nel paziente in pochi minuti.

I composti così ottenuti sono stati direttamente utilizzati per degli studi di stabilità in siero in umano, in terreno di coltura cellulare e in *buffer* di lisi cellulare.

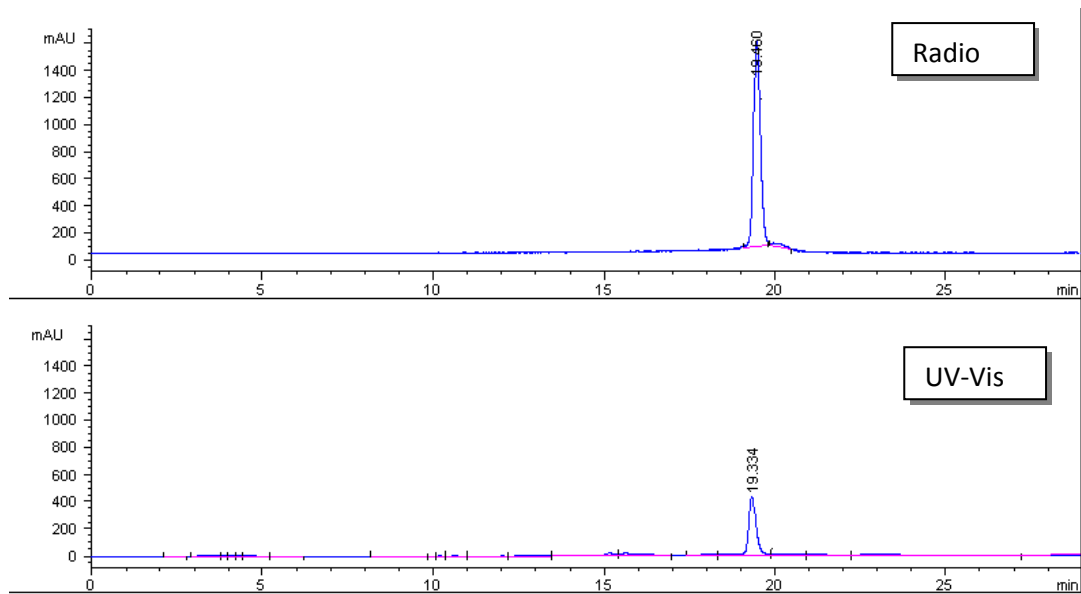


Fig. A49. Corrispondenza dei tempi di ritenzione tra il complesso $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTTC})_2]$ (in alto) e l'analogo con $^{63/65}\text{Cu}$ (in basso).

A4.5 Effetto del pH ed efficienza di marcatura

Effetto del pH nella resa di marcatura:

Le procedure di marcatura sono state condotte a differenti valori di pH in un *range* che varia da 1 a 8. Il pH si è rivelato un fattore cruciale nel determinare la formazione del complesso in alta resa. Come esempio, in Figura A50 si riporta per $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ la variazione percentuale di resa radiochimica (% RCY), valutata dopo 15 minuti a temperatura ambiente, a diversi valori di pH. Elevate rese radiochimiche sono osservate per valori di pH superiori a 5 mentre valori più bassi (1-4.5) determinano una riduzione drammatica della RCY del prodotto. Questo comportamento è connesso con l'instabilità dei leganti ditiocarbammici a bassi valori di pH. In ambiente acido, infatti, i ditiocarbammati si decompongono rapidamente liberando l'ammina libera corrispondente e il solfuro di carbonio (CS_2), come indicato in Figura A51.

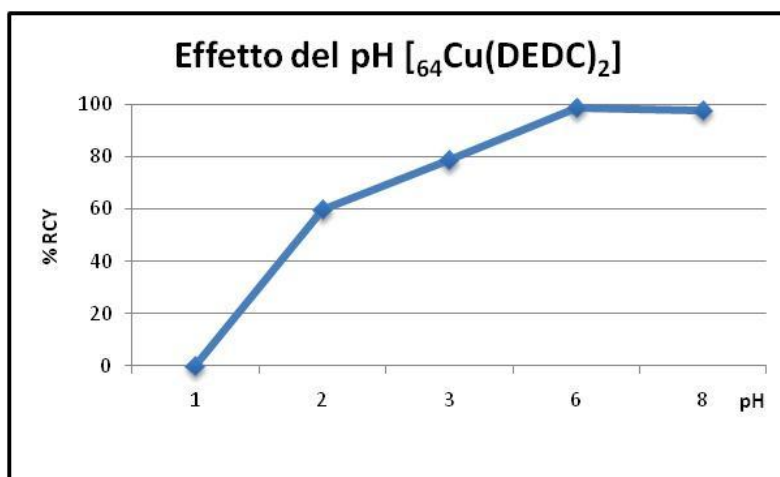


Fig. A50. Effetto del pH sulla %RCY per $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$

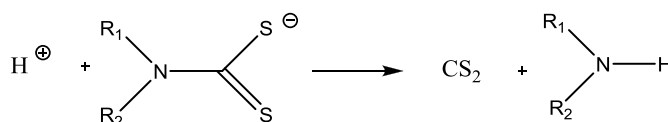


Fig.A51. Instabilità dei ditiocarbammati in ambiente acido

Efficienza di marcatura:

L'efficienza di marcatura con il legante DEDC è stata determinata seguendo le condizioni di marcatura riportate nel Metodo 2 (vedi Parte Sperimentale, pag.115). La concentrazione del legante è stata progressivamente diminuita da 1 mg ($6 \cdot 10^{-3}$ mmoli) a $1 \mu\text{g}$ ($6 \cdot 10^{-6}$ mmoli). La miscela di reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 15 minuti. Le RCY sono state determinate per via cromatografica e i risultati sono raffigurati in Figura A52. I dati riportati dimostrano che elevate RCY (94-95%) si ottengono anche con quantità di legante DEDC molto basse, nell'ordine di 1-10 μg .

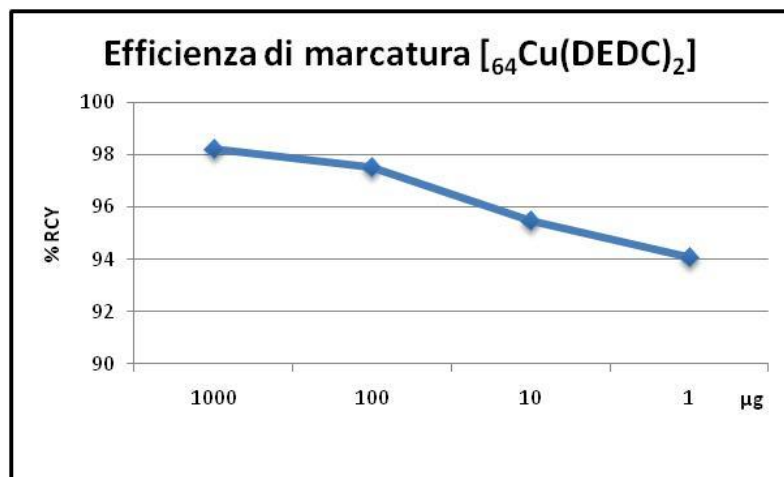


Fig. A52. Efficienza di marcatura per il legante DEDC

Questo risultato è estremamente interessante per una serie di motivi. In primo luogo l'elevata efficienza di marcatura permette di impiegare quantità molto basse di legante e di avere quindi una quantità tollerabile di legante libero nell'ambiente di marcatura (il radionuclide ^{64}Cu è sempre in largo difetto rispetto al legante) rendendo le condizioni di marcatura ancor più fisiologiche senza necessità di ulteriori processi di purificazione. Inoltre, la possibilità di utilizzare quantità ridotte di legante è molto importante nella prospettiva di sfruttare questo sistema di marcatura per molecole biologicamente attive. Infatti, minimizzare la quantità di biomolecola necessaria alla marcatura permette di contenere i costi associati alla produzione di molecole *target* specifico quali peptidi o anticorpi ma soprattutto riduce la possibilità che vi sia competizione tra il tracciante radioattivo e il legante libero per il riconoscimento dei siti bersaglio con un conseguente miglioramento nel profilo di selettività del sistema diagnostico testato.

A4.6 Studi di stabilità *in vitro*

Per prima cosa è stata valutata la stabilità dei complessi radiomarcanti con ^{64}Cu nell'ambiente di marcatura di entrambi i metodi sintetici testati e a diverse concentrazioni di legante utilizzato. I risultati ottenuti per il complesso $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ sono riportati in Figura A53 ed evidenziano chiaramente come non vi siano significative variazioni nella purezza radiochimica del prodotto anche dopo 48 ore di incubazione. I complessi ottenuti sono quindi molto stabili negli ambienti di marcatura testati e la quantità di legante utilizzato nella sintesi non influenza in modo evidente il profilo di stabilità riscontrato.

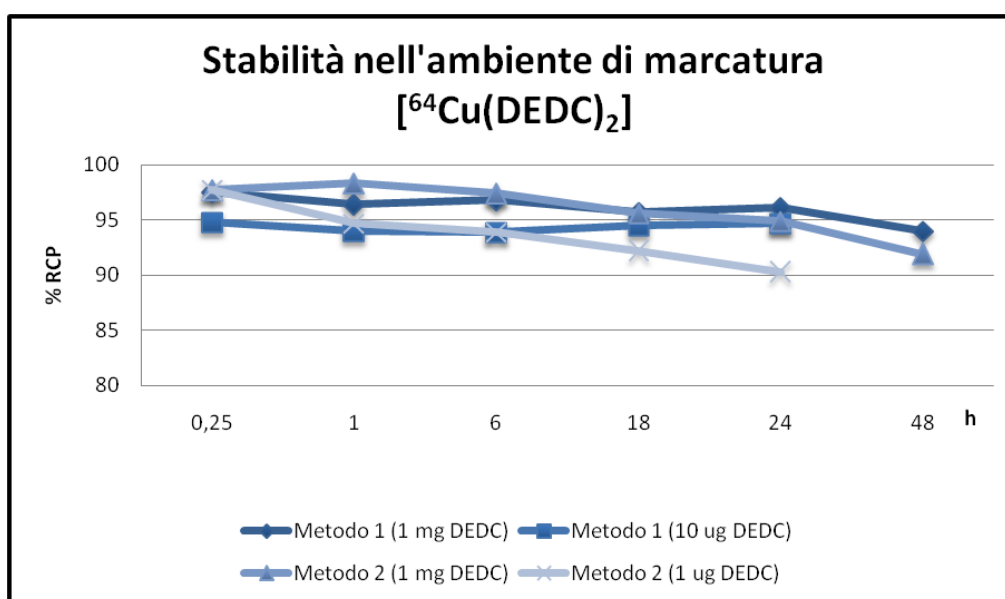


Fig. A53. Stabilità del complesso $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ nell'ambiente di marcatura.

Studi di transchelazione:

Gli studi di transchelazione sono importanti poiché per le applicazioni radiofarmaceutiche è necessario che ^{64}Cu rimanga complessato al legante *in vivo* per un tempo sufficiente da permettere una appropriata localizzazione nel tessuto bersaglio. È per questo motivo che la stabilità dei prodotti è stata valutata nei confronti di differenti competitori in grado di dare una reazione di transchelazione con il metallo. Il glutathione (GSH) è un tripeptide a basso peso molecolare (γ -L-glutammina-L-cisteinilglicina) presente in concentrazioni relativamente alte nel citoplasma cellulare (0.5-10mM) ed è in grado di agire come riducente e di legare gli ioni metallici. Analogamente cisteina (Cys) e istidina (His) sono due amminoacidi presenti nelle proteine plasmatiche in grado di legare ioni metallici quali Cu^{2+} . Infine, l'EDTA (acido etilendiaminotetracetico) è un chelante ad altissima affinità per il rame che forma complessi ad elevata stabilità termodinamica ma caratterizzati da una elevata instabilità cinetica.

Dopo 24 ore di incubazione con GSH, Cys e His si sono osservati piccole variazioni nell'aspetto dei cromatogrammi, che indicano come in queste condizioni i complessi siano stabili nei confronti di reazioni di transchelazione anche in presenza di sistemi chelanti affini per il rame in elevata concentrazione, dal momento che non si osserva la formazione di alcun prodotto secondario e ^{64}Cu rimane legato ai due leganti ditiocarbammici. Nello studio di stabilità in presenza di EDTA si osserva la formazione di un composto più idrofilico come conseguenza di una reazione di transchelazione tra il legante ditiocarbammico e l'EDTA. I risultati degli studi di transchelazione sono riassunti in Figura A54.

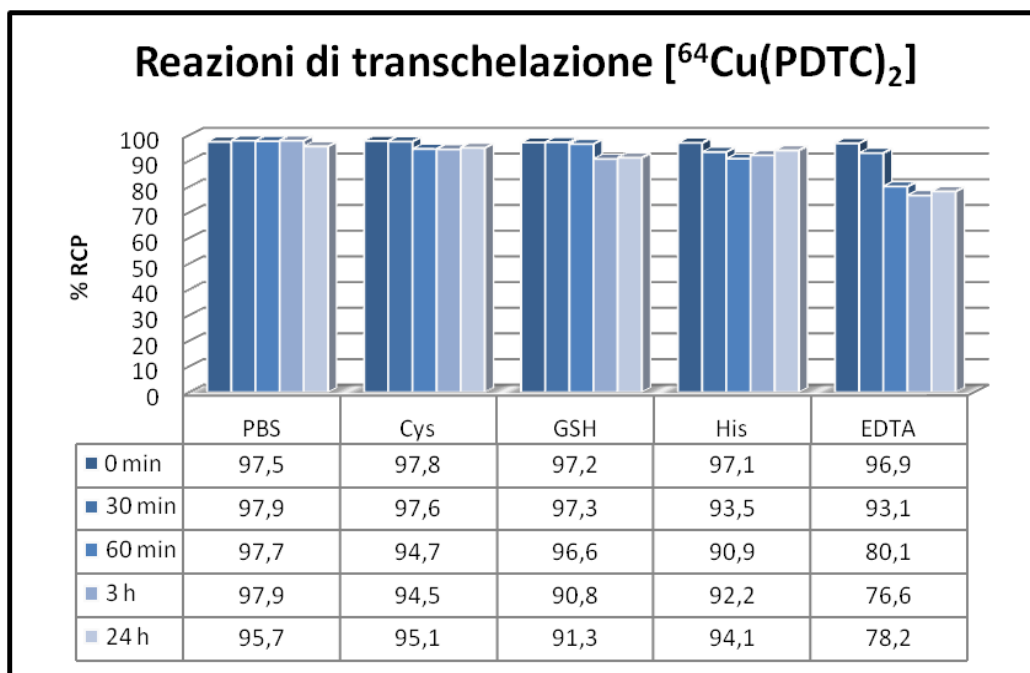


Fig. A54. Stabilità di [$^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$] nei confronti di reazioni di transchelazione.

Studi di transmetallazione:

Un buon sistema chelante per ^{64}Cu deve essere caratterizzato non solo da una buona stabilità e dall'inerzia nei confronti della transchelazione nei fluidi biologici ma anche nei confronti dello scambio con ioni Cu^{2+} e Zn^{2+} *in vivo*. Rame e zinco sono, infatti, oligoelementi essenziali in tutti gli organismi viventi e le loro funzioni biologiche includono reazioni di ossido-riduzione, processi di sviluppo e crescita cellulare e meccanismi di angiogenesi.

Gli esperimenti di transmetallazione sono stati condotti incubando i prodotti purificati [$^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2$] con un eccesso di $^{63/65}\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o di ZnSO_4 . Aliquote della miscela di reazione sono controllate per via cromatografica a 30 minuti, 1, 3 e 24 ore.

Una significativa riduzione della purezza radiochimica (RCP) si osserva in presenza di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La RCP valutata immediatamente dopo l'aggiunta del complesso alla miscela di reazione è del 70.5% per poi scendere nelle 24 ore successive di incubazione a valori tra il 40 e il 50%. E' probabile che questo

comportamento sia dovuto all'effetto di massa esercitato dagli ioni Cu^{2+} presenti in elevata concentrazione (1mM). Al contrario non si osservano significative variazioni nella purezza radiochimica del complesso durante le 24 ore di incubazione a 37°C con un eccesso di ZnSO_4 . Questo dato è molto interessante in quanto indica come i leganti ditiocarbammici siano caratterizzati da una elevata selettività per il rame rispetto allo zinco.

I risultati degli studi di transmetallazione sono riassunti in Figura A55.

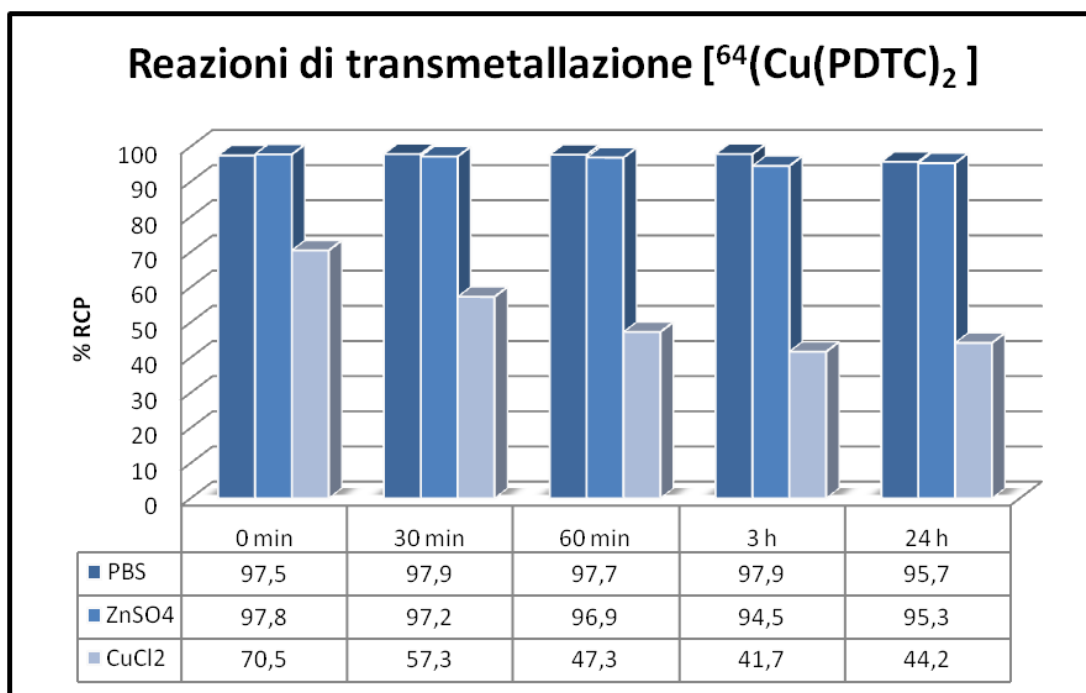


Fig. A55. Stabilità di [$^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$] nei confronti di reazioni di transmetallazione.

Stabilità in siero umano:

Lo studio di stabilità in siero umano è importante poiché per le applicazioni radiofarmaceutiche è necessario che ^{64}Cu rimanga complessato al legante *in vivo* per un tempo sufficiente da permettere una appropriata localizzazione nel tessuto bersaglio. È per questo motivo che la stabilità dei prodotti è stata valutata nei confronti del siero che contiene una quantità elevata di proteine in grado di competere con i leganti ditiocarbammici per la complessazione con il metallo. È noto infatti che proteine deputate al trasporto del rame nell'organismo quali la ceruloplasmina e l'albumina hanno una elevata affinità per questo metallo. Gli esperimenti sono condotti con [$^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2$] e [$^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$], complessi di riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici.

L'esperimento è stato condotto in due differenti modalità. La prima, definita "carrier free", prevede l'incubazione del solo complesso radiomarcato con siero umano mentre la seconda, definita "carrier added", prevede l'incubazione del complesso marcato con ^{64}Cu e dell'analogo complesso "freddo" allo

stesso tempo. Questo esperimento presenta il vantaggio di lavorare in condizioni di concentrazione micro molare, circa mille volte superiore all'esperimento condotto in condizioni "carrier free" (nanomolare) e di conseguenza permette di valutare eventuali variazioni di comportamento attribuibili alla significativa variazione di concentrazione del prodotto.

I dati acquisiti dai conteggi della radioattività nelle *pellet* proteico e nel surnatante, ottenuti in seguito a centrifugazione, dimostrano che la percentuale di rame che si associa alla componente proteica e che, quindi, si dissocia dal legante ditiocarbammico è di circa il 30% dopo 5 e 15 minuti. Tale percentuale aumenta leggermente dopo 30 minuti, attestandosi attorno al 45%. I dati cromatografici, invece, rivelano che nel surnatante il prodotto mantiene una purezza radiochimica soddisfacente. In particolare, per $[^{64}\text{Cu}(\text{DED})_2]$ la purezza radiochimica si attesta tra il 70 e il 60%, valori più che sufficienti affinché buona parte del prodotto abbia il tempo di localizzarsi nei tessuti bersaglio senza essere totalmente degradato o sequestrato dalle proteine del siero. Non si osservano particolari differenze di comportamento attribuibili alla differenza di concentrazione esplorata nell'esperimento in "carrier added" e risultati analoghi sono ottenuti per il prodotto $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$ e riportati in Figura A56.

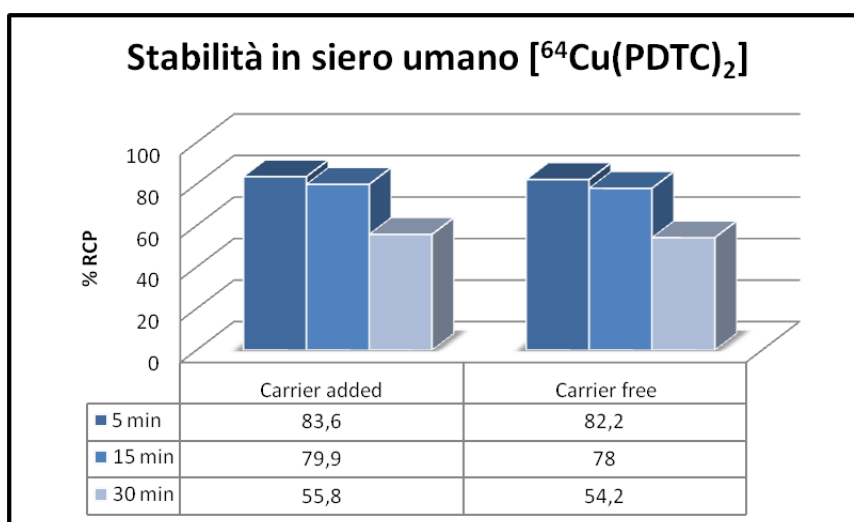


Fig. A56. Stabilità di $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$ in siero umano.

Stabilità nel terreno di coltura RPMI-1640:

Questo studio di stabilità è fondamentale dal momento che gli esperimenti successivi prevedono di incubare delle cellule tumorali sospese nel loro terreno di coltura con i complessi di rame allo scopo di valutare il meccanismo di *uptake* di questi ultimi. È necessario, quindi, che i prodotti siano stabili nel tempo nel terreno di coltura utilizzato in modo tale da poter valutare in modo corretto, senza presenza di specie secondarie, il reale processo di internalizzazione cellulare. Gli esperimenti sono condotti con $[^{64}\text{Cu}(\text{DED})_2]$ e $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$, complessi di riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici.

Anche in questo caso l'esperimento è stato condotto sia in "carrier free" che in "carrier added" per verificare un possibile diverso profilo di stabilità dovuto ad una significativa variazione della concentrazione.

Le frazioni controllate per via cromatografica hanno dimostrato che i prodotti testati sono molto stabili nel tempo e quindi gli esperimenti di uptake possono essere eseguiti in terreno di coltura RPMI-1640 senza alterare le caratteristiche chimiche dei composti.

Stabilità nel buffer di lisi:

Questo studio di stabilità è fondamentale dal momento che gli esperimenti successivi prevedono anche di provocare la lisi cellulare (vedi Paragrafo) con un buffer allo scopo di verificare in che forma si trova il rame una volta entrato nelle cellule. È necessario, quindi, che i prodotti siano stabili nel buffer di lisi in modo tale che nel caso di dovessero riscontrare eventuali modifiche della struttura chimica dei composti, queste siano esclusivamente dovute all'interazione dei complessi con le cellule tumorali. Gli esperimenti sono condotti con $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ e $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$, complessi di riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici.

Anche in questo caso l'esperimento è stato condotto sia in "carrier free" che in "carrier added" per verificare un possibile diverso profilo di stabilità dovuto ad una significativa variazione della concentrazione.

Aliquote delle miscele sono controllate per via cromatografica a 15 e 30 minuti. I dati ottenuti, riportati in Figura A57, dimostrano che i prodotti testati sono molto stabili nel tempo e quindi gli esperimenti di lisi cellulare con questo buffer di lisi possono essere eseguiti.

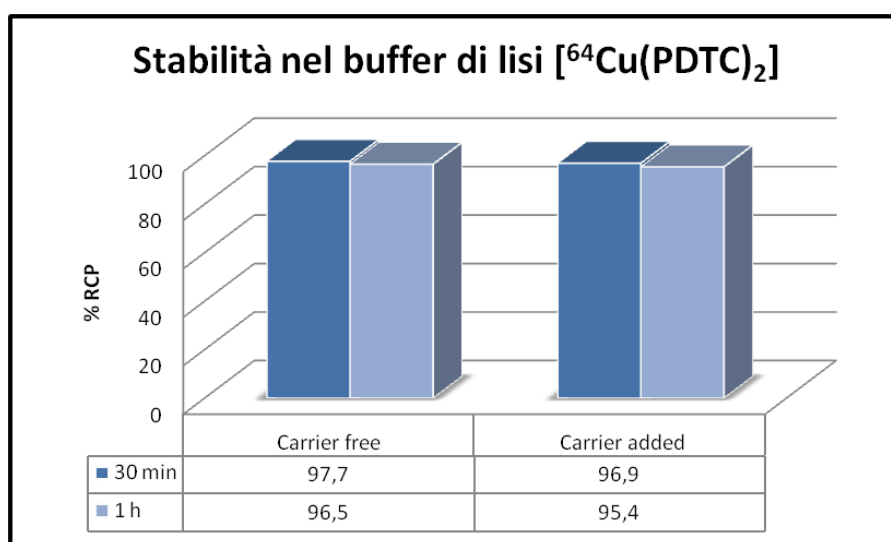


Fig. A57. di $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$ nel buffer di lisi.

A4.7 Esperimenti di *uptake* in cellule tumorali MCF-7

Dal momento che la classe di complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ ha dimostrato una elevata attività citotossica *in vitro* nei confronti di diverse linee cellulari tumorali si è deciso di approfondire il meccanismo d'azione e i sistemi di accumulo di questi composti sfruttando anche la possibilità di utilizzare i prodotti radiomarcati con ^{64}Cu come sonde radioattive che consentono di seguire più agevolmente il destino del rame anche una volta che è entrato in contatto con le cellule tumorali.

Per prima cosa, quindi, è stata valutata la cinetica di *uptake* dei complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ in cellule di tumore alla mammella MCF-7 sia a livello di composti non radioattivi che radiomarcati con ^{64}Cu .

Sono stati eseguiti tre diversi tipi di esperimenti. Nel primo le cellule sono incubate solo con il complesso non radioattivo, nel secondo solo con il tracciante radioattivo, lavorando in condizioni di “*carrier free*”, e infine nel terzo si è optato per una incubazione in “*carrier added*”, dove le cellule sono messe a contatto sia con il prodotto non radiomarcato che con il tracciante a base di ^{64}Cu . Gli esperimenti sono condotti con $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ e $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$, complessi di riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici.

Esperimento A: uptake dei complessi NON radioattivi

Dopo un'ora di incubazione a 37°C si osserva che la concentrazione del complesso nel terreno di coltura è ridotta di circa il 30% rispetto al valore iniziale. Ciò indica che c'è stato un *uptake* del prodotto all'interno delle cellule tumorali. Dopo due e tre ore di incubazione a 37°C la concentrazione del complesso diminuisce in misura minore attestandosi a valori ridotti di circa il 35-40% rispetto alla concentrazione iniziale. In Figura A58 è schematizzata la cinetica di *uptake* osservata.

I dati ottenuti dimostrano che dopo un'ora di incubazione a 37°C si raggiunge un livello di *uptake* di circa il 30% e per questo motivo negli esperimenti successivi che hanno utilizzato prodotti marcati con ^{64}Cu l'incubazione è stata protratta per un'ora, tempo sufficiente ad avere un *uptake* significativo, destinato a non aumentare in modo significativo nel tempo.

Esperimento B: uptake in “carrier free”:

Dopo un'ora di incubazione a 37°C i risultati ottenuti dai conteggi della radioattività presente nel terreno di coltura e nel *pellet* cellulare, separati in seguito a centrifugazione, confermano un *uptake* nell'ordine del 40-45% in accordo con quanto visto nell'esperimento precedente. I profili cromatografici HPLC e TLC del terreno di coltura evidenziano la presenza del picco a tempo di ritenzione compatibile con i complessi $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ e rivelano, quindi, che i complessi non subiscono alterazioni chimiche durante il periodo l'incubazione e che in questa forma sono in grado di superare la membrana cellulare ed entrare nella cellula tumorale (Figura A59). Infatti, sia per $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ che per $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$, dopo un'ora di

incubazione a 37°C con cellule tumorali MCF-7, i prodotti nel terreno di coltura hanno una purezza radiochimica superiore al 95%. I risultati dell'esperimento in "carrier free" sono riassunti in Figura A58.

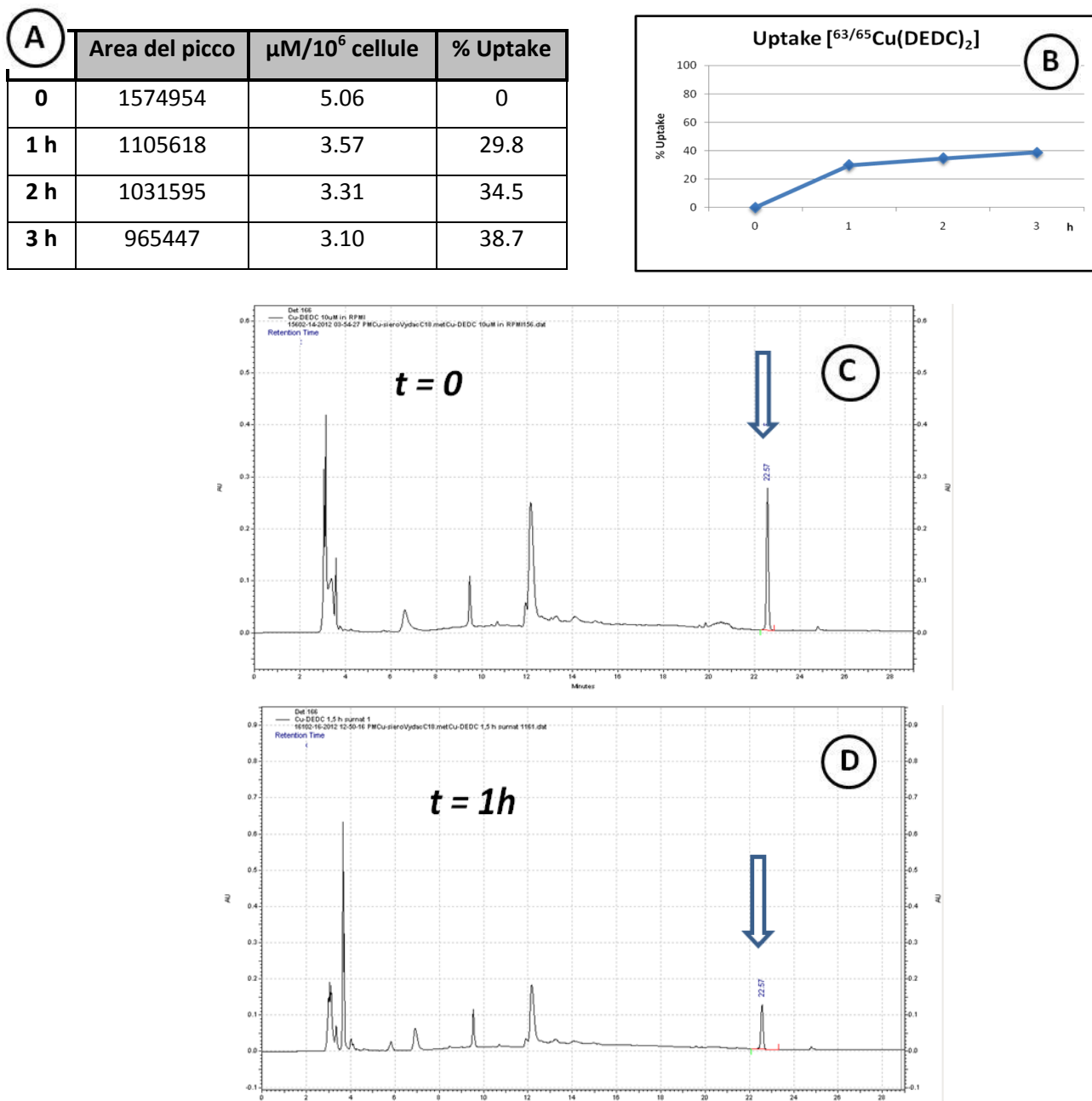


Fig. A58. A) Valori di uptake dei complessi "freddi" in cellule MCF-7; B) Cinetica di uptake dei complessi "freddi" in cellule MCF-7; C) e D) Cromatogrammi del terreno di coltura al tempo 0 e dopo un'ora in incubazione. Si osserva la riduzione del picco relativo al complesso.

Esperimento C: uptake in "carrier added"

Questo esperimento presenta il vantaggio di lavorare in condizioni di concentrazione micromolare del tutto simile a quanto avviene negli studi di citotossicità con la possibilità di "sporcare" il composto con

dell'analogo composto radiomarcato con ^{64}Cu in modo tale da seguire più agevolmente il destino del prodotto e del metallo una volta entrati in contatto con le cellule tumorali. Inoltre, questo esperimento è condotto in concentrazione mille volte superiore all'esperimento in "carrier free" (nanomolare) e di conseguenza permette di valutare eventuali variazioni di comportamento attribuibili alla significativa variazione di concentrazione del prodotto.

Dopo un'ora di incubazione a 37°C i risultati ottenuti dai conteggi della radioattività presente nel terreno di coltura e nel *pellet* cellulare, separati in seguito a centrifugazione, confermano un *uptake* nell'ordine del 40% in accordo con quanto visto negli esperimenti precedenti e anche i profili cromatografici HPLC e TLC sono del tutto analoghi a quelli ottenuti nell'esperimento in "carrier free" a dimostrare che non ci sono variazioni nelle modalità di *uptake* imputabili ad una variazione di concentrazione. I risultati sono riassunti in Figura A59.

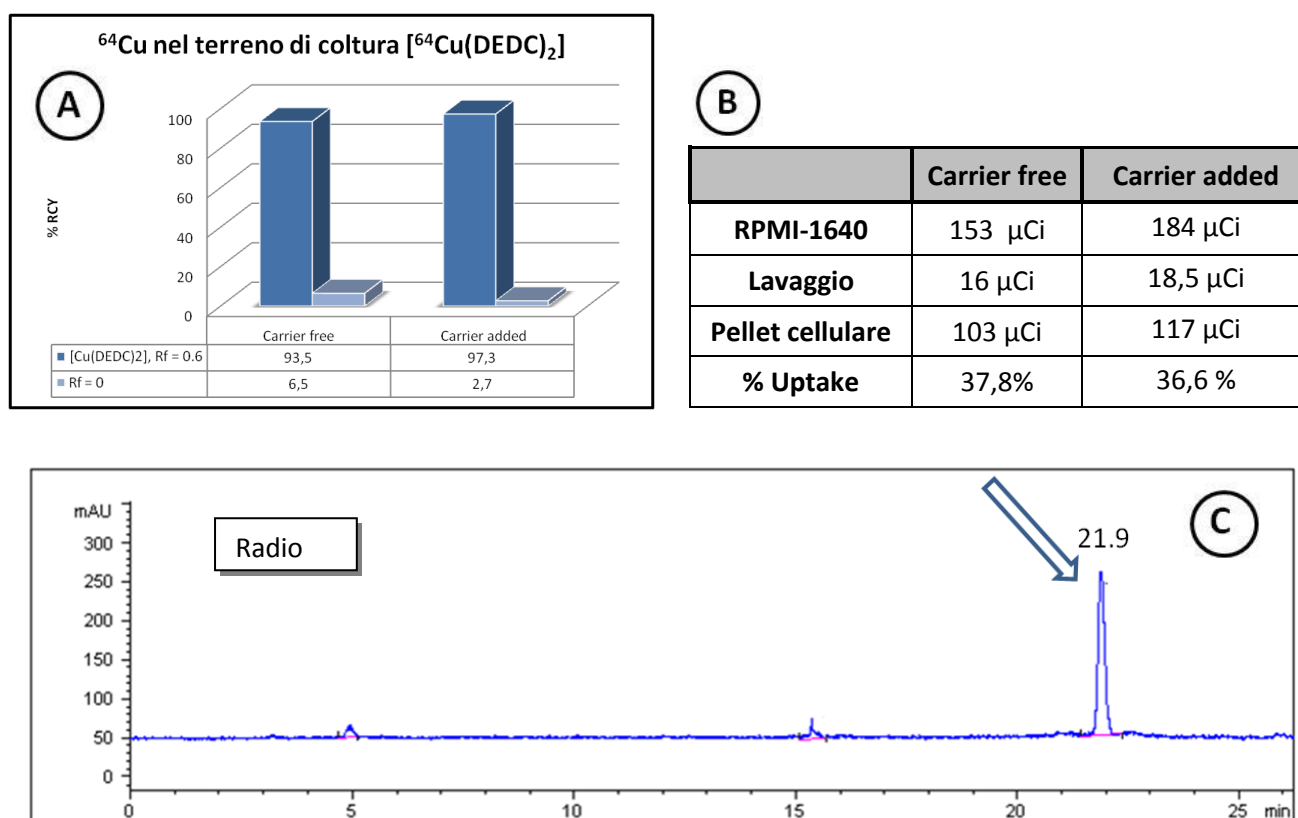


Fig. A59. A) Profilo TLC del terreno di coltura dopo un'ora di incubazione con cellule MCF-7;

B) Conteggi di radioattività che permettono di quantificare l'*uptake*. C) Profilo HPLC del terreno di coltura dopo un'ora di incubazione con cellule MCF-7.

A4.8 Esperimenti di *uptake* temperatura dipendente in cellule tumorali MCF-7

Esperimenti di *uptake* su cellule di tumore alla mammella MCF-7 sono stati condotti a diverse temperature allo scopo di valutare il coinvolgimento di un sistema di trasporto attivo attraverso la membrana cellulare per i complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$. Un sistema di trasporto attivo è, infatti, inibito a bassa temperatura e quindi, se coinvolto, dovrebbe determinare una significativa riduzione dell'*uptake* a 4°C rispetto ai 37°C⁽¹⁶⁰⁾. L'esperimento è stato condotto sia in "carrier free" che in "carrier added" per verificare un possibile diverso profilo di *uptake* dovuto ad una significativa variazione della concentrazione, incubando per due ore i composti con cellule MCF-7 sia a 4°C che a 37°C.

I risultati ottenuti dai conteggi della radioattività presente nel terreno di coltura e nel *pellet* cellulare, separati in seguito a centrifugazione, evidenziano una cinetica di *uptake* del tutto simile per gli esperimenti condotti a temperatura differente indicando come l'internalizzazione dei composti non sia influenzata dalla temperatura (Tabella A8 e Figura A60).

I risultati ottenuti suggeriscono il fatto che l'*uptake* di questa classe di composti avvenga, quindi, mediante un sistema di diffusione passiva attraverso la membrana cellulare senza coinvolgere alcun processo di trasporto attivo dal momento che non si osserva alcuna diminuzione nella percentuale di *uptake* quando le cellule MCF-7 sono incubate a bassa temperatura.

Non si sono riscontrate differenze significative tra i composti $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ e $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{PDTTC})_2]$.

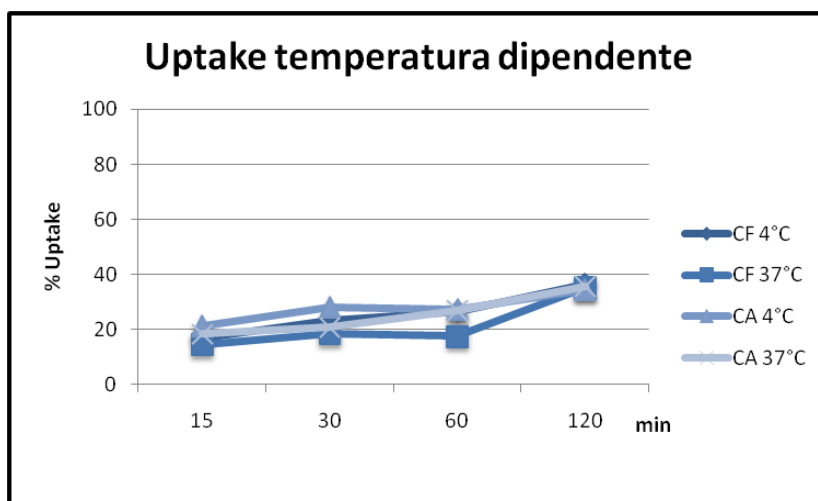


Fig. A60. Cinetica di *uptake* in cellule MCF-7 a 4°C e 37°C.

Uptake	Carrier free		Carrier added	
	4° C	37° C	4° C	37° C
15 min	16,7	14,6	21,4	18,4
30 min	23,2	18,5	28	20,8
60 min	26,5	17,5	27,3	26,9
120 min	36,3	35,1	34,5	35,8

Tab. A8. Valori di *uptake* in cellule MCF-7 a 4°C e 37°C.

A4.9 Esperimenti di competizione rame in cellule tumorali MCF-7

Il rame è un metallo essenziale la cui concentrazione deve essere finemente controllata per evitare un accumulo eccessivo che risulterebbe tossico per l'organismo. Esistono, quindi, una serie di sofisticati meccanismi che consentono di regolare i livelli di rame nelle cellule dei diversi organi. Tra questi Ctr1 (*Copper transporter 1*) è il membro più importante di una famiglia di trasportatori ad alta affinità per il rame individuato sia nelle piante che negli animali ed in particolare hCtr1 (*human Copper transporter 1*) è una proteina transmembrana coinvolta nel trasporto del rame nei tessuti dell'uomo. Presenta tre domini transmembrana ed è caratterizzata dal ripetersi di residui di istidina, cisteina e metionina in grado di coordinare ioni metallici⁽¹⁶¹⁾. È stato verificato che hCtr1 è in grado di legare e trasportare all'interno della cellula lo ione monovalente Cu^+ e l'accumulo di rame risulta infatti inibito dalla competizione con altri ioni monovalenti quali Ag^+ . Ioni bivalenti quali Zn^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} invece non inibiscono il trasporto del rame suggerendo che lo ione Cu^{2+} non sia coinvolto in questo sistema⁽¹⁶²⁾. Non è ancora chiaro se lo ione Cu^+ sia effettivamente l'unico in grado di attraversare la membrana cellulare seguendo un sistema di trasporto attivo e in quale *step* dell'intero processo di omeostasi del rame avvenga la riduzione che consente l'interazione con hCtr1 e l'internalizzazione cellulare di questo metallo essenziale.

Un altro sistema di trasporto presente in numerosi organismi viventi è il DMT1 (*divalent metal-ion transporter 1*) che esplica la sua funzione attraverso un gradiente elettrochimico. Questo trasportatore è noto per la sua capacità di legare diversi ioni metallici bivalenti tra cui Fe^{2+} tanto che la sua espressione sembra sia regolata dai livelli di questo ione nell'organismo. Ad ogni modo DMT1 è in grado di coordinare e trasportare anche altri metalli quali Mn^{2+} e Zn^{2+} mentre non è ancora del tutto chiarito il suo eventuale ruolo nel trasporto dello ione Cu^{2+} .

Sulla base di queste considerazioni sono stati effettuati degli esperimenti di *uptake* su cellule di tumore alla mammella MCF-7 in presenza dello ione monovalente Ag^+ e dello ione bivalente Zn^{2+} in modo tale da verificare l'eventuale coinvolgimento dei trasportatori hCtr1 e DMT1 nel meccanismo di *uptake* dei complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$. Come fonte di ioni Ag^+ è stato utilizzato AgNO_3 mentre come fonte di ioni Zn^{2+} è stato impiegato ZnSO_4 .

L'esperimento è stato condotto sia in "*carrier free*" che in "*carrier added*" per verificare un possibile diverso profilo di *uptake* dovuto ad una significativa variazione della concentrazione, incubando per un'ora i composti di rame con cellule MCF-7 a 37°C.

I risultati ottenuti dai conteggi della radioattività nel terreno di coltura e nel *pellet* cellulare, separati in seguito a centrifugazione, indicano una percentuale di *uptake* pressoché identica in presenza e in assenza sia dello ione Ag^+ che dello ione Zn^{2+} . I dati ottenuti dimostrano chiaramente che lo ione monovalente Ag^+

non determina in alcun modo una inibizione del trasporto della classe di composti e che, quindi, il trasportatore hCtr1 non è coinvolto nel meccanismo di *uptake*.

Questo risultato è in accordo con il fatto che i complessi entrano in forma inalterata all'interno della cellula e non subiscono alcuna reazione ossido-riduttivo che consenta al rame di ridursi ed essere quindi internalizzato per mezzo del trasportatore hCtr1. Anche lo ione bivalente Zn^{2+} non influenza in alcun modo il trasporto dei complessi in rame all'interno delle cellule tumorali, che di conseguenza non coinvolge il trasportatore DMT1. Ciò è in accordo con quanto evidenziato nei precedenti esperimenti di *uptake* temperatura dipendente che escludevano la presenza di un sistema di trasporto attivo che fosse inibito a bassa temperatura.

Tutti i risultati ottenuti portano ad ipotizzare quindi che questa classe di composti sia in grado di attraversare la membrana cellulare in forma chimicamente inalterata per semplice diffusione passiva.

I risultati di entrambi gli esperimenti di competizione sono riassunti in Figura A61 e in Figura A62.

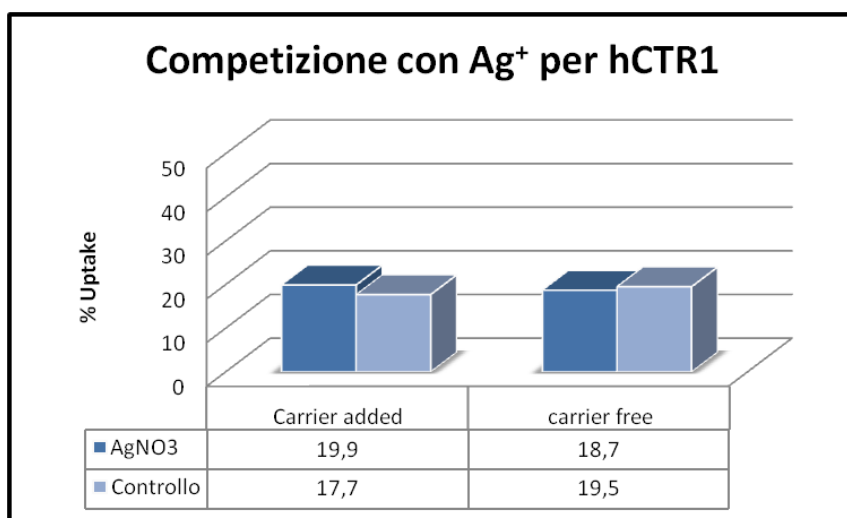


Fig. A61. Valori di *uptake* in cellule MCF-7 in presenza di ioni Ag^+ .

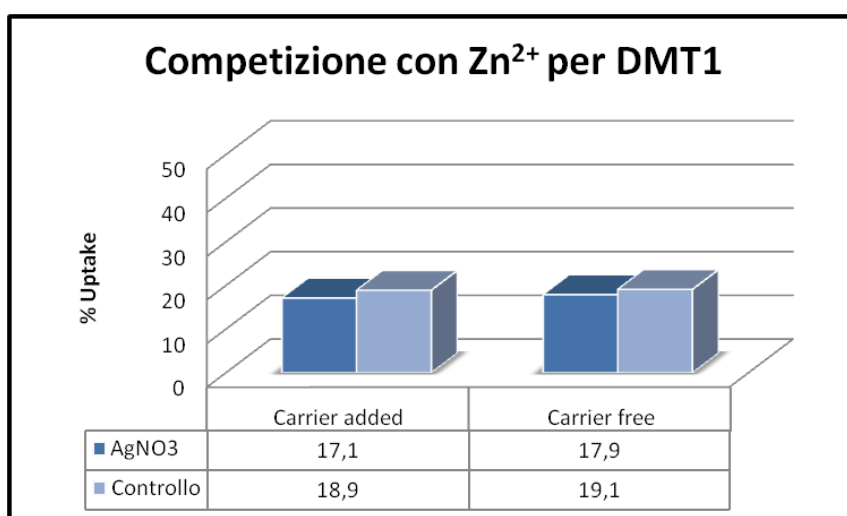


Fig. A62. Valori di *uptake* in cellule MCF-7 in presenza di ioni Ag^+ .

A4.10 Esperimento di *uptake* a concentrazioni crescenti in cellule tumorali MCF-7

Dal momento che i dati ottenuti dagli esperimenti di *uptake* a differenti temperature e di inibizione dei trasportatori hCtr1 e DMT1 permettono di ipotizzare un sistema di diffusione passiva per i complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$, sono stati eseguiti degli esperimenti di *uptake* con gli analoghi complessi freddi a concentrazioni crescenti. Infatti, un sistema di diffusione passiva non prevede alcuna interazione con specifiche proteine di membrana e perciò non si verifica alcun fenomeno di saturazione se non a concentrazioni elevate. D'altro canto, un sistema di trasporto mediato da un trasportatore viene saturato a concentrazioni basse dal momento che c'è un numero limitato di proteine trasportatrici sulla membrana cellulare. Gli esperimenti di *uptake* nei confronti di cellule tumorali MCF-7 incubate a 37°C per tre ore sono stati condotti a concentrazioni comprese tra 30 e 100 μM . I risultati ottenuti evidenziano come la quantità di composto che viene internalizzata aumenti linearmente con la quantità di composto iniziale senza che si raggiunga un *plateau*, nemmeno alle concentrazioni più elevate che dovrebbero essere ampiamente sufficienti per individuare la saturazione di un sistema di trasporto attivo (Figura A63 e Tabella A9).

Anche i risultati di questo esperimento sono, quindi, perfettamente in accordo con i precedenti nell'escludere la presenza di un trasporto attivo o facilitato, confermando l'ipotesi per cui la classe di composti del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ viene internalizzata dalle cellule tumorali attraverso un sistema di diffusione passiva.

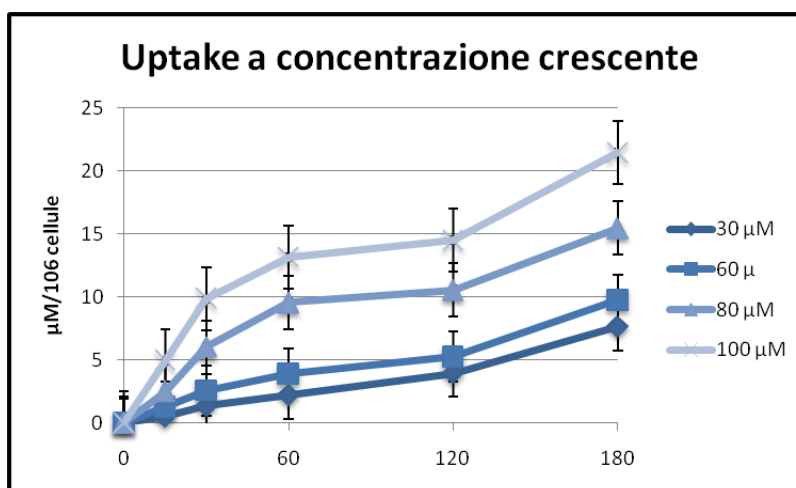


Fig. A63. Cinetica di *uptake* in cellule MCF-7 a concentrazioni crescenti di composto.

	Quantità di composto in cellule MCF-7 ($\mu\text{M}/10^6$ cellule)				
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min
30 μM	0,51	1,37	2,22	3,95	7,66
60 μM	1,27	2,57	3,88	5,25	9,76
80 μM	2,51	6,01	9,57	10,57	15,49
100 μM	4,95	9,88	13,16	14,51	21,45

Tab. A9. Quantità di complesso internalizzato da cellule MCF-7.

A4.11 Esperimenti di efflusso in cellule tumorali MCF-7

Esperimenti di *uptake* in cellule di tumore alla mammella MCF-7 sono stati eseguiti allo scopo di verificare se il rame, una volta all'interno della cellula tumorale rimanga intrappolato al suo interno o possa riattraversare la membrana cellulare.

Analogamente a quanto fatto in precedenza gli esperimenti sono stati effettuati in modalità "*carrier free*" e "*carrier added*" per poter lavorare anche in condizioni di concentrazione micromolare del tutto simili a quanto avviene negli studi di citotossicità. Le cellule tumorali sono state incubate a 37°C per un'ora con cellule MCF-7 dal momento che è già stato verificato negli esperimenti precedenti che si tratta di un tempo sufficiente affinché una buona quantità di complesso venga internalizzato dalla cellula.

Una volta separato dal terreno di coltura per centrifugazione, il pellet cellulare è stato risospeso in terreno di coltura fresco ed i conteggi della radioattività del terreno di coltura dopo 30 minuti e un'ora di incubazione a 37°C indicano che una quota significativa di rame, dopo essere entrato all'interno della cellula tumorale non rimane intrappolata ma è coinvolto in una cinetica di efflusso con uscita dalle cellule tumorali. I profili cromatografici HPLC e TLC dimostrano che il rame che esce dalla cellula tumorale non si trova più complessato a due leganti ditiocarbammici ma è in forma ionica o associato a delle componenti cellulari dal momento che si evidenziano dei picchi cromatografici a tempi di ritenzione molto bassi, compatibili con la formazione di specie decisamente più idrofile del prodotto di partenza. I dati TLC non presentano, inoltre, alcuna macchia ad Rf compatibile con quello del composto mentre i cromatogrammi HPLC mostrano la completa assenza del picco relativo al complesso (Figura A64).

Non si sono riscontrate differenze significative tra i composti $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ e $[^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$.

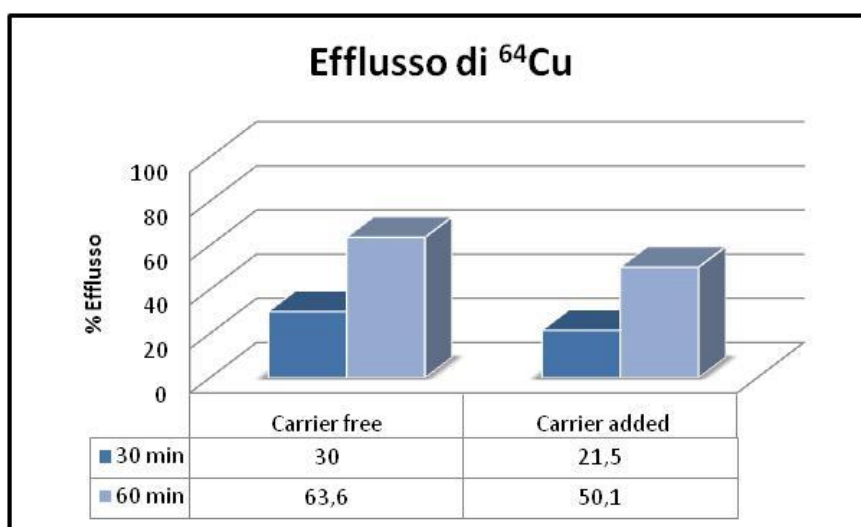


Fig. A64. Cinetica di efflusso di $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ da cellule MCF-7.

A4.12 Esperimenti di *uptake* in cellule non tumorali HEK

Per fare una prima valutazione circa la possibile selettività d'azione dei complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ nei confronti delle cellule tumorali rispetto alle cellule sane sono stati eseguiti esperimenti di *uptake* su cellule umane embrionali di rene (HEK). Gli esperimenti sono stati condotti a diverse temperature (4°C e 37°C) allo scopo di evidenziare differenze imputabili al coinvolgimento di sistemi di trasporto attivo. Inoltre, gli esperimenti sono stati effettuati in modalità “*carrier free*” e “*carrier added*” in modo tale da lavorare anche in condizioni di concentrazione micromolare del tutto simile a quanto avviene negli studi di citotossicità con la possibilità di “sporcare” il composto con dell’analogo composto radiomarcato con ^{64}Cu per seguire in modo efficace il destino del metallo, una volta a contatto con le cellule.

Tutti gli esperimenti descritti sono condotti in parallelo anche con cellule MCF-7 in modo tale da poter confrontare con maggiore affidabilità i risultati ottenuti.

Nell’esperimento in “*carrier free*” i conteggi della radioattività presente nel terreno di coltura e nel *pellet* cellulare, separati in seguito a centrifugazione, sono piuttosto interessanti dal momento che sia per il composto $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ che per $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$ evidenziano una percentuale di *uptake* significativamente inferiore nelle cellule non tumorali HEK rispetto alle MCF7. Dopo due ore di incubazione, infatti, sia a 4°C che 37°C, l’*uptake* a livello delle cellule tumorali si attesta attorno al 35% mentre nelle cellule embrionali di rene si ferma a valori vicini al 10%, dimostrando l’esistenza di una selettività nel processo di internalizzazione a favore delle cellule tumorali non trascurabile. I risultati sono confermati anche nell’esperimento in “*carrier added*”, quindi in presenza di una concentrazione di composto circa 1000 volte superiore e in generale suggeriscono la possibilità di sfruttare questi composti radiomarcanti con ^{64}Cu come agenti diagnostici in grado di localizzarsi selettivamente a livello di una massa tumorale. Studi di biodistribuzione ed *imaging in vivo* in animali inoculati si rendono perciò necessari per approfondire l’applicazione medico nucleare.

I risultati dell’esperimento sono riassunti in Figura A65 e in Tabella A10.

Carrier free	HEK		MCF-7	
	4°C	37°C	4°C	37°C
15 min	3,5 %	6,4 %	16,7%	14,6%
30 min	6,7 %	9,3 %	23,2%	18,5%
60 min	9,5 %	8,1 %	26,5%	17,5%
120 min	7,8 %	14,1 %	36,3%	35,1%

Carrier added	HEK		MCF-7	
	4°C	37°C	4°C	37°C
15 min	4,5 %	6,6 %	21,4 %	18,4 %
30 min	2,7 %	6,7 %	28,0 %	20,8 %
60 min	4,8 %	7,8 %	27,3 %	26,9 %
120 min	8,3 %	15,4 %	34,5 %	35,8 %

Tab. A10. Valori di *uptake* di $[\text{}^{64}\text{Cu}(\text{DEDC})_2]$ in cellule MCF-7 e HEK.

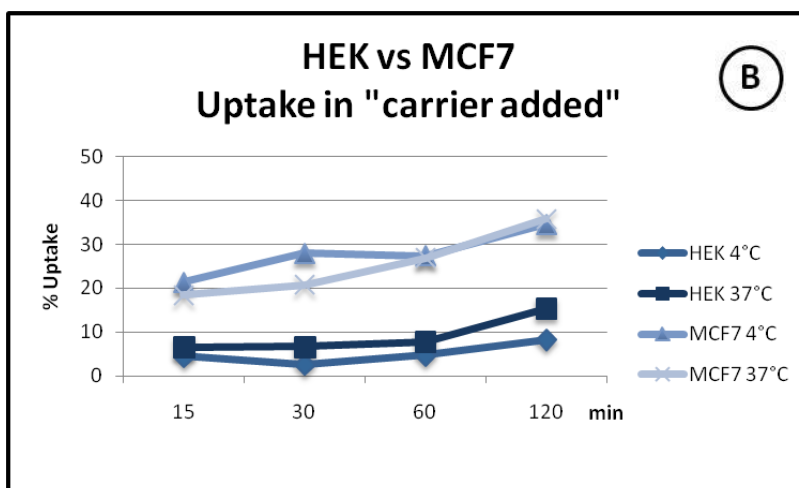
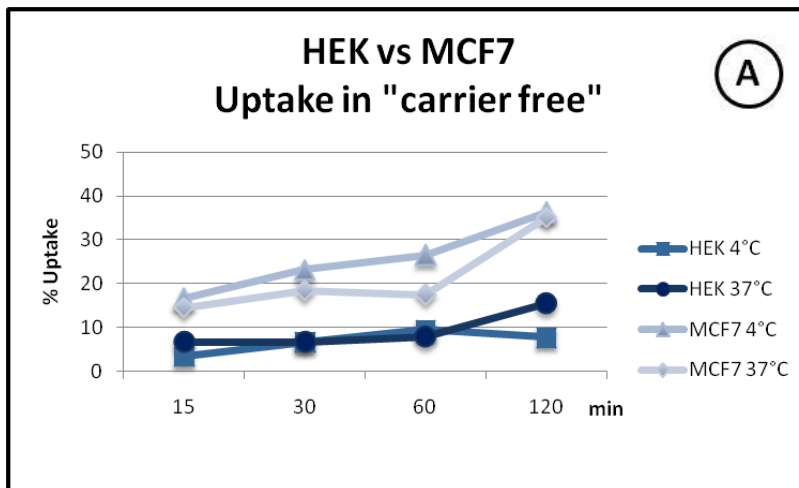


Fig. A65. A) Cinetica di uptake in modalità "carrier free" di $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDIC})_2]$ in cellule MCF-7 e HEK.
 B) Cinetica di uptake in modalità "carrier added" di $[^{64}\text{Cu}(\text{DEDIC})_2]$ in cellule MCF-7 e HEK.

A4.13 Esperimenti di *uptake* e lisi cellulare in cellule tumorali MCF-7

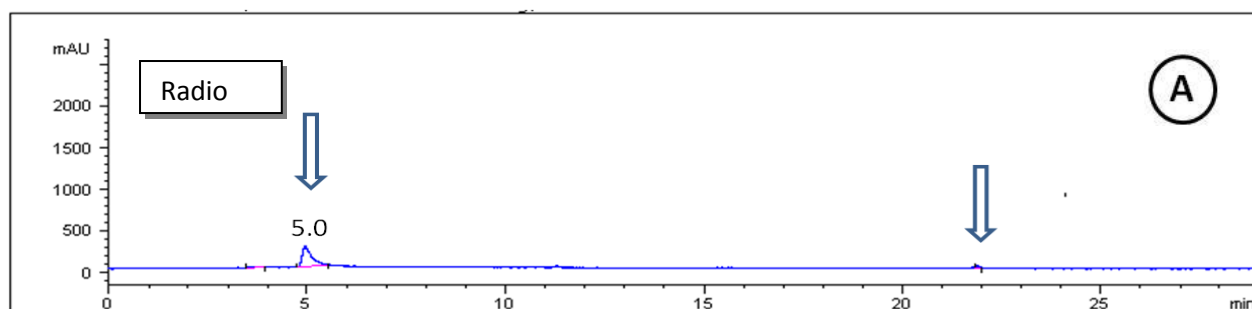
Esperimenti di *uptake* in cellule di tumore alla mammella MCF-7 sono stati eseguiti allo scopo di effettuare successivamente un trattamento di lisi cellulare in modo tale da approfondire qual è il comportamento del rame una volta all'interno della cellula tumorale. Analogamente a quanto fatto in precedenza gli esperimenti sono stati effettuati in modalità "*carrier free*" e "*carrier added*" per poter lavorare anche in condizioni di concentrazione micromolare del tutto simili a quanto avviene negli studi di citotossicità. Le cellule tumorali sono state incubate a 37°C per un'ora con cellule MCF-7 dal momento che è già stato verificato negli esperimenti precedenti che si tratta di un tempo sufficiente affinché una buona quantità di complesso venga internalizzato dalla cellula.

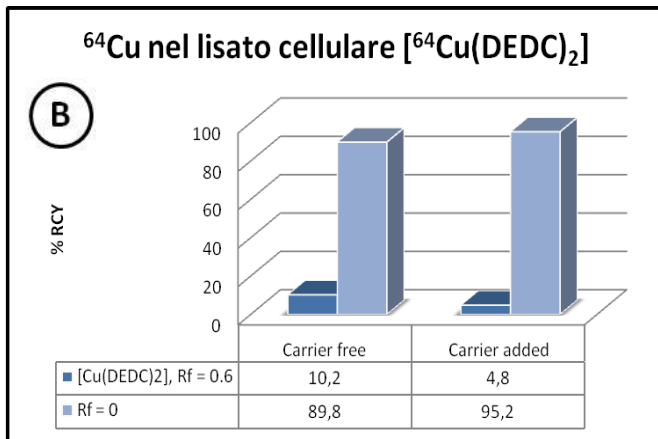
Una volta separato dal terreno di coltura per centrifugazione, il *pellet* cellulare ha subito un trattamento di shock termico ed è stato incubato con un buffer di lisi per provocare la rottura delle membrane cellulari che a loro volta sono state separate per centrifugazione dalla frazione citoplasmatica.

I conteggi della radioattività e i profili cromatografici HPLC e TLC delle frazioni così ottenute hanno evidenziato che la maggior parte del ^{64}Cu è localizzata nel citoplasma e negli organelli cellulari mentre soltanto una minima parte rimane intrappolata a livello delle membrane. I profili cromatografici HPLC e TLC della frazione citoplasmatica rivelano, inoltre, che all'interno della cellula tumorale il complesso è sottoposto ad un rapido processo di degradazione. I dati TLC, infatti, non presentano alcuna macchia ad R_f compatibile con quello del composto di partenza mentre è presente un'unica macchia con $R_f = 0$. I cromatogrammi HPLC mostrano la completa assenza del picco relativo al complesso mentre la radioattività è localizzata in un picco a $t_r = 5$ min. Sulla base di queste informazioni si può dedurre che il prodotto, una volta entrato in forma inalterata nella cellula tumorale, al suo interno degrada e il rame non rimane in forma ionica ma piuttosto si associa a delle componenti cellulari dal momento che il picco cromatografico relativo allo ione Cu^{2+} in soluzione ha un $t_r = 2.30$ min, inferiore a quello riscontrato.

Non si sono evidenziate differenze significative imputabili alla variazione di concentrazione negli esperimenti in "*carrier free*" e in "*carrier added*" e non vi sono differenze di comportamento tra i composti $^{64}\text{Cu}(\text{DED})_2$ e $^{64}\text{Cu}(\text{PDTC})_2$.

I risultati ottenuti dalla lisi cellulare sono riassunti in Figura A66.





C

	Carrier free	Carrier added
Lisato	81 μCi	99,5 μCi
Membrane	18,5 μCi	19,5 μCi
% Citoplasma	81,4 %	83,6 %

Fig. A66. A) Cromatogramma del lisato cellulare MCF-7. Si osserva la scomparsa del picco relativo al complesso e la formazione di un picco a tempi di ritenzione molto inferiori; B) Profilo TLC del lisato cellulare; C) Conteggi di radioattività della frazione citoplasmatica e delle membrane cellulari.

A4.14 Accumulo di rame nelle cellule tumorali

L'accumulo di rame all'interno delle cellule tumorali in seguito ad incubazione con i complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$, è stato valutato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornetto di grafite (GF-AAS). Si tratta di una tecnica che permette di eseguire analisi di metalli sia quantitative che qualitative dal momento che si basa sulle proprietà degli atomi di assorbire determinate radiazioni. Ogni tipo di atomo, con il suo numero di elettroni, situati in determinati orbitali permette di registrare spettri di assorbimento caratteristici che consentono l'identificazione qualitativa di ogni metallo. Le cellule utilizzate per questo studio sono le cellule di tumore alla mammella MCF-7 ma anche le cellule di carcinoma ovarico umano 2008 e le C13*, variante resistente al cis-platino delle cellule 2008. Come riportato nel Paragrafo A4.4 i composti $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ hanno dimostrato elevata attività citotossica anche nei confronti di queste ultime due linee cellulari. Per gli esperimenti è stato impiegato il complesso non radioattivo $[\text{Cu}(\text{DED})_2]$ e la quantità di rame internalizzata dalle cellule di ciascun campione è stata ricavata attraverso GF-AAS ad una lunghezza d'onda di 327.4 nm. Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti anche in assenza del complesso come controllo e in presenza del ditiocarbammato non complessato $\text{DED} \text{NH}_4^+$.

I risultati ottenuti, riportati in Figura A67, indicano chiaramente come la presenza del complesso $[\text{Cu}(\text{DED})_2]$ determini un forte accumulo di rame all'interno delle cellule tumorali. Il ditiocarbammato libero è in grado di determinare un aumento molto limitato della concentrazione cellulare di rame rispetto al controllo non trattato (circa 2 volte) molto probabilmente dal momento che è in grado di complessare degli ioni Cu^{2+} presenti nel terreno di coltura e in questo modo attraversare la membrana cellulare. Il complesso $[\text{Cu}(\text{DED})_2]$ provoca invece un aumento di 10-15 volte del contenuto di rame rispetto al controllo evidenziando chiaramente come il ditiocarbammato si comporti come uno ionoforo che consente al rame di attraversare la membrana cellulare sotto forma di complesso.

In questo modo si determina una situazione di *overload* di rame nella cellula tumorale che può causare una serie di eventi tra cui l'inibizione del proteasoma, la coordinazione aspecifica a proteine che perdono la loro funzionalità e l'alterazione del ciclo ossido-riduttivo del glutatione che in definitiva portano alla morte cellulare, come già riportato in letteratura⁽¹⁶³⁾.

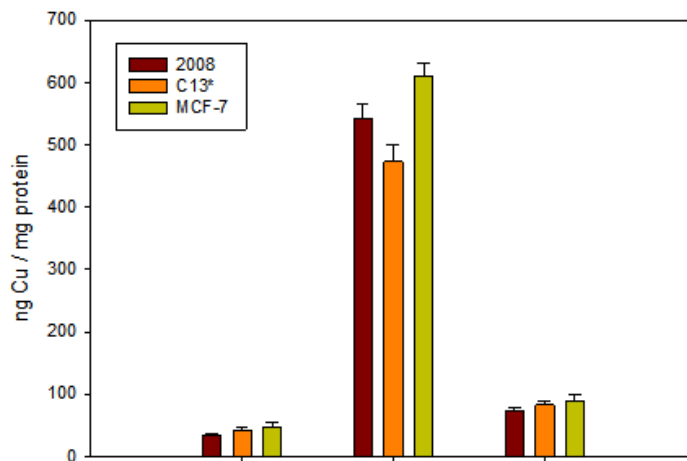


Fig. A67. La concentrazione di rame in cellule MCF-7, 2008 e C13* in seguito all'incubazione con il complesso (al centro) e il legante libero (a destra).

A5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In questo lavoro sono stati sintetizzati e completamente caratterizzati una libreria di complessi neutri e simmetrici di Cu^{2+} del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ con leganti ditiocarbammici, suddivisi nelle due classi di riferimento dei ditiocarbammati ciclici e lineari. Come materiale di partenza è stato impiegato rame cloruro e sono state affrontate diverse vie sintetiche soprattutto per approfondire ambienti di reazione il più possibile compatibili con le procedure di marcatura con l'isotopo radioattivo ^{64}Cu . I composti ottenuti sono caratterizzati dalla presenza di due leganti ditiocarbammici che coordinano il centro metallico ciascuno attraverso due atomi di zolfo per avere dei complessi a numero di coordinazione 4 e geometria quadrato planare.

In tutti i casi i prodotti sono stati ottenuti in alta resa e sono stati ampiamente caratterizzati mediante analisi elementare, spettrometria IR, spettrofotometria UV-Vis e spettrometria di massa ESI(+).

È stata valutata l'attività biologica di tutti i composti nei confronti di diverse linee di cellule tumorali umane. I valori di IC_{50} rilevati dimostrano che questa classe di composti ha una attività citotossica significativa, superiore a quella del cisplatino, che si mantiene anche su cellule tumorali resistenti a quest'ultimo. In particolare i composti più interessanti dal punto di vista della loro attività biologica sembrano essere quelli con ditiocarbammati lineari.

Inoltre, la chimica di coordinazione è stata trasferita a livello di tracciante con ^{64}Cu e i complessi $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ sono stati ottenuti con una resa radiochimica molto elevata dopo 15 minuti a temperatura ambiente. La stabilità e l'efficienza di questo set di coordinazione è stato valutata e i prodotti si sono rivelati stabili nell'ambiente di marcatura e soprattutto nei confronti di reazioni di transchelazione con glutatione, cisteina ed istidina anche dopo incubazione a 37°C per 24 ore e di transmetallazione con Zn^{2+} .

I complessi $[\text{Cu}(\text{DEDTC})_2]$ e $[\text{Cu}(\text{PDTC})_2]$ sono stati ottenuti in alta resa radiochimica anche impiegando un sistema di marcatura adatto alla somministrazione *in vivo* senza ulteriore purificazione. I prodotti così ottenuti si sono rivelati stabili in siero umano dopo 30 minuti a 37°C e in terreno di coltura cellulare e *buffer* di lisi cellulare dopo un'ora a 37°C .

Infine, è stato approfondito il meccanismo d'azione attraverso il quale questa classe di composti è in grado di attraversare la membrana cellulare ed esplicare la sua attività citotossica ed in particolare si è verificato che l'*uptake* in cellule di tumore alla mammella MCF-7 si attesta attorno al 30% dopo un'ora di incubazione. La cinetica di *uptake* non è influenzata da variazioni di temperatura e non è quindi molto probabilmente associata ad alcun sistema di trasporto attivo che verrebbe inibito a bassa temperatura. A conferma di questi dati è stato verificato che l'*uptake* di questi composti non coinvolge i trasportatori transmembrana hCTR1 e DMT1 in quanto l'internalizzazione in cellule MCF-7 non è inibita dalla presenza di uno ione monovalente quale Ag^+ che sfrutta hCTR1 per accumularsi all'interno delle cellule o di uno ione bivalente

come Zn^{2+} che utilizza DMT1 per attraversare la membrana cellulare. Anche esperimenti di *uptake* condotti a concentrazioni crescenti di complesso sono in accordo con questi risultati dal momento che non si osserva nessun processo di saturazione del sistema di trasporto, che invece si dovrebbe osservare in presenza di un trasporto attivo o facilitato.

È stata dimostrata, inoltre, la presenza di una cinetica di efflusso per cui il rame, una volta all'interno delle cellule tumorali MCF-7 è in grado di riattraversare la membrana cellulare in quantità significativa ed in una forma chimica differente da quella complessata con due ditiocarbammati.

Un esperimento di *uptake* eseguito in parallelo su cellule tumorali MCF-7 e su cellule sane embrionali renali (HEK) ha evidenziato come questa classe di complessi venga internalizzata con una buona selettività, quantificabile nell'ordine del 15-20% dopo due ore sia a 4°C che 37°C, da parte delle cellule tumorali rispetto a quelle sane.

Infine, esperimenti di assorbimento atomico hanno confermato che l'incubazione di cellule tumorali con questa classe di composti determina un accumulo molto significativo di rame all'interno delle cellule con un conseguente sovraccarico di rame, responsabile di una serie di eventi che portano alla morte cellulare con esplicazione dell'attività citotossica⁽¹⁶³⁾ (Figura A68).

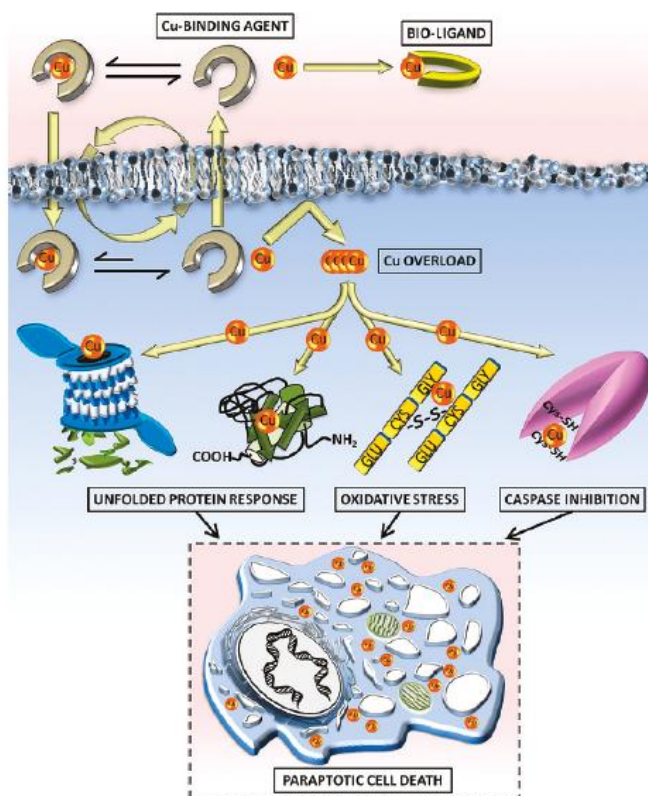


Fig. A68. Meccanismo d'azione di complessi di rame che agiscono come ionofori ed eventi cellulari causati da un sovraccarico di rame.

In conclusione, quindi, complessi del tipo $[\text{Cu}(\text{DTC-Ln})_2]$ si sono rivelati molto interessanti sia sotto un profilo radiofarmaceutico che come potenziali farmaci antitumorali. Infatti, i complessi radiomarcanti si ottengono in alta resa, a temperatura ambiente, in condizioni fisiologiche e sono cineticamente stabili nelle diverse condizioni testate. Inoltre, la selettività dimostrata per questi composti nei confronti di cellule tumorali MCF7 rispetto a cellule sane HEK permette di ipotizzare l'impiego di questi prodotti come agenti di *imaging* per la diagnosi di masse tumorali. A questo riguardo si rendono necessari in un futuro prossimo degli studi di biodistribuzione e di *imaging in vivo* mediante una *Small Animal PET* in modo tale da verificare il comportamento *in vivo* su animali sani ma anche su animali inoculati con un tumore. Inoltre, se il set coordinativo dimostrerà di avere caratteristiche tali da poter essere sviluppato per interessanti applicazioni radiofarmaceutiche si potranno opportunamente derivatizzare i leganti ditiocarbammici allo scopo di migliorare ulteriormente le caratteristiche di stabilità del sistema e di veicolare una molecola bioattiva per la progettazione di agenti *target* specifici da impiegare nella diagnostica per immagini PET.

Gli esperimenti eseguiti per approfondire il meccanismo d'azione di questa classe di composti hanno dimostrato che i complessi agiscono essenzialmente come degli ionofori ovvero delle specie che consentono al rame di attraversare la membrana cellulare ed accumularsi all'interno delle cellule in quantità molto maggiore di quanto potrebbe fare in forma ionica. Il sovraccarico di rame che si viene a creare determina una serie di modifiche cellulari già identificate, quali il legame aspecifico con proteine che perdono la loro funzionalità, l'alterazione nel normale ciclo ossido-riduttivo del glutatione e l'inibizione del proteasoma che portano alla morte cellulare.

Ringraziamenti:

Questo lavoro di ricerca è stato supportato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR): PRIN 20097FJHPZ-004 and FIRB RBAP114AMK

SEZIONE B

***Sintesi e valutazione biologica di complessi di gallio
con leganti ditiocarbammici***

B1 LA CHIMICA DEL GALLIO

B1.1 La chimica del Ga(III)

Il gallio è un metallo appartenente al gruppo 13, periodo 4, della Tavola periodica. Il suo numero atomico è 31 e la sua configurazione elettronica $[\text{Ar}]4s^2 3d^{10} 4p^1$ e deve il suo nome alla Gallia luogo di nascita di Lecoq de Boisbaudran, chimico francese che lo scoprì nel 1886. Egli osservò che il gallio aveva le proprietà di “eka-alluminio” predette da Mendeleev 6 anni prima.

Il gallio è un metallo non presente nel nostro organismo a livello fisiologico ed esiste in tre stati di ossidazione (+1, +2, +3), ma, in soluzione acquosa, la chimica di coordinazione del gallio è esclusivamente rappresentata dallo stato di ossidazione stabile 3+. Ciò comporta che reazioni di ossidazione o riduzione del Ga(III) in condizioni fisiologiche non avvengono.

Il gallio in soluzione va in contro ad un complesso fenomeno di equilibri dipendenti dalla concentrazione, dal tempo e dal pH. In Figura B1 è riportata la speciazione del Ga^{3+} in funzione del pH, il diagramma è semplificato, dal momento che non considera la formazione di specie polimeriche ed è evidenziata la natura anfotera del gallio idrossido $\text{Ga}(\text{OH})_3$.

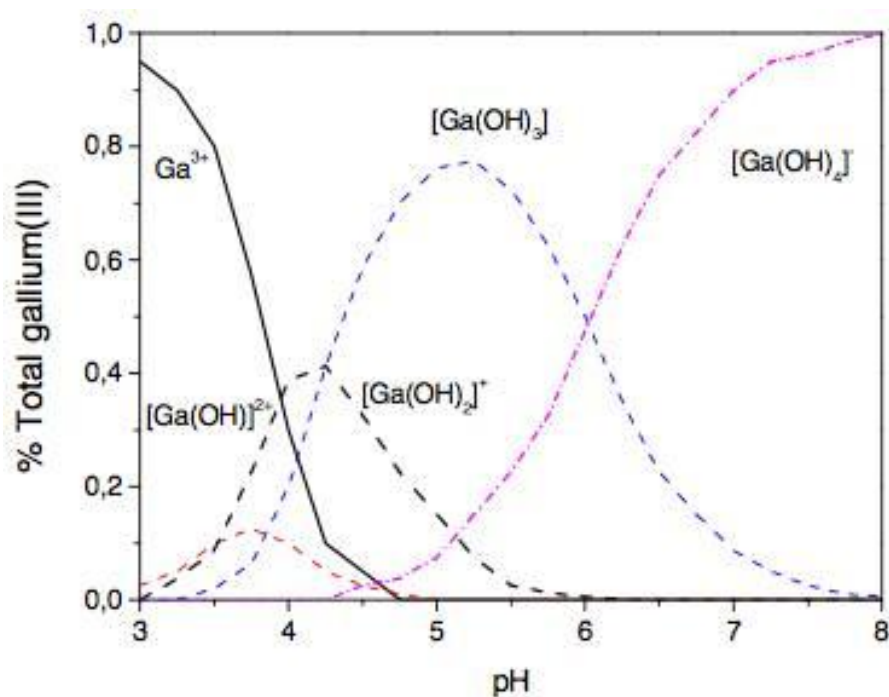


Fig. B1. Speciazione del Ga^{3+} in funzione del pH

Lo ione Ga^{3+} è solubile a pH molto acidi mentre nella regione compresa tra pH 4 e 6 si verifica la precipitazione del composto insolubile neutro $\text{Ga}(\text{OH})_3$ (gallio idrossido). A $\text{pH} > 7$, il gallio idrossido ritorna

in soluzione sottoforma di $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ (tetraidrossigallato). Il gallio idrossido è, quindi, caratterizzato da un comportamento anfotero, essendo in grado di sciogliersi sia in ambiente basico sia in ambiente acido.

Questo comportamento del gallio in soluzione, determina che, per evitare la precipitazione del gallio idrossido a pH fisiologico è necessario utilizzare leganti in grado di non essere spiazzati dagli ioni OH^- presenti in soluzione⁽¹⁶⁴⁾.

Il catione Ga(III) è classificato come acido di Lewis forte sia per l'alta carica che per il piccolo raggio atomico (0.62 Å) e, di conseguenza, la sua chimica di coordinazione è caratterizzata dalla capacità di instaurare forti legami ionici con basi di Lewis forti non polarizzate come a base di ossigeno e l'azoto. Preferenzialmente forma complessi termodinamicamente stabili con leganti dotati di gruppi carbossilici, fosfonici e amminici funzionalizzati, ma anche con atomi di zolfo donatori come gruppi tiolati⁽¹⁶⁵⁾.

Un altro aspetto molto importante da tenere in considerazione, soprattutto nella progettazione di leganti per il Ga(III) è dato dal fatto che questo metallo presenta una chimica di coordinazione e delle proprietà in vivo molto simili a quelle del Fe(III). Ciò è dovuto da alcune proprietà chimiche e chimico-fisiche paragonabili, tra le quali le più importanti sono l'elettronegatività, il raggio ionico e l'affinità elettronica. In Tabella B1 sono schematizzati i relativi valori per i due metalli.

	Gallio	Ferro
Elettronegatività	1.81	1.83
Raggio ionico (Å)	0.620	0.645
Affinità elettronica (eV)	31.71	30.65

Tab. B1. Confronto tra i valori di elettronegatività, raggio ionico, affinità elettronica tra Ga(III) e Fe(III)

Ciò che invece differenzia questi due metalli è il comportamento ossido riduttivo, dovuto dal fatto che il Fe^{3+} può essere facilmente ridotto a Fe^{2+} e ri-ossidato in condizioni fisiologiche, mentre il gallio non si riduce in simili condizioni.

La somiglianza del gallio al ferro influenza notevolmente la sua biodistribuzione, in particolare per quanto riguarda il suo trasporto nel sangue e il suo ingresso all'interno delle cellule. Infatti, studi hanno dimostrato che il gallio presenta una spiccata affinità per la transferrina, proteina delegata al trasporto del ferro. Considerando che il legame del gallio con queste proteine del ferro risulta essere pH dipendente e in particolare diminuisce in condizioni acide, il gallio può essere facilmente rilasciato nei tessuti tumorali dove il pH è minore rispetto ai tessuti normali, permettendo in questo modo una localizzazione selettiva del metallo.

Attraverso la transferrina il gallio è in grado di essere trasportato nel sangue e di entrare all'interno delle cellule, legarsi ad enzimi ferro dipendenti come la ribonucleotide reductasi (RR), sostituirsi allo ione Fe^{3+} e

una volta incorporato inibire l'enzima, grazie all'incapacità di modificare il proprio stato di ossidazione, condizione necessaria per lo svolgimento dell'attività enzimatica.

Grazie a questa proprietà il gallio non interferisce con l'attività di importanti sistemi biologici come l'emoglobina e i citocromi che svolgono dei ruoli essenziali nel nostro organismo⁽¹⁶⁶⁾.

B1.2 La chimica di coordinazione del gallio

Per complesso di coordinazione si intende un composto costituito da un atomo o ione centrale (metallo), in grado di coordinare attorno a se delle specie chimiche definite leganti. Solitamente il metallo è un acido di Lewis in quanto accettore di elettroni, in grado di mettere a disposizione degli orbitali vuoti per i leganti, basi di Lewis in grado di donare elettroni.

Il numero di coordinazione di un complesso è rappresentato dal numero di legami che il metallo è in grado di instaurare e dipende dalla disponibilità degli orbitali vuoti sul metallo.

A seconda del numero di legami che essi sono in grado di formare con l'atomo centrale, i leganti si distinguono in monodentati, bidentati e così via.

Una delle proprietà principali dei complessi è rappresentata dalla loro geometria molecolare, dipendente dal numero di coordinazione.

Ogni complesso può essere, infatti, descritto da un particolare solido geometrico che si ottiene congiungendo idealmente le posizioni occupate dai vari atomi dei leganti coordinati al metallo e assegnando a quest'ultimo la posizione centrale all'interno della figura geometrica risultante.

Nel caso del gallio i suoi complessi presentano numeri di coordinazione che variano da 3 a 6 ed il più frequente è il 6. Per questo motivo, la geometria ottaedrica è quella che si trova più comunemente nei complessi di gallio, mentre più raramente è possibile apprezzare una geometria trigonale prismatica (Figura B2.). Si possono formare complessi anche tetra- penta- e coordinati, anche se quest'ultimi risultano essere molto più sensibili alla dissociazione per ragioni sia steriche che elettroniche.

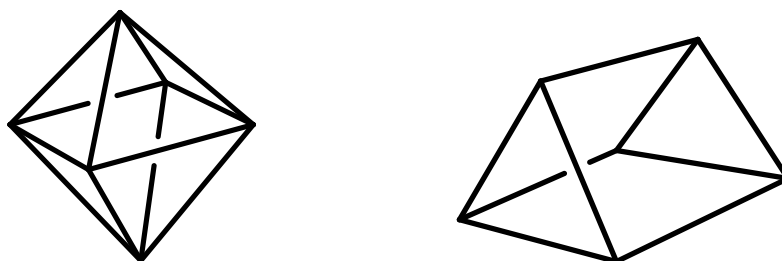


Fig. B2. Geometria ottaedrica e trigonale prismatica

B1.3 Gli isotopi del gallio in medicina nucleare

Esistono due isotopi naturali e stabili del Gallio, ^{69}Ga e ^{71}Ga , la cui abbondanza relativa è rispettivamente del 60.5% e 39.5% . Inoltre, vi sono, una serie di isotopi sintetici radioattivi che possono essere prodotti attraverso un ciclotrone o un reattore. Un elenco dei radioisotopi del Gallio con le loro caratteristiche nucleari è riportato in Figura B3.

<u>ISOTOPES OF GALLIUM*</u>				
	<u>Half-Life</u>	<u>Type of Decay</u>	<u>Energy of Radiation</u>	<u>Some Typical Modes of Formation</u>
Ga^{64}	2.6 min.	β^+	~5	Zn^{64} (p, n)
Ga^{65}	15 min.	γ	0.97, 2.2, 3.8	(d, 2n)
		β^+	2.2	Zn^{64} (d, n)
Ga^{65}	8 min.	$e^- \gamma$	0.052	
		β^+	-----	
Ga^{66}	9.4 hrs.	γ	0.092, 0.114	
		β^+	4.14	Zn^{66} (d, 2n)
		ec	-----	(p, n)
		γ	0.83 to 4.83	Cu^{63} (α , n)
Ga^{67}	78 hrs.	ec	-----	
		γ	0.09 to 0.9	Zn^{66} (d, n)
Ga^{68}	68 min.	β^+	1.88	Zn^{68} (d, 2n)
		ec		Cu^{65} (α , n)
		γ	1.10	Ge^{70} (d, α)
Ga^{69}	60.5% Abundance (Stable)			
Ga^{70}	21.4 min.	β^-	1.65	Ga^{69} (n, γ)
		γ	0.17, 1.04	Ga^{69} (d, p)
Ga^{71}	39.5% Abundance (Stable)			Ge^{70} (n, p)
Ga^{72}	14.2 hrs.	β^-	0.6, 0.9, 1.5, 2.5, 3.1	Ge^{72} (d, α)
		γ	0.84, 2.508, 2.491 plus others	Ga^{71} (d, p)
Ga^{73}	5.0 hrs.	β^-	1.4 (to Ge^{73m2})	Ga^{71} (n, γ)
Ga^{74}	8 min.	β^-	1.1, 2.0, 2.65	Ge^{72} (n, p)
		γ	0.60, 2.3, others	Ge^{73} (n, p)
				Ge^{74} (n, p)
				Ge^{74} (n, f)

Fig. B3. Tempi di dimezzamento e tipi di decadimento degli isotopi di gallio

Tra questi, i tre isotopi che hanno suscitato maggiore interesse nel campo della medicina nucleare sono il ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga .

Il ^{67}Ga è un radionuclide prodotto mediante ciclotrone, decade emettendo radiazione γ la cui massima energia è 184.6 keV, valore ottimale necessario per ottenere una buona risoluzione e qualità dell'immagine nella diagnostica SPECT. Il tempo di dimezzamento $t_{1/2}$ di questo isotopo del gallio è pari a 78.27h, tempo ampiamente sufficiente per consentire la sintesi del radiofarmaco, il controllo, la somministrazione, la biodistribuzione e la captazione a livello della zona desiderata. Inoltre essendo il ^{67}Ga prodotto mediante ciclotrone la sua emivita ne permette il trasporto anche in una sede lontana dalla produzione.

Il ^{67}Ga è stato utilizzato per più di 30 anni come gallio citrato per l'*imaging* di siti di infiammazione o infezione e, in minor misura, per la diagnosi di alcuni tipi di tumori. Diversi studi hanno dimostrato che, dopo la somministrazione intravenosa di gallio citrato o altri complessi in cui i leganti sono associati debolmente al metallo, il ^{67}Ga si lega alle proteine in grado di coordinare il ferro come la transferrina, la ferritina e la lactoferrina, con successivo assorbimento nelle aree dove generalmente il ferro si accumula. La mancata specificità di distribuzione nei diversi tessuti limita l'utilizzo di derivati di ^{67}Ga come agente specifico per la localizzazione del tumore.

Gli altri isotopi più utilizzati in medicina nucleare sono il ^{66}Ga e il ^{68}Ga , che decadono attraverso l'emissione di positroni. Il ^{66}Ga decade emettendo per il 56% positroni β^+ la cui massima energia è 4.153 MeV, mentre, per il 44% emette radiazioni γ con una energia massima pari a 1.039 e 2.572 MeV e inoltre presenta un'emivita pari a 9.49 h.

Il ^{68}Ga decade emettendo per l'89% positroni β^+ con un'energia massima di 1.899 MeV, presenta un tempo di dimezzamento pari a 68 min, paragonabile a quello del ^{18}F , che risulta essere sufficientemente lungo per permettere la sintesi, la purificazione e la biodistribuzione del complesso radiochimico così da garantire un'ottima qualità dell'immagine, ma non troppo prolungata così da limitare la dose di radiazione assorbita dal paziente⁽¹⁶⁷⁾.

Altro grande vantaggio dell'isotopo ^{68}Ga è dato dalla possibilità di ottenerlo mediante generatore portatile a differenza della maggior parte degli altri isotopi come il ^{18}F , ^{11}C , ^{64}Cu e ^{177}Lu , la cui produzione è vincolata dall'utilizzo di un ciclotrone.

Il generatore per la produzione del ^{68}Ga è rappresentato da un sistema in cui da un radionuclide padre, con emivita relativamente lunga, in questo caso il ^{68}Ge , si ottiene un radionuclide figlio a breve emivita. In questo modo è possibile utilizzare degli isotopi a breve emivita anche in una sede distante dalla produzione.

Il generatore Germanio-68/Gallio-68 è costituito da un contenitore cilindrico in piombo nel quale è presente una colonna a scambio ionico in diossido di titanio, sulla quale è adsorbito il ^{68}Ge , prodotto mediante ciclotrone (Figura B4).



Fig. B4. Generatore portatile $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

La produzione del germanio-68 avviene mediante il bombardamento, con un fascio di protoni, di un target di gallio-69, con conseguente spiazzamento di 2 neutroni e formazione del nucleo di germanio-68 radioattivo. L'isotopo così formato è caratterizzato da una lunga emivita pari a 270.8 giorni così da permettere l'utilizzo di uno stesso generatore per quasi due anni. Attraverso un secondo processo di decadimento, definito per cattura di elettroni, si ha la cattura di un elettrone degli orbitali periferici ed emissione di un neutrino, con formazione del ^{68}Ga , che può essere facilmente eluito sotto forma di cloruro di gallio con una soluzione di acido cloridrico 0.1M, ottenendo così un eluato con un'elevata purezza radiochimica. In Figura B5 è mostrato lo schema di formazione e decadimento del gallio-68.

La possibilità di operare lontano dall'impianto di ciclotrone e la lunga emivita del ^{68}Ge , che consente al generatore di poter essere utilizzato per 1-2 anni, ha reso l'utilizzo del ^{68}Ga di grande interesse sia dal punto di vista medico sia dal punto di vista economico⁽¹⁶⁸⁾.

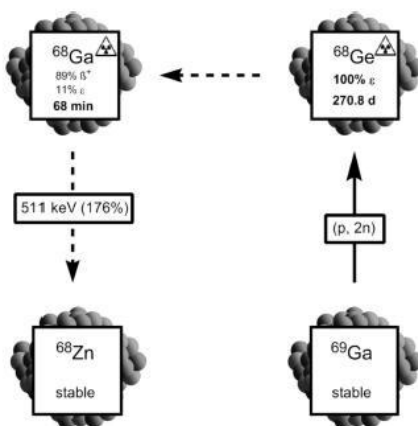


Fig. B5. Schema di produzione e decadimento di ^{68}Ga .

B1.4 Complessi di gallio in medicina nucleare

La prima classe di leganti che è stata studiata per l'ottenimento di complessi con caratteristiche di stabilità tali da poter essere usati in medicina nucleare è costituita da molecole alicicliche e la maggior parte dei complessi ottenuti presentano un certo grado di instabilità, anche se alcuni di questi leganti hanno comunque portato alla formazione di composti caratterizzati da una sufficiente stabilità.

Tra questi possiamo ricordare il legante aliciclico 6SS (acido N,N'-bis(2,2-dimetil-2-mercaptoetil)etilen-diammina -N,N'- diacetico) che coordina il gallio con sfera di coordinazione $N_2O_2S_2$, mediante 2 atomi di azoto delle ammine, i due ossigeni dei due gruppi carbossilici e 2 zolfi dei tioli. Il complesso ottenuto risulta essere stabile in varie condizioni, sia in vivo sia in vitro⁽¹⁶⁹⁾.

Il legante TAME (1,1,1-tris(amminometil)etano) è stato, invece, spesso utilizzato come punto di partenza per la sintesi di diversi chelanti. Un derivato del TAME è stato sintetizzato in combinazione con il ^{68}Ga e può essere utilizzato per valutare il flusso sanguigno miocardico⁽¹⁷⁰⁾. Più recentemente sono stati sintetizzati dei leganti multidentati bifunzionali derivati del TAME, dal nome TAME Hex (acido tris-(amminometil)etan-N,N,N',N',N'',N''- esacetico) in grado di coordinare il metallo attraverso 9 atomi elettrondonatori. Il relativo complesso ottenuto con ^{67}Ga risulta essere molto stabile.

Il DTPA (acido-dietilentriamminopentacetico) è uno dei leganti aciclici maggiormente utilizzati in radiochimica ed è in grado di legare il gallio formando un complesso (esacoordinato) dotato di un'elevata stabilità⁽¹⁶⁵⁾ (Figura B6).

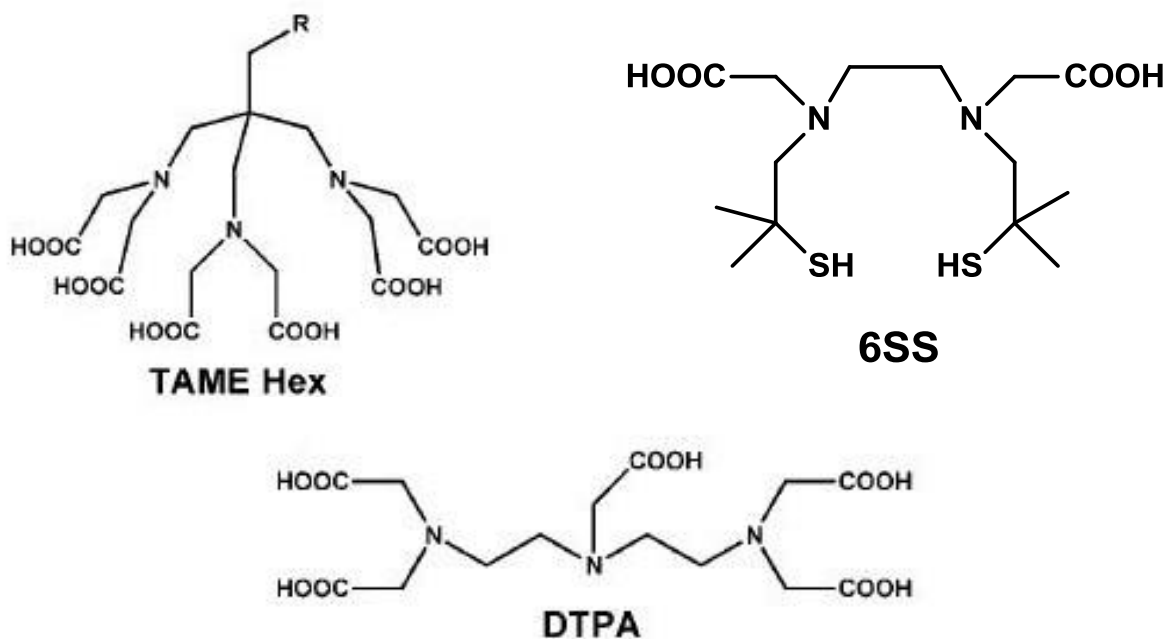


Fig. B6. Struttura di 6SS, TAME Hex, DTPA.

In generale, però, i leganti ciclici sono in grado di determinare la formazione di complessi molto più stabili dei chelanti aliciclici, grazie ad un'elevata costante di stabilità termodinamica, una maggiore resistenza alla dissociazione e alla transchelazione, tutti aspetti molto importanti in diagnostica, in quanto è necessario che il complesso arrivi integro al sito bersaglio.

Una delle classi di leganti che ha riscontrato maggiore successo è rappresentata dai poliazamacrocicli, molecole cicliche a 9 atomi in grado di coordinare il metallo attraverso i loro atomi di azoto, come il TACN (1,4,7-triazaciclononano) e il cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclododecano) (Figura B7).

Allo scopo di saturare la sfera di coordinazione del Ga(III) sono stati sintetizzati dei derivati del TACN e cyclen, dove a livello dell'ammina secondaria è stata introdotta una catena laterale dotata di una funzione chelante quale un gruppo tiolato, carbossilato o fosfonato in grado di coordinare il centro metallico.

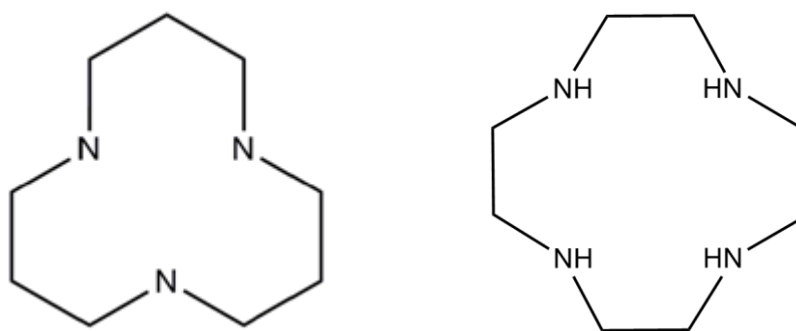


Fig. B7. Leganti aziamacrocicli cyclen e tacn.

I più importanti leganti appartenenti a questa categoria sono il DOTA (acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacetico), e il NOTA (acido 1,4,7-triazaciclononano-triacetico) le cui strutture sono riportate in Figura B8.

Il centro metallico del complesso [Ga(DOTA)] si trova in una sfera di coordinazione del tipo N_4O_2 , in cui il gallio si lega a 4 atomi di azoto dell'anello e a 2 atomi di ossigeno dei gruppi carbossilici. In questo modo restano disponibili 2 gruppi carbossilici, ai quali è possibile legare una o più molecole bioattive in modo da rendere la molecola target specifica. Il complesso [Ga(DOTA)], nelle condizioni fisiologiche presenta una carica globale negativa. Nonostante l'elevata stabilità del complesso [Ga(DOTA)], la formazione di un composto marcato con isotopi radioattivi è caratterizzato da una cinetica lenta, che può dipendere da diversi fattori quali le condizioni di radio marcatura, la concentrazione del coniugato con DOTA, la temperatura di reazione e la durata, il pH, il buffer utilizzato e la possibile presenza di altri metalli come Fe^{3+} e Zn^{2+} ⁽¹⁷¹⁾.

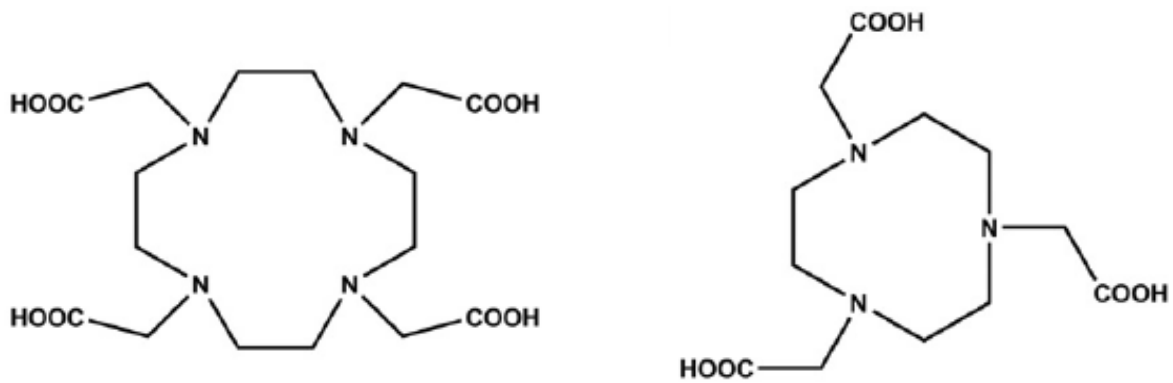


Fig. B8. Struttura dei chelanti macrociclici DOTA e NOTA

Per questo motivo, durante la procedura di marcatura è necessario riscaldare o utilizzare un sistema a microonde al fine di ottenere delle rese adeguate.

Nonostante queste limitazioni sono stati ottenuti dei derivati radiomarcati del [Ga(DOTA)] in cui è stata legata una molecola bioattiva. Alcuni composti si sono dimostrati così validi da essere attualmente in uso clinico, nella diagnostica per *imaging* di tipo PET. Questo è il caso dei complessi ^{68}Ga -DOTA-TOC, ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{68}Ga -DOTA-TATE, nei quali la molecola bioattiva è rappresentata da analoghi della somatostatina, in modo tale da permettere la localizzazione del radionuclide a livello dei tumori, caratterizzati da un'elevata espressione dei recettori per questa molecola⁽¹⁷²⁾.

Questi composti sono impiegati, soprattutto, nella diagnosi di tumori neuroendocrini e per la pianificazione della terapia radiometabolica con lutezio-177, radionuclide β^- emittente molto usato in terapia antitumorale.

In particolare nel caso del ^{68}Ga -DOTA-TOC⁽¹⁷³⁾ la molecola bioattiva è rappresentata da un derivato dell'octreotide, un octapeptide in grado di legarsi ai recettori SST-2 della somatostatina. Le immagini prodotte risultano essere di elevata specificità e sensibilità diagnostica, come dimostrato in Figura B9.

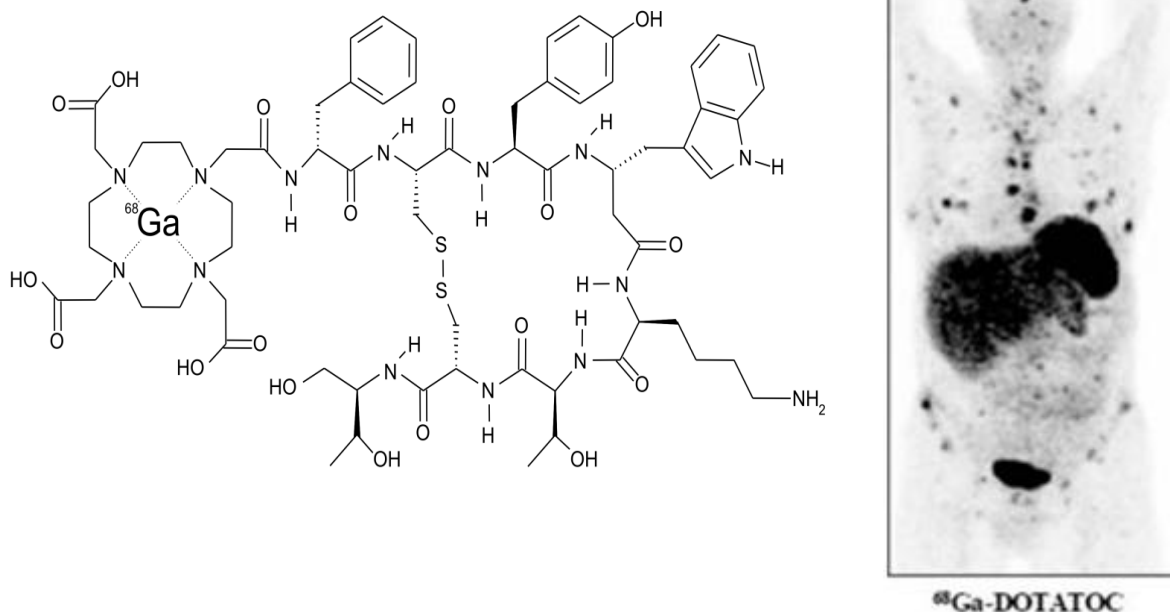


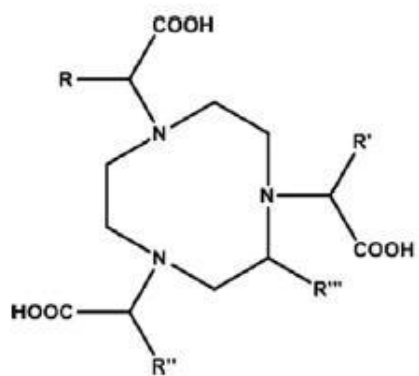
Fig. B9. La struttura del complesso $^{68}\text{Ga-DOTA-TOC}$ e un esempio di immagine PET ottenuta con questo composto.

Altri esempi di potenziali traccianti del gallio in cui è stato possibile legare al DOTA una molecola bioattiva sono il $^{68}\text{Ga-DOTA-EGF}$, per la localizzazione del recettore del fattore di crescita epidermico sovraespresso in alcuni tumori, $^{68}\text{Ga-DOTA-albumina}^{(174)}$ come marcatore del flusso ematico e $^{68}\text{Ga-DOTA-bombesina}$, complesso adatto per l'*imaging target* specifico di tumori gastrointestinali.

Un altro legante studiato per il ^{68}Ga è il NOTA, la cui coordinazione del metallo, a differenza del DOTA, risulta essere molto veloce a temperatura ambiente, permettendo così la marcatura di molecole termolabili, come ad esempio strutture proteiche anticorpali. Inoltre i complessi ottenuti risultano essere molto stabili in vivo, e hanno riscosso un grande interesse nel campo della medicina nucleare.

La coordinazione del metallo al legante avviene attraverso 3 atomi di azoto dell'anello e 3 atomi di ossigeno dei gruppi carbossilici, ottenendo così una struttura circa 9 volte più stabile del $[\text{Ga}(\text{DOTA})]$. Il problema principale di questo tipo di legante è che non presenta dei siti reattivi in grado di legare possibili molecole bioattive⁽¹⁷⁵⁾.

A partire dal legante NOTA si sono sviluppate diverse strutture chelanti che presentano dei siti reattivi, pur mantenendo la struttura originaria del complesso. Si sono così sintetizzati diversi derivati macrociclici coniugati con molecole bioattive. Un esempio sono i leganti NODAPA-OH e NODAPA-(NCS)_n (Figura B10), che hanno dimostrato un'efficacia di marcatura simile a quella del NOTA⁽¹⁷²⁾.



NODASA	$R = \text{CH}_2\text{COOH}, R' = R'' = R''' = \text{H}$
NODAGA	$R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}, R' = R'' = R''' = \text{H}$
<i>p</i> -SCN-Bn-NOTA	$R = R' = R'' = \text{H}, R''' = p\text{-Ph-NCS}$
NODAPA-OH	$R = p\text{-Ph-OH}, R' = R'' = R''' = \text{H}$
NODAPA-NCS	$R = p\text{-Ph-NCS}, R' = R'' = R''' = \text{H}$
NODAPA-(NCS) ₂	$R = R' = p\text{-Ph-NCS}, R'' = R''' = \text{H}$

Fig. B10. Chelanti derivati dal NOTA con siti reattivi per la funzionalizzazione con una biomolecola attiva.

B1.5 Il gallio nella terapia antitumorale

Semplici sali di gallio, come il gallio nitrato $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e il gallio cloruro GaCl_3 , sono stati studiati per più di trent'anni per la loro applicazione nella terapia antitumorale. Nel 1991 l'FDA ha approvato l'uso del gallio nitrato (Ganite™), per somministrazione intravenosa, per il trattamento di tumori caratterizzati da ipercalcemia. Infatti, diversi studi hanno dimostrato che il gallio nitrato è in grado di inibire il riassorbimento osseo nonostante la presenza di fattori di origine tumorale in grado di determinare una perdita di calcio a livello dell'osso. La somministrazione rapida del composto per via intravenosa, risulta essere tossica per i reni, a causa della formazione di idrossidi di gallio. Per questo motivo deve essere somministrato mediante lenta infusione continua per più giorni. Trial clinici hanno evidenziato che il gallio nitrato risulta essere efficace anche per il trattamento del linfoma, mieloma multiplo e in diversi tipi di altri tumori⁽¹⁷⁶⁾.

Nonostante l'elevata attività i sali di gallio, a livello clinico presentano alcuni aspetti sfavorevoli dovuti soprattutto alle loro proprietà farmacocinetiche e tossicologiche, non ottimali.

Al fine di trovare un modo per migliorare la somministrazione di gallio nitrato è stata progettata una particolare formulazione di gallio nitrato denominata G4544, è attualmente in fase I di sperimentazione clinica. Studi preclinici su animali hanno dimostrato che il farmaco viene rapidamente assorbito e raggiunge un livello plasmatico 4 volte superiore rispetto a quello ottenuto con gallio nitrato⁽¹⁷⁷⁾.

Per risolvere i problemi derivanti dall'utilizzo di sali semplici di gallio e per stabilizzare il metallo, sono stati studiati dei chelanti in grado di formare dei complessi stabili, in modo tale da poter migliorare l'assorbimento intestinale e il passaggio del metallo attraverso le membrane. La ricerca, dopo diversi studi, ha portato alla sintesi di due complessi, il gallio maltolato⁽¹⁷⁸⁾, tris-(3-idrossi-2-metil-4H-piran-4-onato)gallio(III) che è stato il primo complesso di gallio ad entrare in sperimentazione clinica e il KP46⁽¹⁷⁹⁾ (tris(8-quinolinolato) gallio(III)) riportati in Figura B11, entrambi ottenuti attraverso l'impiego di leganti bidentati che coordinano il metallo attraverso atomi di ossigeno e azoto.

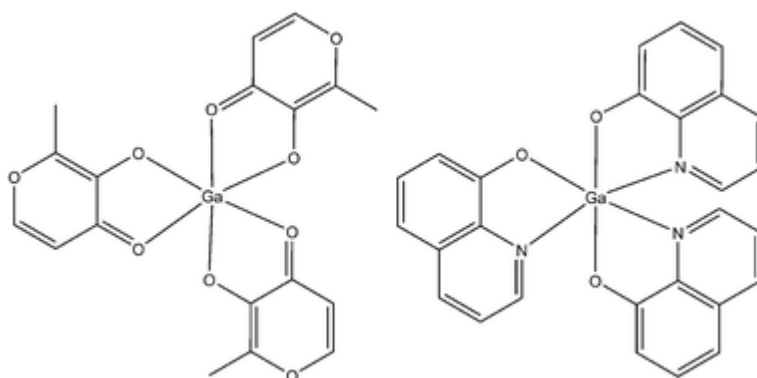


Fig. B11. Struttura del gallio maltolato e del KP46

Il maltolato è un legante bidentato in grado di coordinare il metallo attraverso due atomi di ossigeno. Il complesso gallio-maltolato, sviluppato per uso orale, è costituito da tre molecole di maltolato coordinate ad un atomo di gallio attraverso 2 atomi di ossigeno, riarrangiati in una struttura simile ad un elica.

Studi farmacocinetici su modelli animali hanno dimostrato un'elevata biodisponibilità dei due complessi se somministrati per via orale; studi in vitro hanno, invece, evidenziato un'attività antiproliferativa verso cellule tumorali, molto maggiore rispetto a quella osservata con l'utilizzo di semplici sali di gallio. Inoltre, durante gli studi clinici di fase I, il complesso ha mostrato una tollerabilità maggiore rispetto a quella aspettata per questi complessi.

Altri esempi di complessi di gallio sono stati ottenuti con leganti asimmetrici del tipo NN'O contenenti piridino-ammino-fenolati del tipo $[Ga^{III}(L^{x-NN'O})_2]ClO_4^{(180)}$ (Figura B12), dove Lx è rappresentato da un legante dotato di carica negativa che contiene 2-metilpiridina e 2-metilfenolato legati ad un'ammina secondaria. La frazione fenolica presenta dei sostituenti (x), in posizione 4 e 6, costituiti da gruppi elettronattrattori come il gruppo metossilico, il gruppo nitro o atomi di cloro, bromo e iodio. La geometria di questi complessi risulta essere di tipo ottaedrica distorta. Studi hanno evidenziato un'inibizione della crescita in cellule di neuroblastoma umano maggiore rispetto al cisplatino; inoltre, l'inibizione risulta essere dipendente dal tipo di sostituito utilizzato. Infatti, complessi che presentano come sostituenti alogeni hanno mostrato, in vitro, una più spiccata attività di inibizione della crescita di cellule di neuroblastoma umano. Soprattutto il complesso caratterizzato dalla presenza di atomi di iodio risulta essere attivo nei confronti di linee cellulari tumorali alla prostata, grazie all'inibizione del proteasoma che porta ad apoptosi cellulare.

L'interessante attività e la relativa non tossicità di questi complessi di gallio suggeriscono che questi composti potrebbero avere un futuro come possibili agenti antitumorali.

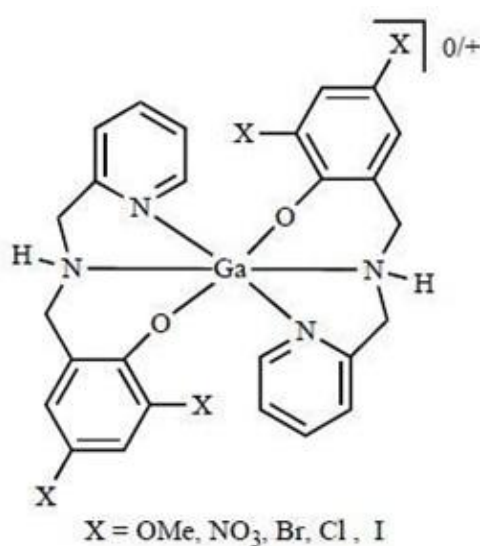


Fig. B12. Struttura generale dei complessi di gallio contenente legante asimmetrico come inibitore del proteosoma

Ulteriori complessi di gallio con leganti tridentati del tipo NN'O costituiti da pirazolil-ammino-fenolato (HL¹-HL³) e da pirazolil-immino-fenolato (HL⁴-HL⁶) (Figura B13), sono stati sintetizzati e sono stati oggetto di studio per la valutazione della citotossicità nei confronti di cellule tumorali umane della prostata PC-3 e cellule tumorali della mammella MCF-7⁽¹⁸¹⁾. È stato osservato che l'attività citotossica è strettamente correlata al tipo di sostituito presente nell'anello fenolico. I complessi che presentano come sostituito all'anello fenolico degli atomi di cloro hanno mostrato i maggiori potenziali citotossici, anche verso le linee cellulari PC-3 resistenti al cisplatino.

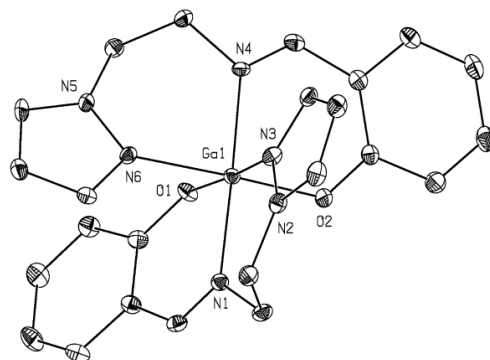


Fig. B13. Esempio di struttura di complesso del tipo $[Ga(HL^n)_2]$

Una particolare categoria di leganti tridentati sono i derivati del kenpaullone (9-bromo-7,12-diidroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-one), molecole in grado di coordinare il gallio attraverso l'atomo di ossigeno del gruppo fenolico, l'atomo di azoto dell'idrazina e l'atomo di azoto dell'azepinico ottenendo dei complessi del tipo $[Ga(L^2)_2]Cl$ (Figura B14)⁽¹⁸²⁾. I composti ottenuti mostrano una spiccata citotossicità in vitro, grazie all'inibizione di un particolare tipo di chinasi.

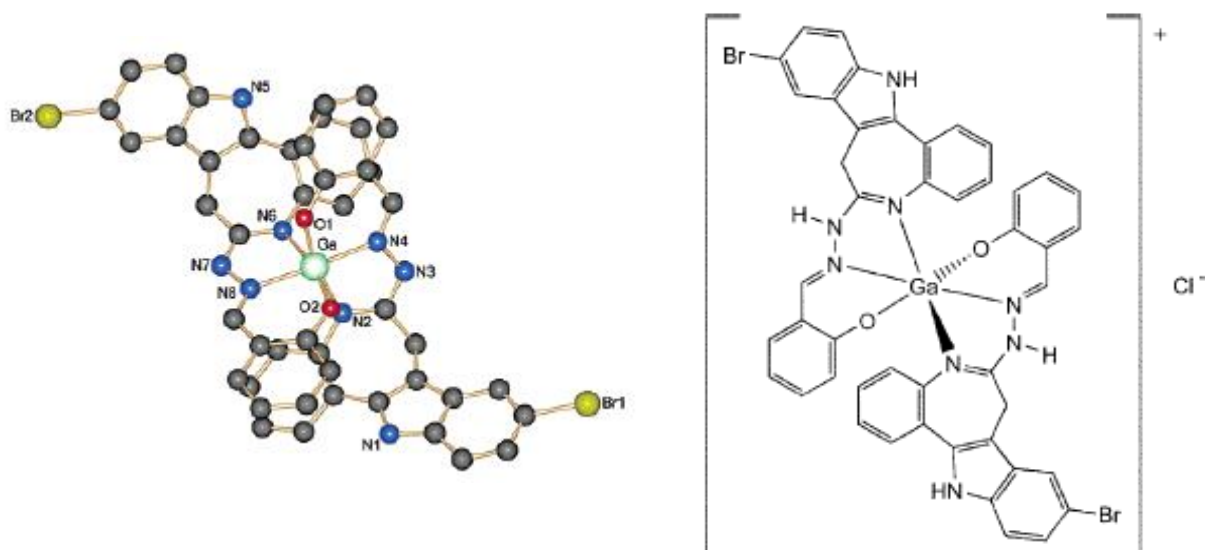


Fig. B14. Struttura del complesso $[Ga(L^2)_2]Cl$ Ga-paullone derivato

Infine, una classe di molecole molto importante nel campo degli antitumorali è rappresentata dai tiosemicarbazoni, che risultano essere dei potenti inibitori della ribonucleotide reduttasi (RR), enzima responsabile della biosintesi del DNA. Considerando che anche il gallio è in grado di inibire l'enzima ribonucleotide reduttasi ed è dotato di proprietà antiproliferative clinicamente dimostrate, ci si è focalizzati sulla combinazione del centro metallico e del legante, allo scopo di ottenere un'elevata inibizione dell'enzima grazie alla potenziale azione sinergica dei due componenti. Sono stati quindi sintetizzati diversi complessi del tipo $[\text{GaL}_2][\text{GaCl}_4]$ in cui il legante è rappresentato da tiosemicarbazoni variamente sostituiti all'atomo di azoto in posizione 4 e in α all'atomo di azoto dell'eterociclo. I prodotti ottenuti hanno dimostrato attività antiproliferativa verso diverse linee cellulari tumorali⁽¹⁸³⁾.

Un esempio è dato dal complesso $[\text{GaL}_2][\text{GaCl}_4]$ in cui il legante L è rappresentato da 2-acetilpiridina 4N-dimetil tiosemicarbazone mostrato in Figura B15. Il prodotto ottenuto ha dimostrato in vitro un'elevata attività citotossica verso diverse linee cellulari tumorali umane, ed è risultato più attivo rispetto al legante da solo, grazie all'attività sinergica con il gallio che ne aumenta l'affinità per il tessuto tumorale.

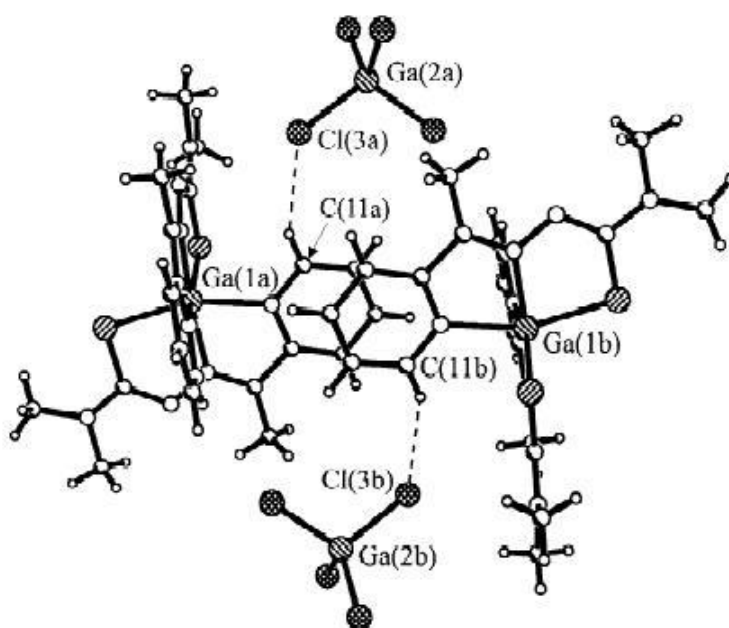


Fig. B15. Struttura del complesso $[\text{GaL}_2][\text{GaCl}_4]$

B2 PARTE SPERIMENTALE

B2.1 Materiali e strumentazioni

Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia) ed utilizzati senza ulteriore purificazione. Dimetilditiocarbammato (DMDC), dietilditiocarbammato (DEDC) e pirrolidinditiocarbammato (PDTC) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Le analisi elementari (C, H, N) sono state eseguite con un analizzatore Carlo Erba 1106.

Le procedure sintetiche per i leganti ditiocarbammici, qualora non specificate, sono quelle elencate nella precedente Sezione (A3 Parte Sperimentale, pag. 87-96). PIPE-2 è stata sintetizzata come riportato in letteratura⁽¹⁸³⁾.

Analisi cromatografiche TLC (Thin Layer Chromatography) sono state condotte, al fine di valutare il grado di purezza dei complessi, su lastre SiO₂ F254S (Merck, Milano, Italy) usando le miscele eluenti indicate caso per caso.

Le analisi spettroscopiche IR sono state effettuate in pastiglie di KBr (1% di campione) con uno spettrofotometro 1700 FT-IR Perkin Elmer, utilizzando il programma Spectrum versione 5.0.1 (Perkin Elmer) per l'elaborazione degli spettri.

Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AMX 400, usando Me₄Si come riferimento interno per ¹H e ¹³C, mentre per l'elaborazione dei dati, è stato utilizzato il software Top Spin. Sono stati utilizzati i solventi deuterati CDCl₃, DMSO-d₆, D₂O e CD₂Cl₂, acquistati presso Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Per le analisi cristallografiche ai raggi X i cristalli sono stati montati su un capillare di vetro e fissati sulla testa goniometrica di un diffrattometro a monocristallo Oxford Diffraction/Agilent Gemini E. Le misure cristallografiche sono state effettuate a temperature di 130, 130, 143, 175 e 173 K per i complessi [Ga(PDTC)₃], [Ga(DTC-L2)₃], [Ga(DPDC)₃], [Ga(NHET)₃] e [Ga(DBODC)₃], rispettivamente. Nelle ultime tre raccolte, la temperatura è stata alzata nel tentativo di limitare la formazione di ghiaccio sul campione. In tutti i casi è stata usata la radiazione K α del Molibdeno ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), monocromatizzata su grafite; i dati per le intensità sono stati corretti per gli effetti di Lorentz e di polarizzazione, ed anche, empiricamente, per l'assorbimento, mediante scansioni multiple e l'algoritmo di scalatura *SCALE3 ABSPACK*. La raccolta, riduzione e finalizzazione dei dati sono stati svolti mediante il programma CrysAlis Pro (nella versione 1.171.36.28). Le strutture sono state tutte risolte mediante i metodi diretti, usando il programma SHELXS integrato nel programma OLEX2.

Per quanto riguarda i test di vitalità cellulare, effettuati in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Cristina Marzano e della Dr.ssa Valentina Gandin, tutti gli studi sono stati condotti considerando come

sostanza di riferimento il cisplatino (Sigma Chemical St. Louis, MO. USA). Il colorante MTT (3-[4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio bromuro) e i terreni di coltura (RPMI-1640, DMEM, Ham's-F12) e gli altri reattivi, dove non specificato, provengono dalla ditta Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Il siero fetale bovino, la tripsina, l' antibiotico (soluzione di penicillina 50 U ml⁻¹, streptomicina 50 µg ml⁻¹) e la glutammina provengono dalla ditta Euroclone (Milano, Italia).

B2.2 Sintesi dei leganti ditiocarbammici. Procedure generali

In un pallone sono sciolti 262.7 mg di NaOH (idrossido di sodio, 2 equivalenti, 6.57 mmoli) in 40 mL di etanolo (EtOH) e alla miscela di reazione viene aggiunta l'ammina corrispondente. Il pallone è posto in bagno di ghiaccio e sono aggiunti goccia a goccia 397 μL di CS_2 (solfo di carbonio, 2 equivalenti, 6.57 mmoli). La reazione è lasciata reagire per circa 3 ore sotto costante agitazione magnetica e si osserva il viraggio della soluzione da trasparente a giallo chiaro. La miscela è portata a secco sotto flusso di N_2 , il residuo ottenuto è ripreso con una minima quantità di etanolo e fatto precipitare con etere dietilico (Et_2O). Il precipitato viene filtrato, lavato con etanolo ed asciugato. Il prodotto viene infine purificato mediante cristallizzazione da una soluzione alcolica satura con vapori di Et_2O .

B2.2.1 Sintesi di N-etil-ditiocarbammato sale sodico (NHET)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
Etilammina	45.08	3.29	148.3	1	0.68	218
CS_2	76.14	6.57	500	2	1.266	397
NaOH	39.99	6.57	262.7	2		

Resa: 64.1%

AE: calc. per $\text{C}_3\text{H}_6\text{NS}_2\text{Na}$ (MW= 143.21): C, 25.16%; H, 4.22%; N, 9.78%; trovato: C, 26.01%; H, 4.81%; N, 9.60%.

^1H NMR (MeOD, δ) : 1.04 (t, 3H, NHCH_2CH_3); 3.37 (m, 2H, NHCH_2CH_3);

^{13}C NMR (MeOD, δ): 14.3 (NHCH_2CH_3); 37.7 (NHCH_2CH_3); 200.1 (NHCS_2)

B2.2.2 Sintesi di adamantil-ditiocarbammato sale sodico (DTC-L8)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
Adamantilammina	151.25	3.29	497.6	1		
CS ₂	76.14	6.57	500	2	1.266	397
NaOH	39.99	6.57	262.7	2		

Resa: 96.6%

AE: calc. per C₁₁H₁₆NS₂Na (MW= 249.37): C, 52.98%; H, 6.47%; N, 5.62%; trovato: C, 53.11%; H, 6.78%; N, 5.50%.

ESI(-)-MS: 226.07 {100%, C₁₁H₁₆NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.76 -1.97- 2.19 (m, 15H, *H*adamantano); 7.27 (s, 1H, S₂CNH);

¹³C NMR (MeOD, δ) : 29.50 - 40.80, 42.0 (Cadamantano); 54.14 (C_{quat.} adamantano); 214.56 (CS₂).

B2.2.3 Sintesi di ciclopentil-ditiocarbammato sale sodico (CyP)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
Ciclopentilammina	85.15	3.29	280.1	1	0.863	324
CS ₂	76.14	6.57	500	2	1.266	397
NaOH	39.99	6.57	262.7	2		

Resa: 72.1%

AE: calc. per C₆H₁₀NS₂Na (MW= 183.27): C, 39.32%; H, 5.50%; N, 7.64%; trovato: C, 40.11%; H, 6.01%; N, 7.51%.

ESI(-)-MS: 160.03 {100%, C₆H₁₀NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.51 (m, 4H, NCHCH₂CH₂CH₂CH₂); 1.64 (m, 2H, NCHCH₂); 1.93 (m, 2H, NCHCH₂); 4.45 (m, 2H, NHCH).

¹³C NMR (MeOD, δ) : 32.9 (NCHCH₂CH₂CH₂CH₂), 35.1 (NCHCH₂), 58.2 (NHCH), 210.5 (CS₂).

B2.2.4 Sintesi di cicloesil-ditiocarbammato sale sodico (CyH)

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
cicloesilammina	99.17	3.29	326.3	1	0.867	376
CS ₂	76.14	6.57	500	2	1.266	397
NaOH	39.99	6.57	262.7	2		

Resa: 73.3%

AE: calc. per C₇H₁₂NS₂Na (MW= 197.30): C, 42.61%; H, 6.13%; N, 7.10%; trovato: C, 42.98%; H, 6.13%; N, 7.10%.

ESI(-)-MS: 174.04 {100%, C₇H₁₂NS₂⁻}.

¹H NMR (MeOD, δ) : 1.14 (m, 2H, NCHCH₂CH₂CH₂cicloesil); 1.26 (m, 4H, NCHCH₂CH₂cicloesil); 1.69 (m, 2H, NCHCH₂cicloesil); 1.87 (m, 2H, NCHCH₂cicloesil); 4.02 (m, 2H, NHCHcicloesil).

¹³C NMR (MeOD, δ) : 22.6 (NCHCH₂CH₂CH₂), 34.7(NCHCH₂CH₂), 35.0 (NCHCH₂) , 60.8 (NHCH), 211.3 (CS₂).

B2.3 Sintesi di complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ con leganti ditiocarbammici ciclici.

Procedura generale

METODO A: a 10 mL di una soluzione acquosa dell'opportuno ditiocarbammato (3 equivalenti, 0.412 mmoli) sono aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva immediatamente la formazione di un precipitato bianco che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

METODO B: un'opportuna quantità di NaOH (idrossido di sodio, 6 equivalenti, 1.65 mmoli) è sciolta in 15 mL di etanolo, con l'aggiunta di qualche mL di acqua per favorirne la dissoluzione. Alla soluzione sono aggiunti 5 mL di una soluzione alcolica dell'ammina corrispondente (6 equivalenti, 1.65 mmoli). Si apprezza quasi immediatamente la formazione di un precipitato e la reazione viene lasciata per qualche minuto sotto costante agitazione magnetica. La soluzione è centrifugata, il surnatante viene prelevato e trasferito in un secondo pallone. Il pallone viene messo in bagno di ghiaccio e si procede con l'aggiunta, goccia a goccia del CS_2 (solfo di carbonio, 12 equivalenti, 3.30 mmoli); la reazione viene lasciata sotto agitazione per almeno 3 ore. In seguito si aggiungono 2 mL di una soluzione alcolica di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (gallio nitrato, 1 equivalente, 0.28 mmoli). Si osserva l'immediata formazione di un precipitato bianco che viene centrifugato, lavato, sospeso con un volume minimo di diclorometano (CH_2Cl_2), trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

B2.3.1 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{PDTC})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
PDTC NH_4^+	164.29	0.412	67.8	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 89%

Solubilità : solubile in CH_2Cl_2 , DMSO, acetone, CH_3CN , toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.86$

AE: calc. per $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{S}_6\text{Ga}$ (MW: 508.46): teorica C, 35.43; H, 4.76; N, 8.26; calcolata C, 34.68; H, 4.15; N, 8.25;

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1008.80 (νCSS), 1489.64 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ) : 2.10 (m, 12H, NCH_2CH_2 pirrolidina); 3.67 (m, 12H, NCH_2CH_2 pirrolidina)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 26.6 (NCH_2CH_2 pirrolidina); 54.7 (NCH_2CH_2 pirrolidina); 197.3 (CS_2)

B2.3.2 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L2})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L2 Na^+	183.27	0.412	75.5	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 75.1%

Solubilità : Solubile in CH_2Cl_2 , DMSO, acetone; parzialmente solubile in CH_3CN e toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.64$

AE: calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{S}_6\text{Ga}$ (MW 550.56): C, 39.27%; H, 5.49%; N, 7.63%; trovato: C, 37.76%; H, 4.89%; N, 7.20%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 987.13 (νCSS), 1491.23 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ) : 1.65 (m, 6H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ piperidina) ; 1.73 (m, 12H , $\text{CS}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$ piperidina); 3.93(m, 12H, CS_2NCH_2 piperidina)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 22.7 ($\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ piperidina); 25.1 ($\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ piperidina); 52.7 (S_2CNCH_2 piperidina); 201.7 (CS_2)

B2.3.3 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L4})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L4 Na^+	212.31	0.412	87.5	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A

Resa: 81,1%

Solubilità: solubile in HCl 1 M; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.00$

AE: calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{S}_6\text{Ga}$ (MW: 637,69): teorica C, 39.55; H, 6.16; N, 13.18; trovato C, 35.85; H, 5.94; N, 11.51;

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 990.47 (νCSS), 1443.92 (νCN).

^1H NMR (D_2O , δ) : 0.92 (t, $J = 7.30$ Hz, 9H , NCH_2CH_3) ; 2.30 (q, $J = 7.30$ Hz, 6H , NCH_2CH_3) ; 2.39 (m, 12H, $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{piperazina}$); 4.18 (m, 12H $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{piperazina}$)

^{13}C NMR (D_2O , δ) : 13.3 (NCH_2CH_3), 49.4 (NCH_2CH_3), 50.1 ($\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{piperazina}$), 56.4 ($\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{piperazina}$), 200.7 (CS_2)

B2.3.4 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L9})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L9 Na^+	309.18	0.412	127.4	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A

Resa: 74.6%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , acetone, toluene; parzialmente solubile in EtOH e MeOH, DMSO, CH_3CN ; insolubile in acqua e altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.17$

AE: calc. per $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_6\text{Cl}_3\text{Ga}$ (MW: 930.16): teorica C, 46.49; H, 4.23; N, 4.52; calcolata C, 44.55; H, 3.94; N, 4.66;

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 999.83 (νCSS), 1419.90 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.89 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.22 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.69 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.78 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 7.41 (m, 12H, *H*arom)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 38.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 48.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 69.8 (C_{quat} -piperidina); 126.0-128.8 (*C*arom); 133.5 (C_{quat} -arom); 145.3 (C_{quat} -Cl); 201 (CS_2)

B2.3.5 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L10)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃	363.74	0.137	50	1
DTC-L10 Na ⁺	212.57	0.412	87.6	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 63.3%

Solubilità: parzialmente solubile in EtOH, MeOH e in DMSO; insolubile in acqua, e negli altri solventi organici

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.17

AE: calc. per C₁₈H₂₄N₃O₆S₆Ga (MW= 640.51): C, 33.75%; H, 3.78%; N, 6.56%; trovato: C, 34.55%; H, 4.24 %; N, 6.09%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 973.18 (ν CSS), 1450.06 (ν CN).

¹H NMR (DMSO d₆, δ): 1.24 (m, 6H, S₂CNCH₂CH₂pirrolidina); 1.70 (m, 6H, S₂CNCHCH₂pirrolidina); 2.04 (m, 6H, S₂CNCHCH₂pirrolidina); 2.71(m, 3H, S₂CNCH₂pirrolidina); 3.71 (m, 3H, S₂CNCHCOO⁻);

¹³C NMR (DMSO d₆, δ): 23.5 (S₂CNCH₂CH₂pirrolidina); 29.0 (S₂CNCHCH₂pirrolidina); 55.3 (S₂CNCH₂pirrolidina); 71.9 (S₂CNCHCOO⁻); 177.6 (S₂CNCHCOO⁻); 203.8 (C_{quat}).

5.3.6 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L15)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	3.30	244.7	12	1.260	199
4-piperidone monoidrato·HCl	153.61	1.65	253.4	6		
NaOH	39.99	1.65	66.0	6		
Ga(NO ₃) ₃	363.74	0.27	100	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo B

Resa: 56.1 %

Solubilità: solubile in DMSO; parzialmente solubile in CH₂Cl₂; insolubile in acqua, MeOH, EtOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO₂ CH₂Cl₂) : R_f = 0.14

AE: calc. per $C_{18}H_{24}N_3O_3S_6Ga$ (MW= 590.94): C, 36.49%; H, 4.08%; N, 7.09%; trovato: C, 37.01%; H, 4.55%; N, 6.90%.

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 982.35 (ν_{CSS}), 1447.27 (ν_{CN}).

1H NMR ($CDCl_3$, δ): 2.63 (m, 12H, $S_2CNCH_2CH_2$ piperidone); 4.15 (m, 12H, $S_2CNCH_2CH_2$ piperidone);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ): 38.5 ($SCNCH_2CH_2$ piperidone); 49.6 ($S_2CNCH_2CH_2$ piperidone); 200.3

(piperidone $CH_2CH_2NCS_2$); 206.2 ($S_2CNCH_2CH_2C(O)$).

5.3.7 Sintesi e caratterizzazione di $[Ga(DTC-L16)_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$Ga(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	363.74	0.137	50	1
DTC-L16 Na^+	390.56	0.412	160.9	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A

Resa: 84.3%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , DMSO, acetone; parzialmente in CH_3CN , toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.34$

AE: calc. per $C_{27}H_{42}N_3O_6S_6Ga$ (MW: 766,75): teorica C, 42.29; H, 5.52; N, 5.48; trovato C, 41.40; H, 5.14; N, 5.73;

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1039.28 (ν_{CSS}), 1491.85 (ν_{CN}).

1H NMR ($CDCl_3$, δ): 1.28 (t, $J = 7.25$ Hz, 9H, CH_3CH_2O); 1.93 (m, 6H, $CS_2NCH_2CH_2$); 2.05 (m, 6H, $CS_2NCH_2CH_2$); 2.57 (m, 3H $S_2CNCH_2CH_2CH$ piperidina); 3.45 (m, 6H, $CS_2NCH_2CH_2$); 4.18 (q, $J = 7.25$ Hz, 6H, CH_3CH_2O); 4.54 (m, 6H, $CS_2NCH_2CH_2$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ): 14.2 (CH_3CH_2O); 27.86 ($CS_2NCH_2CH_2$); 39.20 ($S_2CNCH_2CH_2CH$ piperidina); 50.9

($S_2CNCH_2CH_2CH$); 60.8 (CH_3CH_2O); 173.6 ($CH_3CH_2OC=OCH$); 201.7 (CS_2).

5.3.8 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L17)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
DTC-L17 Na ⁺	241.31	0.412	99.4	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 76.7%

Solubilità: solubile in cloroformio; parzialmente solubile in CH₂Cl₂; insolubile in acqua, EtOH, MeOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.16

AE: calc. per C₂₄H₃₆N₃O₆S₆Ga (MW 778.85): C, 39.78%; H, 5.01%; N, 5.80%; trovato: C, 38.15%; H, 4.64%; N, 5.72%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 1033.62 (ν CSS), 1492.35 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.87 (m, 12H, NCH₂CH₂piperidina); 4.00 (s, 12H, OCH₂CH₂O); 4.09 (m, 12H, NCH₂CH₂piperidina).

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 34.2 (NCH₂CH₂piperidina); 50.1 (NCH₂CH₂piperidina); 64.5 (OCH₂CH₂O); 201.6 (CS₂)

5.3.9 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L20)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
DTC-L20 Na ⁺	268.37	0.412	110.6	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 68.8%

Solubilità: parzialmente solubile in DMSO; insolubile in acqua, EtOH, MeOH e solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.49

AE: calc. per C₃₀H₅₁N₆O₃S₆Ga (MW: 805.88): teorica C, 44.71; H, 6.38; N, 10.43; calcolata C, 41.58; H, 6.44; N, 9.60;

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 1002.11 (ν CSS), 1464.34 (ν CN).

¹H NMR (DMSO d₆, δ): 1.57 (m, 6H, CS₂NCH₂CH₂); 1.90 (m, 6H, CS₂NCH₂CH₂); 2.44 (m, 12H, OCH₂CH₂Npiperidina); 2.86 (m, 12H, CS₂NCH₂CH₂); 3.85 (m, 4H, OCH₂CH₂Npiperidina).

^{13}C NMR (DMSO d_6 , δ): 28.5 ($\text{CS}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$); 42.9 ($\text{CS}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$); 49.7 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 66.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 204.4 (CS_2).

5.3.10 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L22})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L22 Na^+	197.30	0.412	81.3	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 66.2%

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 , DMSO e toluene; parzialmente solubile in acetone; insolubile in acqua, MeOH, EtOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.71$

AE: calc. per $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{S}_6\text{Ga}$ (MW 592.64): C, 42.56%; H, 6.12%; N, 7.09%; trovato: C, 41.43%; H, 5.88%; N, 6.93%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 987.66 (νCSS), 1498.60 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.62 (m, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azepano}$); 1.86 (m, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azepano}$); 3.93 (m, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azepano}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 27.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azepano}$); 55.4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azepano}$); 201.7 (CS_2).

5.3.11 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L23})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L23 Na^+	227.43	0.412	93.7	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A

Resa: 73.4%

Solubilità: solubile in CHCl_3 ; parzialmente solubile in CH_2Cl_2 ; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.77$

AE: calc. per $C_{24}H_{42}N_3S_6Ga$ (MW 634.72): C, 45.52%; H, 6.67%; N, 6.62%; trovato: C, 43.83%; H, 5.86%; N, 5.96%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1023.13 (νCSS), 1490.72 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.56-1.62 (m, 18H, $S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azocano}$); 1.92 (m, 12H, $S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azocano}$); 3.88(t, 12H, $S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azocano}$);

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 25.6 ($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azocano}$); 56.2 ($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{azocano}$);

202.1($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}_2$)

5.3.12 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{DTC-L25})_3]$

Reagente	MW	mmol	Peso (mg)	Equivalenti
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
DTC-L25 Na^+	273.39	0.412	112.6	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 64.4%

Solubilità: solubile in DMSO e CH_2Cl_2 ; parzialmente solubile in acetone, MeCN e toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.70$

AE: calc. per $C_{39}H_{48}N_3S_6Ga$ (MW: 819.14): teorica C, 57.06; H, 5.89; N, 5.12; calcolata C, 53.48; H, 5.47; N, 4.83;

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 964.52 (νCSS), 1492.01 (νCN).

^1H NMR ($\text{DMSO } d_6$, δ): 1.25 (m, 6H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 1.70 (m, 6H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 1.82 (m, 3H, $\text{PhCH}_2\text{CHpiperidina}$); 2.57 (m, 6H, $\text{PhCH}_2\text{piperidina}$); 2.79 (m, 3H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 3.24 (m, 6H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 4.47 (m, 3H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Npiperidina}$); 7.19-7.29 (m, 15H, **H**arom).

^{13}C NMR ($\text{DMSO } d_6$, δ): 28.7-31.7 ($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{Ph}$); 35.5 ($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{Ph}$); 41.7

($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{Ph}$); 43.7-52.1 ($S_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{Ph}$); 126.4(**C**arom **m**); 128.7 (**C**arom **o**); 129.5 (**C**arom **p**); 140.3 (**C**quat arom); 198.4 ($S_2\text{CN}$);

5.3.13 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PIPE-1)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
PIPE-1 Na ⁺	290.37	0.412	119.6	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A

Resa: 88.2%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, DMSO, toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0,68

AE: calc. per C₃₆H₄₅N₆O₃S₆Ga (MW: 871.88): teorica C, 49.59; H, 5.20; N, 9.64; calcolata C, 48.00; H, 5.01; N, 9.58;

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 1014.77 (ν CSS), 1499.46 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ) : 3.20 (m, 12H , S₂CNCH₂CH₂Npiperazina) ; 3.91 (s, 9H, OCH₃) ; 4,19 (m, 12H, S₂CNCH₂CH₂Npiperazina); 6.91-6.98 (m, 9H, **Harom**); 7.08 (m, 1H, **HaromO**).

¹³C NMR (CDCl₃, δ) : 49.9 (S₂CNCH₂CH₂Npiperazina); 51.7 (S₂CNCH₂CH₂Npiperazina); 55.5 (OCH₃); 111.4-118.6-121.1-123.3 (**Carom**); 140.0 (**Cquat-N**); 152.3 (**Cquat-OCH₃**); 201.7(**CS₂**).

B2.4 Sintesi di complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ con leganti ditiocarbammici lineari. Procedura generale

METODO A: a 10 mL di una soluzione acquosa dell'opportuno ditiocarbammato (3 equivalenti, 0.412 mmoli) sono aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva immediatamente la formazione di un precipitato bianco che viene successivamente centrifugato e lavato con acqua. Il surnatante viene eliminato e il precipitato viene sospeso con etere dietilico, trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

METODO B: Un'opportuna quantità di NaOH (idrossido di sodio, 6 equivalenti, 1.65 mmoli) è sciolta in 15 mL di etanolo, con l'aggiunta di qualche mL di acqua per favorirne la dissoluzione. Alla soluzione sono aggiunti 5 mL di una soluzione alcolica dell'ammina corrispondente (6 equivalenti, 1.65 mmoli). Si apprezza quasi immediatamente la formazione di un precipitato e la reazione viene lasciata per qualche minuto sotto costante agitazione magnetica. La soluzione è centrifugata, il surnatante viene prelevato e trasferito in un secondo pallone. Il pallone viene messo in bagno di ghiaccio e si procede con l'aggiunta, goccia a goccia del CS_2 (solfo di carbonio, 12 equivalenti, 3.30 mmoli), la reazione viene lasciata sotto agitazione per almeno 3 ore. In seguito si aggiungono 2 mL di una soluzione alcolica di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (gallio nitrato, 1 equivalente, 0.28 mmoli). Si osserva l'immediata formazione di un precipitato bianco che viene centrifugato, lavato, sospeso con un volume minimo di diclorometano (CH_2Cl_2), trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

METODO C: a 10 mL di una soluzione acquosa dell'ammina corrispondente (6 equivalenti, 0.822 mmoli) posta in bagno di ghiaccio, è aggiunta una soluzione di CS_2 (12 equivalenti, 1.64 mmol) in 2 mL di EtOH. La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica e, dopo 3 ore, viene aggiunta una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli). Si osserva l'immediata formazione di un precipitato bianco che viene centrifugato e lavato con acqua. Il surnatante viene eliminato e il precipitato viene sospeso con CH_2Cl_2 o MeOH, trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

B2.4.1 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DEDG)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
DEDG NH ₄ ⁺	166.31	0.412	68.5	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa : 85.5%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, DMSO, acetone, CH₃CN, toluene; insolubile in acqua, EtOH, MeOH

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.57

AE: calc. per C₁₅H₃₀N₃S₆Ga (MW: 514.53): teorica C, 35.02; H, 5.88; N, 8.17; trovato C, 34.28; H, 5.24; N, 8.04;

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 992.60 (ν CSS), 1498.27 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.22 (t, J = 7.01 Hz, 9H, NCH₂CH₃); 3.80 (q, J = 7.01 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 12.3 (NCH₂CH₃); 49.2 (NCH₂CH₃); 201.2 (CS₂).

B2.4.2 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DMDC)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃	363.74	0.137	50	1
DMDC	175.64	0.412	72.4	3

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A.

Resa: 70.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂; insolubile in acqua, MeOH, EtOH e negli altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.63

AE: calc. per C₉H₁₈N₃S₆Ga (MW 430.37): C, 25.12%; H, 4.22%; N, 9.76%; trovato: C, 23.75%; H, 3.85%; N, 9.19%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 974.60 - 987.20 (ν CSS), 1522.11 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ): 3.42 (s, 18H, CH₃N).

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 45.3 (CH₃N); 203.2 (CS₂).

B2.4.3 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DPDC)₃]

METODO A:

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃	363.74	0.137	50	1
DPDC	199.31	0.412	82.19	3

METODO C:

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.26	97
Ammina	101.19	0.822	83.2	6	0.902	92.2
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo A e Metodo C.

Resa: 73.0% (METODO A); 77.3% (METODO C)

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂ e toluene; parzialmente solubile in acetone; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.57

AE: calc. per C₂₁H₄₂N₃S₆Ga (MW= 598.69): C, 42.13%; H, 7.07%; N, 7.02%; trovato: C, 42.40%; H, 7.35%; N, 6.88%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 973.43 (ν CSS), 1492.20 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ) : 0.94 (t, J = 7.42 Hz, 18H, NCH₂CH₂CH₃); 1.80 (m, 12H, NCH₂CH₂CH₃); 3.67 (m, 12H, NCH₂CH₂CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 11.2 (NCH₂CH₂CH₃); 20.4 (NCH₂CH₂CH₃); 56.9 (NCH₂CH₂CH₃); 202.0 (CS₂)

B2.4.4 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DPODC)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.26	97
Ammina	133.19	0.822	109.5	6	0.902	121
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il metodo C.

Resa: 77.3%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂ e toluene; parzialmente solubile in acetone; insolubile in acqua, EtOH, MeOH ed altri solventi organici

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.13

AE: calc. per C₂₁H₄₂N₃O₆S₆Ga (MW= 694.69): C, 36.31%; H, 6.09%; N, 6.05%; trovato: C, 36.99%; H, 6.78%; N, 6.30%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 996.78 (ν CSS), 1492.12 (ν CN). ¹H NMR (CDCl₃, δ): 3.37 (s, 18H, NCH₂CH₂OCH₃); 3.73 (t, J = 5.45 Hz, 12H, NCH₂CH₂OCH₃); 4.06 (t, J = 5.45 Hz, 12H, NCH₂CH₂OCH₃)

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 56.2 (NCH₂CH₂OCH₃); 58.9 (NCH₂CH₂OCH₃); 69.8 (NCH₂CH₂OCH₃); 203.4 (CS₂)

B2.4.5 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DBODC)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.26	97
N,N- etossietilammina	161.24	0.822	132.5	6	0.885	150
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo C

Resa: 62.5%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, acetone e DMSO; parzialmente solubile in CH₃CN, Et₂O, toluene; insolubile in acqua, MeOH e EtOH.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.26

AE: calc. per C₂₇H₅₄N₃O₆S₆Ga (MW 778.85): C, 41.64%; H, 6.99%; N, 5.40%; trovato: C, 41.20%; H, 6.85%; N, 5.25%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 999.71 (νCSS), 1492.95 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.21 (t, $J=6.97$ Hz, 18H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 3.52 (q, $J=6.97$ Hz, 12H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 3.77 (t, $J=5.50$, 12H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2$); 4.05 (t, $J=5.50$, 12H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 14.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 56.2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 66.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 67.3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 203.1 (CS_2).

B2.4.6 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{PrEt})_3]$

Reagente	MW	mmol	Peso (mg)	Equivalenti	densità	Volume (μL)
CS_2	74.14	1.644	121.9	12	1.260	97
N-etil-N-propilammina	87.16	0.822	71.6	6	0.727	99
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo C.

Resa: 78.9 %

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 ; insolubile in acqua, MeOH, EtOH ed altri solventi organici

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.29$

AE: calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{S}_6\text{Ga}$ (MW 556.61): C, 38.64%; H 6.52%; N, 7.55%; trovato: C, 38.64%; H, 6.39%; N, 7.42.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 994.82 (νCSS), 1492.84 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 0.94 (t, $J=7.36$ Hz, 9H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 1.32 (t, $J=7.33$ Hz, 9H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 1.80 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.66 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.80 (q, $J=7.33$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 10.7 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 12.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 20.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 49.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 56.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 201.7 (CS_2).

B2.4.7 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(POEt)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.260	97
N-etil-N-propilammina	117.19	0.822	96.3	6	0.820	117
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo C.

Resa: 67.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂; insolubile in acqua, MeOH, EtOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.73

AE: calc. per C₁₈H₃₆N₃O₃S₆Ga (MW 604.61): C, 35.75%; H, 6.00%; N, 6.95%; trovato: C, 35.39%; H, 5.72%; N, 6.76%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 992.34 (ν CSS), 1498.69 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.31 (t, J= 7.10 Hz, 9H, (CH₃CH₂N)); 3.38 (s, 9H, CH₃O); 3.73 (t, J= 5.46 Hz, 6H, CH₃O CH₂CH₂N); 3.93 (m, 12H, CH₃O CH₂CH₂N e CH₃CH₂N).

¹³C NMR (CDCl₃, δ): 11.75 (CH₃CH₂N); 51.87 (CH₃CH₂N); 54.24 (CH₃OCH₂CH₂N); 58.96 (CH₃O CH₂CH₂N); 69.86 (CH₃O); 202.39 (CS₂).

5.4.8 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(ISOMe)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso(mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.260	97
N-(2-metossietil)-N-2-propanammina	117.19	0.822	96.3	6	0.818	118
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo C

Resa: 62.9%

Solubilità: solubile in CH₂Cl₂, DMSO, acetone, toluene; parzialmente solubile in MeOH, CH₃CN, Et₂O; insolubile in acqua e n-HEX

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.27

AE: calc. per C₂₄H₄₈N₃S₆Ga (MW= 640.77): C, 44.99%; H, 7.55%; N, 6.56%; trovato: C, 45.28%; H, 8.08%; N, 6.20%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 997.91 (νCSS), 1459.15 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.28 (d, $J = 6.68$ Hz, 18H, $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$); 3.38 (s, 9H, CH_3O); 3.72 (t, $J = 6.46$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.86 (t, $J = 6.46$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.97 (m, $J = 6.68$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 20.23 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$); 47.62 ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 56.67 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$); 58.86 (CH_3O); 69.40 ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 203.09 (CS_2).

B2.4.9 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{PR-13})_3]$

Reagente	MW	mmol	Peso (mg)	Equivalenti	densità	Volume (μL)
CS_2	74.14	3.30	244.7	12	1.26	221
Sarcosina-etil-estere·HCl	153.61	1.65	253.5	6		
NaOH	39.99	1.65	66.0	6		
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.27	100	1		

Il complesso è stato ottenuto utilizzando il Metodo B

Resa: 56.2 %

Solubilità: solubile in CH_2Cl_2 e DMSO, parzialmente solubile in acetone; insolubile in acqua, MeOH, EtOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.39$

AE: calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_6\text{Ga}$ (MW= 630.60): C, 36.19%; H, 5.43%; N, 6.66%; trovato: C, 36.50%; H, 5.91%; N, 6.02%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 968.10 (νCSS), 1500.05 (νCN).

^1H NMR (DCI_3 , δ): 1.33 (t, $J = 7.05$ Hz, 9H, OCH_2CH_3); 3.46 (s, 9H, NCH_3); 4.27 (q, $J = 7.05$ Hz, 6H, OCH_2CH_3); 4.55 (s, 6H, $\text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 13.8 (OCH_2CH_3); 44.1 (NCH_3); 58.1 ($\text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 61.6 (OCH_2CH_3); 206.4 (CS_2)

B2.5 Sintesi di complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ con leganti ditiocarbammici derivati da ammina primaria. Procedura generale

A 10 mL di una soluzione acquosa dell'opportuno ditiocarbammato (3 equivalenti, 0.412 mmoli) sono aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva immediatamente la formazione di un precipitato bianco che viene successivamente centrifugato e lavato con acqua. Il surnatante viene eliminato e il precipitato viene sospeso con etere dietilico, trasferito su vetrino ed asciugato sotto vuoto.

B2.5.1 Sintesi e caratterizzazione di $[\text{Ga}(\text{NHEt})_3]$

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363.74	0.137	50	1
NHEt	175.64	0.412	72.4	3

Resa: 73.4%

Solubilità: solubile in MeOH, CH_3CN , CH_2Cl_2 ; parzialmente solubile in EtOH, acetone; insolubile in acqua, DMSO.

TLC: (SiO_2 , CH_2Cl_2): $R_f = 0.24$

AE: calc. per $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}_6\text{Ga}$ (MW 430.37): C, 25.12%; H, 4.22%; N, 9.76%; trovato: C, 23.29%; H, 3.99%; N, 9.07%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 981.68 (νCSS), 1518.00 (νCN).

^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.30 (t, $J = 7.27$ Hz, 9H, NHCH_2CH_3); 3.50 (m, 6H, NHCH_2CH_3); 7.34 (broad, 3H, NHCH_2CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): 13.3 (NHCH_2CH_3); 45.0 (NHCH_2CH_3); 204.9 (NHCS_2)

B2.5.2 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(CyP)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
CyP Na ⁺	183.26	0.412	75.5	3

Resa: 68.6%

Solubilità: solubile in DMSO; insolubile in acqua, MeOH, EtOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.54

AE: calc. per C₁₈H₃₀N₃S₆Ga (MW 550.56): C, 39.27%; H, 5.49%; N, 7.63%; trovato: C, 39.88%; H, 5.62%; N, 7.12%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 986.14 (ν_{CSS}), 1501.05 (ν_{CN}).

¹H NMR (DMSO d₆, δ) : 1.53 (m, 12H, NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 1.67 (s, 6H, NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 1.91 (s, 6H, NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 3.98 (m, 3H, NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 10.38 (s, 3H, S₂CNHciclopentile)

¹³C NMR (DMSO d₆, δ): 23.7 (NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 24.2 (NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 38.7 (NHCHCH₂CH₂ciclopentile); 206.6 (CS₂)

B2.5.3 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(CyH)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
CyH Na ⁺	197.29	0.412	81.3	3

Resa: 90.3%

Solubilità: solubile in DMSO; insolubile in acqua, MeOH, EtOH e altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂): R_f = 0.56

AE: calc. per C₂₁H₃₆N₃S₆Ga (MW 592.64): C, 42.56%; H, 6.12%; N, 7.09%; trovato: C, 43.12%; H, 6.75%; N, 7.36%.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 985.89 (ν_{CSS}), 1501.95 (ν_{CN}).

¹H NMR (DMSO d₆, δ) : 1.24 (m, 12H, NHCHCH₂CH₂cicloesile); 1.71 (s, 12H, NHCHCH₂CH₂cicloesile); 1.86 (s, 6H, NHCHCH₂CH₂cicloesile); 3.46 (m, 3H, NHCHCH₂CH₂cicloesile); 10.29 (s, 3H, S₂CNHcicloesile)

¹³C NMR (DMSO d₆, δ): 24.7 (NHCHCH₂CH₂CH₂cicloesile); 30.7 (NHCHCH₂CH₂cicloesile); 32.8 (NHCHCH₂CH₂cicloesile); 55.6 (NHCHCH₂CH₂cicloesile); 200.8 (CS₂)

B2.5.4 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(DTC-L8)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>	<i>densità</i>	<i>Volume (μL)</i>
CS ₂	74.14	1.644	121.9	12	1.26	97
adamantinammina	151.25	0.822	124.3	6		
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1		

Resa: 70.9%

Solubilità: insolubile in acqua, MeOH, EtOH e altri solventi organici;

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂) : R_f = 0.46

AE: calc. per C₃₃H₄₈N₃S₆Ga (MW 748.87): C, 52.93%; H, 6.46%; N, 5.61%; trovato: C, 53.55%; H, 6.90%; N, 5.10%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 965.76 (νCSS), 1508.62 (νCN).

¹H NMR (DMSO d₆, δ) : 1.63 -1.97- 2.07 (m, 45H, **H**adamantano); 9.33 (s, 3H, S₂CNH);

¹³C NMR (DMSO d₆, δ) : 31.6, 39.5, 46.2 (C_{adamantano}); 62.0 (C_{quat.} adamantano); 198.8 (CS₂).

B2.5.5 Sintesi e caratterizzazione di [Ga(PIPE-2)₃]

<i>Reagente</i>	<i>MW</i>	<i>mmol</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Equivalenti</i>
Ga(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	363.74	0.137	50	1
PIPE2	333.44	0.412	137.4	3

Resa: 62.9%

Solubilità: parzialmente solubile in DMSO; insolubile in acqua, MeOH, EtOH ed altri solventi organici.

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂) : R_f = 0.56

AE: calc. per C₄₂H₆₂N₉O₃S₆Ga (MW 1003.11): C, 50.34%; H, 6.14%; N, 12.58%; trovato: C, 47.98%; H, 5.78%; N, 11.94%.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 958.04 (νCSS), 1498.82 (νCN).

¹H NMR (DMSO d₆, δ) : 2.57 (m, 6H, NHCH₂CH₂), 2.99 (m, 12H, NCH₂CH₂piperazina), 3.12 (m, 12H, NCH₂CH₂piperazina), 3.70 (m, 6H, NHCH₂CH₂), 3.77 (s, 9H, OCH₃), 6.92 (m, 12H, **H**arom), 9.79 (s, 3H, NHCS₂).

¹³C NMR (DMSO d₆, δ) : 36.3 (NHCH₂CH₂), 50.3 (NCH₂CH₂piperazina), 53.2 (NCH₂CH₂piperazina) 54.9 (NHCH₂CH₂), 55.9 (OCH₃), 112.5, 118.3, 121.3, 122.9, 141.8, 153.5 (C_{arom}), 195.5 (CS₂).

B2.6 Test di vitalità cellulare

B2.6.1 Linee cellulari e condizioni di crescita

La linea cellulare 2008 rappresenta una linea cellulare di carcinoma ovarico umano proveniente da un paziente con adenocarcinoma ovarico, non trattato. Queste cellule hanno un tempo di duplicazione di circa 24 ore. Vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici (penicillina/streptomicina) e del 10% di siero fetale bovino, mantenuto per mezz'ora a 57 °C, allo scopo di denaturare le proteine del complemento.

La linea cellulare LoVo (American Type Culture Collection (ATCC), Canada) corrisponde ad una linea cellulare umana di adenocarcinoma colon-rettale, avente tempo di duplicazione di 24 ore. Queste cellule vengono mantenute in coltura con terreno Ham's-F12 addizionato di antibiotici (penicillina/streptomicina) e del 10% di siero fetale bovino mantenuto per mezz'ora a 57 °C, allo scopo di denaturare le proteine del complemento.

5.6.2 MTT Test

Il test dell'MTT è ampiamente utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare nei protocolli di *drug screening*⁽⁵⁴⁾. Questo test si basa sulla capacità delle cellule di ridurre un sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), ad opera di un enzima respiratorio mitocondriale, la succinato tetrazolio reduttasi⁽¹⁸⁵⁾. Tale riduzione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, nelle quali risulta compromessa la funzione mitocondriale, determinante per la trasformazione dell'indicatore. La riduzione dell'MTT comporta, oltre che una modifica strutturale, anche un cambiamento di colore dell'indicatore, da giallo a blu-viola. Le cellule ($3 \cdot 10^3$ per pozzetto nel caso di 2008; $8 \cdot 10^3$ nel caso delle cellule LoVo) vengono seminate in micropiastre da 96 pozzetti in 90 µl di terreno ed incubate a 37 °C in atmosfera controllata. Dopo 24 ore, le cellule sono trattate in triplo con concentrazioni crescenti del complesso da testare e nuovamente incubate (il test è stato eseguito anche dopo 72 ore). Trascorso il tempo di contatto previsto, a ciascun pozzetto vengono aggiunti 10 µL di una soluzione salina 5 mg/ml di MTT in PBS. Dopo 5 ore di incubazione, ogni pozzetto è trattato con 100 µL di una soluzione al 10% di SDS in HCl 0.01 M. Si lascia quindi incubare *overnight*. Il giorno seguente, la piastra viene letta mediante lettore BioRad 680 a 570 nm.

B2.7 Effetto del pH sulla formazione di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃]

Allo scopo di trasferire la chimica a livello di tracciante con ⁶⁸Ga, è stata valutata la resa di reazione dei complessi di gallio in funzione del pH. Infatti il radioisotopo ⁶⁸Ga viene eluito da un generatore portatile attraverso l'impiego di una soluzione acida (HCl 1 M) che viene poi direttamente utilizzata nei protocolli di marcatura.

La sintesi dei complessi con leganti ditiocarbammici è stata eseguita utilizzando Ga(NO₃)₃·6H₂O come materiale di partenza e diversi tipi di sistemi tamponi per poter mantenere i vari valori di pH desiderati. In tutti i casi è stato utilizzato come riferimento la formazione del complesso [Ga(DED₃)₃].

SINTESI A pH 3.5:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di acido tartarico 1 M portato a pH desiderato con l'aggiunta di NaOH 6 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di Ga(NO₃)₃·6H₂O (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica.

Non si osserva la formazione di alcun precipitato.

Resa: 0%

SINTESI A pH 5:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di acido acetico 1 M portato a pH desiderato con l'aggiunta di NaOH 6 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di Ga(NO₃)₃·6H₂O (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 54.4%

REAZIONE A pH 6 (autogeno):

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di acqua. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di Ga(NO₃)₃·6H₂O (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 84.2 %

SINTESI A pH 6.8:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di MES 1 M, portato a pH desiderato con l'aggiunta di HCl 6 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 84.6%

SINTESI A pH 9:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di MES 1 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 39.5%

SINTESI A pH 10:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di monoidrogeno fosfato di sodio 0.5 M portato a pH desiderato con l'aggiunta di NaOH 6 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 0%

SINTESI A pH 13:

Il legante DEDC (3 equivalenti, 0.852 mmoli) è stato sciolto in 5 mL di soluzione acquosa di fosfato di sodio 0.5 M portato a pH desiderato con l'aggiunta di NaOH 6 M. Alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa di $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equivalente, 0.137 mmoli), sotto costante agitazione magnetica. Si osserva la formazione di un precipitato bianco, che viene successivamente filtrato, lavato con acqua ed asciugato sotto vuoto.

Resa: 0%

B3 Risultati e Discussione

B3.1 Sintesi e caratterizzazione dei complessi della serie [Ga(DTC-Ln)₃]

La sintesi dei complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] con leganti ditiocarbammici ciclici e derivati da ammine primarie (Figura B16) sono stati ottenuti aggiungendo il sale di gallio Ga(NO₃)₃ ad una soluzione acquosa del ditiocarbammato scelto ed utilizzato in rapporto metallo-legante 1:3. La reazione avviene istantaneamente a temperatura ambiente con la semplice formazione del legame di coordinazione tra i 2 atomi di zolfo dei leganti bidentati e lo ione metallico, con la formazione di un complesso a numero di coordinazione 6 in cui la sfera di coordinazione è completata dai 6 atomi di zolfo.

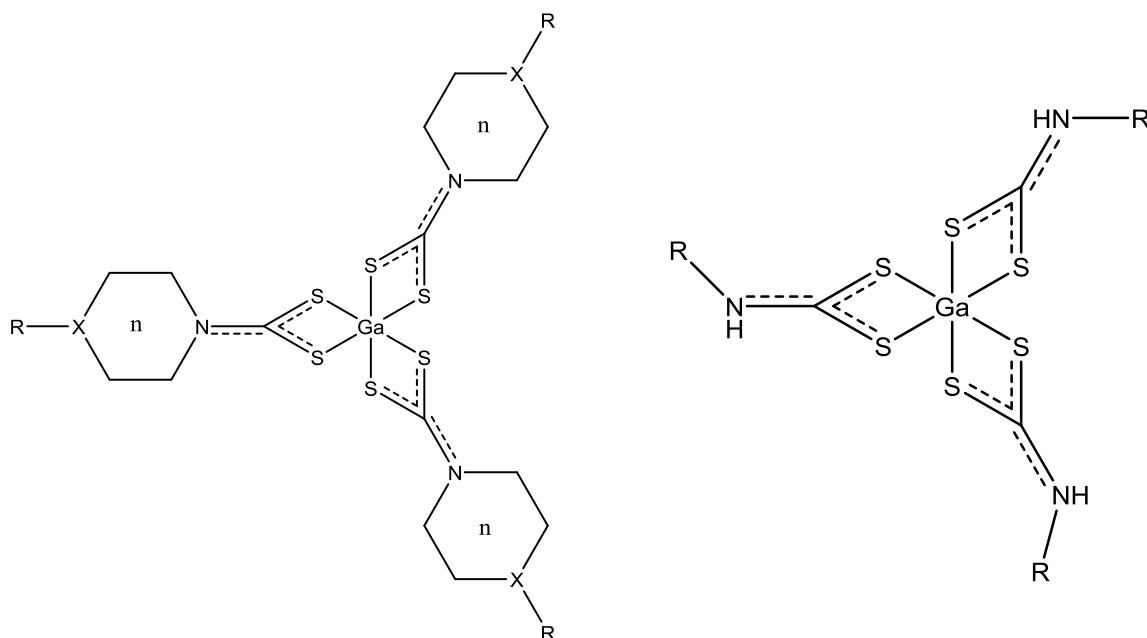


Fig. B16. Struttura generale dei complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] con leganti ditiocarbammici ciclici e derivati da ammina primaria.

Per quanto riguarda invece la sintesi dei complessi con ditiocarbammati lineari, poichè la purificazione dei leganti è risultata difficoltosa, si è deciso di sintetizzare direttamente i complessi senza passare per l'isolamento del ditiocarbammato.

In questo particolare caso, nell'ottenimento dei ditiocarbammati non si è lavorato in condizioni basiche per evitare la formazione del complesso tetraidrossigallato [Ga(OH)₄]⁻ in seguito all'aggiunta di gallio nell'ambiente di reazione. Ciò ha determinato la necessità di utilizzare maggiori quantità di CS₂ e ammina, pari al doppio di quelle utilizzate solitamente per la completa reazione del gallio in quanto, analogamente a quanto descritto nella sintesi di DTC-L16, i ditiocarbammati formano una coppia ionica in soluzione con

l'ammina di partenza protonata. Lo schema di sintesi generale per questa classe di complessi è riportato in Figura B17.

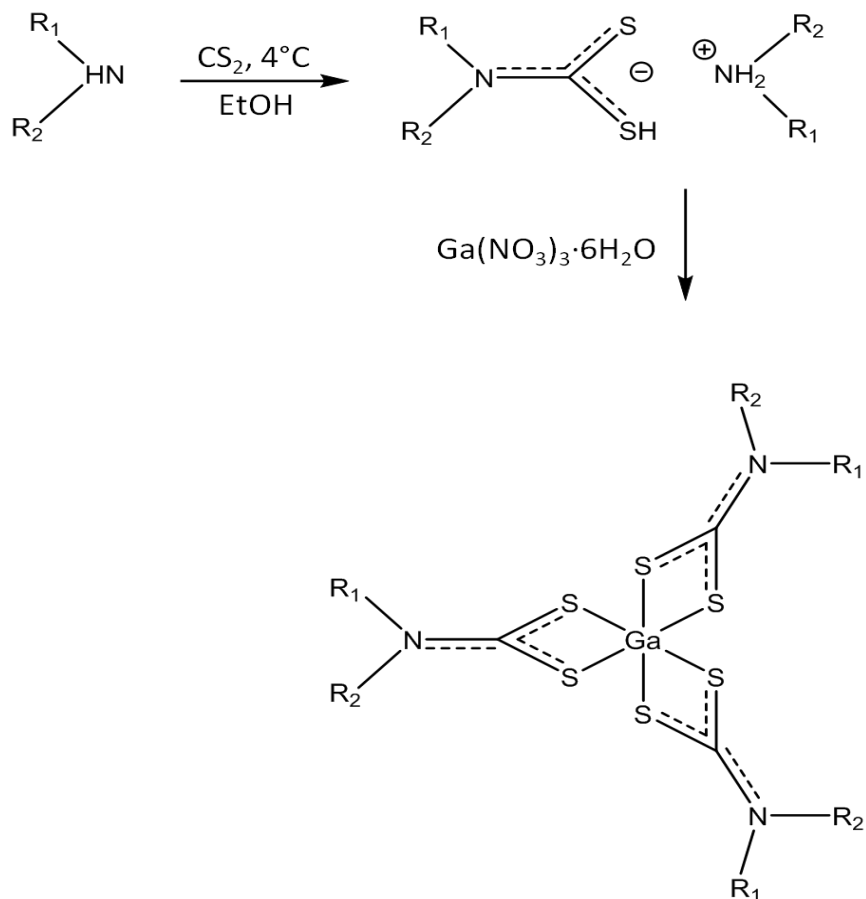


Fig. B17. Schema generale di sintesi per complessi del tipo $[Ga(DTC-Ln)_3]$ con leganti ditiocarbammici lineari.

È da sottolineare, inoltre, il caso dei due leganti Pr-13 e DTC-L15, le cui ammine corrispondenti sono disponibili in forma cloridrata. Ciò ha creato alcune difficoltà per quanto riguarda la sintesi e l'isolamento dei corrispondenti ditiocarbammati. Nella sintesi si è pensato, quindi, di utilizzare una quantità stechiometrica di NaOH (1 equivalente). In questo modo, in seguito all'aggiunta dell'ammina sciolta in etanolo, lentamente si apprezza la formazione di un precipitato, dovuto molto probabilmente alla formazione di NaCl, che risulta molto poco solubile in alcol. La soluzione è stata quindi centrifugata ed è stato separato il surnatante dal precipitato. Il surnatante, contenente l'ammina libera a pH neutro o debolmente basico, è stata utilizzata per produrre il ditiocarbammato e, senza passare per l'isolamento di quest'ultimo, si è aggiunto il sale di gallio che ha portato all'immediata formazione del complesso

desiderato. A titolo di esempio, in Figura B18 è mostrato lo schema di sintesi per il complesso [Ga(DTC-L15)₃].

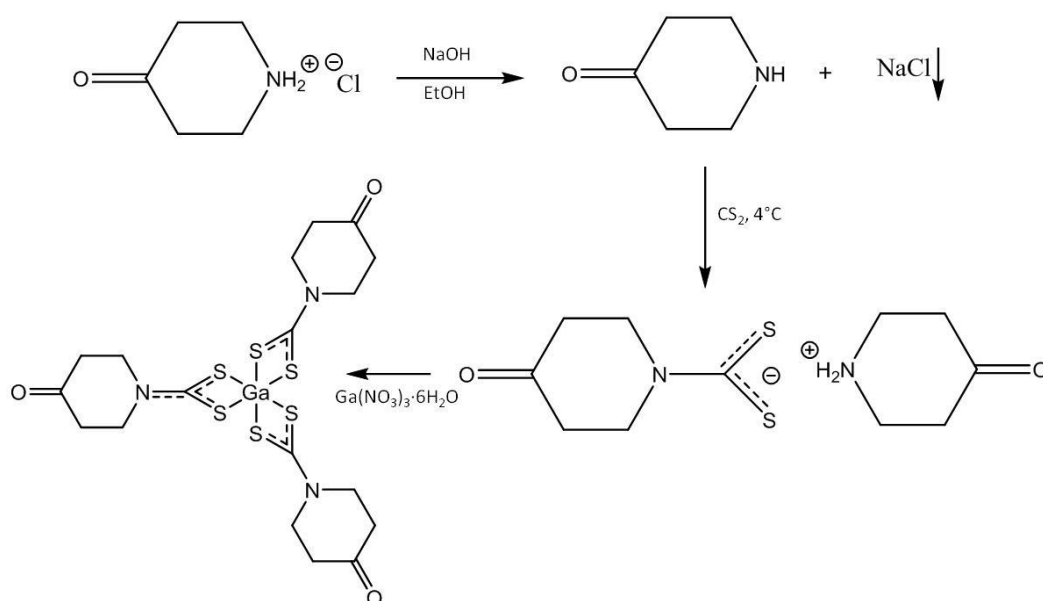


Fig. B18. Schema di sintesi del complesso [Ga(DTC-L15)₃].

Tutti i complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] sono stati ottenuti mediamente in alta resa (70-90%) nei diversi ambienti di reazione e sono stati caratterizzati mediante analisi elementare, spettroscopia IR, spettroscopia NMR monodimensionale (¹H, ¹³C) e bidimensionale (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC) e diffrattometria a raggi x.

In tutti i casi, l'analisi elementare dei complessi risulta in perfetto accordo con la formulazione proposta.

La spettroscopia IR non è diagnostica per verificare la formazione del complesso, poichè lo *stretching* del legame Ga-S avviene a numeri d'onda inferiori al limite di rilevazione (400 cm⁻¹) dello strumento. E' possibile, comunque, utilizzare questa tecnica di analisi per confermare la presenza di leganti ditiocarbammici nei prodotti, evidenziata dalle bande caratteristiche conformi a quelle riscontrate per i leganti liberi. Di particolare interesse risultano essere soprattutto due zone dello spettro. La prima, è compresa tra i 1580 e 1450 cm⁻¹, in cui si può apprezzare la banda relativa allo *stretching* asimmetrico del legame C-N. Tale banda sottolinea la presenza della delocalizzazione elettronica tipica dei ditiocarbammati. Infatti, i valori ottenuti risultano essere intermedi tra un legame C-N singolo (1350 - 1250 cm⁻¹) e un legame doppio (1690 - 1640 cm⁻¹). Nel passaggio da ditiocarbammato libero a complesso questa banda subisce uno *shift* ad energie più elevate, dimostrando un ulteriore incremento del carattere di doppio legame.

La seconda zona, tra 1060 e 940 cm⁻¹, è la regione in cui si osserva la banda di assorbimento relativa allo *stretching* asimmetrico del legame C-S tipico della funzione ditiocarbammica. In particolare, per i complessi

ottenuti si osserva un'unica banda di assorbimento in questa zona che, è diagnostica della presenza di un sistema altamente simmetrico dovuto alla coordinazione di tre leganti bidentati al centro metallico. Nel caso di coordinazione asimmetrica con uno o due ditiocarbammati si sarebbe osservato uno sdoppiamento della banda di assorbimento con una separazione di almeno $20\text{ cm}^{-1(155)}$. (Figura B19).

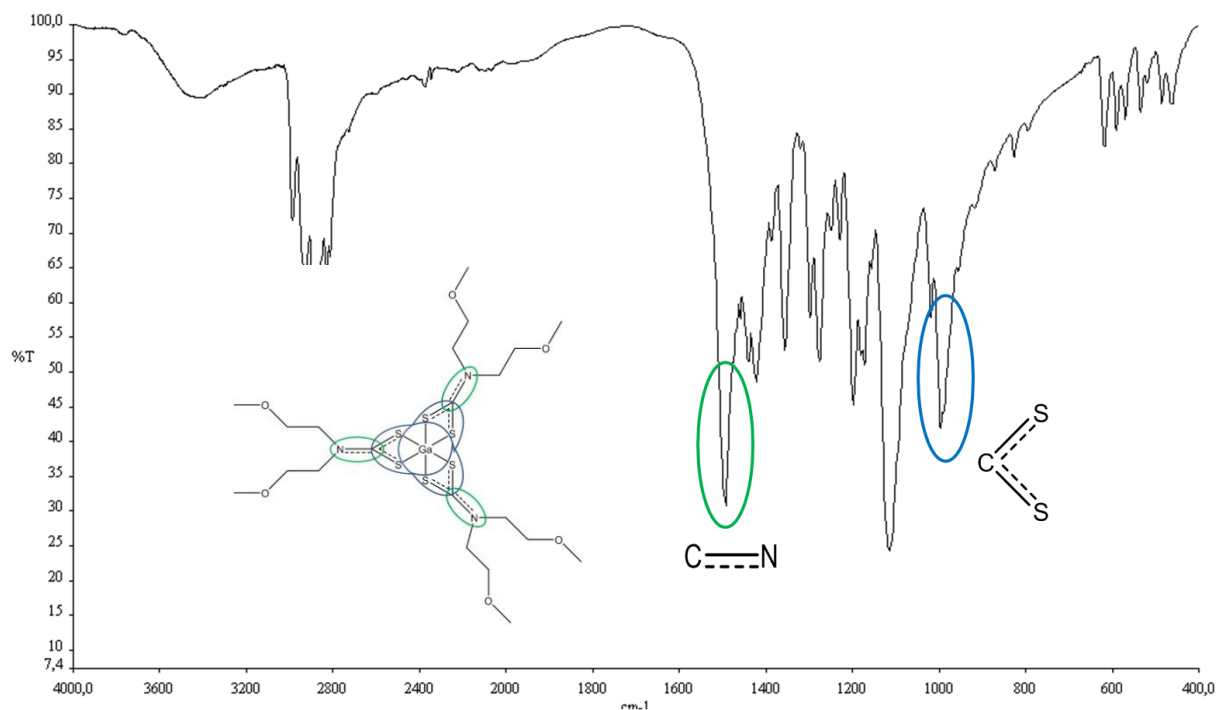


Fig. B19. Spettro IR di [Ga(DPODC)₃]. Sono evidenziate le bande di assorbimento di principale interesse.

ANALISI NMR

Tutti i complessi del tipo $[Ga(DTC-Ln)_3]$ sono stati caratterizzati mediante spettroscopia NMR, attraverso convenzionali esperimenti monodimensionali (1H e ^{13}C) e bidimensionali (1H - 1H COSY, 1H - 1H NOESY, 1H - ^{13}C -HSQC e 1H - ^{13}C -HMBC). In Tabella 7 sono riportati i valori di *chemical shift* dei ditiocarbammati liberi, qualora siano stati isolati e caratterizzati, e nei relativi complessi.

Gruppo	Legante libero		Complesso	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C
DITIOCARBAMMATI CICLICI				
PDTC				
<i>Pirrolidina</i>	1.84 (m), 3.86 (m)	25.6, 52.7	2.10 (m), 3.67 (m)	26.6, 54.7
CS_2	--	206.9	--	197.3
DTC-L2				
<i>Piperidina</i>	1.41 (m), 1.55 (m), 4.27 (m)	24.9, 25.2, 52.6	1.65 (m), 1.73 (m), 3.93 (m)	22.7, 25.1, 52.7
CS_2	--	202.2	--	201.7
DTC-L4				
<i>Piperazina</i>	2.52 (m), 4.32 (m)	49.8, 50.9	2.42 (m), 4.21 (m)	50.1, 56.8
CH_2CH_3	1.05 (t), 2.43 (q)	10.0, 50.7	0.95 (t), 2.34 (q)	13.3, 49.4
CS_2	--	202.1	--	200.7
DTC-L9				
<i>Piperidina</i>	1.73 (m), 2.12 (m), 3.52 (m), 5.76 (m)	35.0, 42.8, 71.5	1.89 (m), 2.22 (m), 3.69 (m), 4.78 (m)	38.0, 48.2, 69.8
<i>Aromatici</i>	7.33-7.50 (m)	127.7, 128.9, 132.3, 142.5	7.41 (m)	126.0-128.8, 133.5, 145.3
CS_2	--	210.1	--	201.0
DTC-L10				
<i>Pirrolidina</i>	1.54-1.64 (m), 1.70-1.95 (m), 2.71-2.83 (m), 3.6 (m)	23.8, 27.9, 52.2, 71.8	1.24 (m), 1.70 (m), 2.04 (m), 3.71 (m)	23.5, 29.0, 55.3, 71.9
<i>COOH</i>	--	175.9	--	177.6
CS_2	--	211.8	--	203.8
DTC-L16				
<i>Piperidina</i>	1.91 (m), 2.11 (m), 3.37 (m), 5.52 (m)	25.6, 27.9, 40.7, 49.7	1.93 (m), 2.05 (m), 2.57 (m), 3.45 (m)	27.9, 39.2, 50.9
<i>C(O)OCH₂CH₃</i>	1.28 (t), 4.17 (q)	13.1, 60.5	1.28 (t), 4.18 (q)	14.2, 60.8, 173.6
CS_2	--	210.8	--	201.7

DTC-L17				
<i>Piperidina</i>	1.75 (m), 4.35 (m)	34.1, 49.4, 107.5	1.87 (m), 4.09 (m)	34.2, 50.1, 104.8
<i>OCH₂CH₂O</i>	3.95 (s)	64.5	4.00 (s)	64.5
<i>CS₂</i>	--	208.7	--	201.6

DTC-L20				
<i>Piperidina</i>	1.60 (m), 2.05 (m), 3.20 (m)	27.7, 49.3	1.26-1.57(m), 1.71 (m), 1.90 (m), 2.86 (m)	28.5, 42.9
<i>Morfolina</i>	2.75 (m), 3.85 (m)	50.8, 66.6	2.44 (m), 3.85 (m)	49.7, 66.4
<i>CS₂</i>	--	207.1	--	204.4

DTC-L22				
<i>Azepano</i>	1.43 (m), 1.67 (m), 4.13 (m)	26.7, 28.1, 53.2	1.62 (m), 1.86 (m), 3.93 (m)	27.0, 55.4
<i>CS₂</i>	--	213.2	--	201.4

DTC-L23				
<i>Azocano</i>	1.50 (m), 1.85 (m), 4.10 (m)	25.1, 26.2, 26.8, 56.3	1.56-1.62 (m), 1.92 (m), 3.88 (m)	25.6,
<i>CS₂</i>	--	207.1	--	202.1

DTC-L25				
<i>Piperidina</i>	1.23 (m), 1.65 (m), 1.88 (m), 2.54 (m), 5.35 (m)	29.2, 39.9, 49.8	1.25 (m), 1.70 (m), 1.82 (m), 2.79 (m), 3.24 (m), 4.47 (m)	28.7, 31.7, 35.5, 43.7, 52.1
<i>CH₂</i>	3.05 (m)	43.1	2.57 (m)	41.7
<i>Aromatici</i>	7.23-7.32 (m)	125.0, 127.5, 128.2	7.19-7.29 (m)	126.4, 128.7, 129.5, 140.3
<i>CS₂</i>	--	209.4	--	198.4

PIPE-1				
<i>Piperazina</i>	2.95 (m), 4.37 (m)	53.2, 62.0	3.20 (m), 4.19 (m)	49.9, 51.7
<i>Aromatici</i>	6.96-7.01 (m)	115.5, 125.3, 143.4, 155.2	6.91-6.98 (m), 7.08 (m)	111.4, 118.6-121.1-123.3, 140.0, 152.3
<i>OCH₃</i>	3.74 (m)	57.9	3.91 (s)	55.5
<i>CS₂</i>	--	214.1	--	201.7

DITIOCARBAMMATI LINEARI

DEDC				
CH_2CH_3	1.10 (t), 3.97 (q)	11.2, 48.8	1.22 (t), 3.80 (q)	12.3, 49.2
CS_2	--	209.0	--	201.2

DMDC				
CH_3	3.30 (s)	43.3	3.42 (s)	45.3
CS_2	--	207.4	--	203.2

DPDC				
$CH_2CH_2CH_3$	0.88 (t), 1.74 (m), 3.93 (m)	11.5, 22.1, 56.2	0.94 (t), 1.80 (m), 3.67 (m)	11.2, 20.4, 56.9
CS_2	--	206.8	--	202.0

DPODC				
CH_2CH_2	--	--	3.73 (t), 4.06 (t)	56.2, 69.8
OCH_3	--	--	3.37 (s)	58.9
CS_2	--	--	--	203.4

DBODC				
CH_2CH_2	--	--	3.77 (t), 4.05 (t)	56.2, 67.3
OCH_2CH_3	--	--	1.21 (t), 3.52 (q)	14.9, 66.4
CS_2	--	--	--	203.1

PrEt				
CH_2CH_3	--	--	1.32 (t), 3.80 (q)	12.1, 49.9
$CH_2CH_2CH_3$	--	--	0.94 (t), 1.80 (m), 3.96 (m)	10.7, 20.1, 56.5
CS_2	--	--	--	201.7

POEt				
CH_2CH_3	--	--	1.31 (t), 3.93 (m)	11.7, 51.9
CH_2CH_2	--	--	3.73 (t), 3.93 (m)	54.2, 58.9
OCH_3	--	--	3.38 (s)	69.9
CS_2	--	--	--	202.4

ISOMe				
$CH(CH_3)_2$	--	--	1.28 (d), 4.97 (m)	20.2, 56.7
CH_2CH_2	--	--	3.72 (t), 3.86 (t)	47.6, 58.9
OCH_3	--	--	3.38 (s)	69.4
CS_2	--	--	--	203.1

PR-13				
CH_3	--	--	3.46 (s)	44.1
CH_2	--	--	4.55 (m)	58.1
$C(O)OCH_2CH_3$	--	--	1.33 (t), 4.27 (q)	14.1, 61.6
CS_2	--	--	--	206.4

DITIOCARBAMMATI DERIVATI DA AMMINA PRIMARIA				
NHEt				
NH	7.76 (s b)	--	7.34 (s b)	--
CH ₂ CH ₃	1.13 (t), 3.50 (m)	14.6, 41.2	1.30 (t), 3.50 (m)	13.3, 45.0
CS ₂	--	209.6	--	204.9
CyP				
Ciclopentile	1.47 (m), 1.56 (m), 1.69 (m), 4.60 (m)	32.9, 35.1, 58.2	1.53 (m), 1.67 (m), 1.91(m), 3.98 (m)	23.7, 24.2, 38.7
NH	7.62 (s b)	--	10.38 (s b)	--
CS ₂	--	210.5	--	206.6
CyH				
Cicloesile	1.22 (m), 1.69 (m), 1.97 (m), 4.14 (m)	22.6, 34.7, 35.0, 60.8	1.24 (m), 1.71 (m), 1.86(m), 3.46 (m)	24.4, 30.7, 32.8, 55.6
NH	7.49 (s b)	--	10.29 (s b)	--
CS ₂	--	211.3	--	200.8
DTC-L8				
Adamantano	1.76 (m), 1.97 (m), 2.19 (m)	29.5, 40.8, 42.0, 54.1	1.63 (m), 1.97(m), 2.07 (m)	31.6, 39.5, 46.2, 62.0
NH	7.27 (s b)	--	9.33 (s b)	--
CS ₂	--	214.6	--	198.8
PIPE-2				
NH	7.78 (s b)	--	9.79 (s b)	--
CH ₂ CH ₂	2.45 (t), 3.52 (m)	38.2, 56.2	2.57 (t), 3.70 (m)	36.3, 54.9
Piperazina	2.97 (m), 3.34 (m)	50.2, 52.8	2.99 (m), 3.12 (m)	50.3, 53.2
Aromatici	6.88-6.92 (m)	110.8, 117.8, 120.6, 122.8, 141.1, 152.3	6.92 (m)	112.5, 118.3, 121.3, 122.9, 141.8, 153.5
OCH ₃	3.77 (s)	55.0	3.78 (s)	55.9
CS ₂	--	209.6	--	195.5

Tab. B2. Elenco dei valori di *chemical shift* dei ditiocarbammati liberi, qualora il legante sia stato isolato, e nei relativi complessi.

La buona risoluzione degli spettri indica, come previsto, che i complessi ottenuti del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] sono diamagnetici. Complessivamente, non si sono osservate variazioni significative dei *segnali* rispetto ai leganti liberi, se non un leggero e non sempre verificato spostamento a valori di *chemical shift* inferiori soprattutto in riferimento ai protoni in α all'azoto parte della funzione ditiocarbammica. La principale differenza è riscontrabile a livello del carbonio quaternario ditiocarbammico, il cui segnale è spostato a valori di *chemical shift* inferiori rispetto ai leganti liberi, mediamente di circa 5-10 ppm (Figura B20). È però da considerare il fatto che, a causa della diversa solubilità dei ditiocarbammati liberi rispetto ai relativi complessi di Ga(III), gli spettri sono stati registrati in solventi diversi (MeOD per i leganti liberi e CD₃Cl per i complessi).

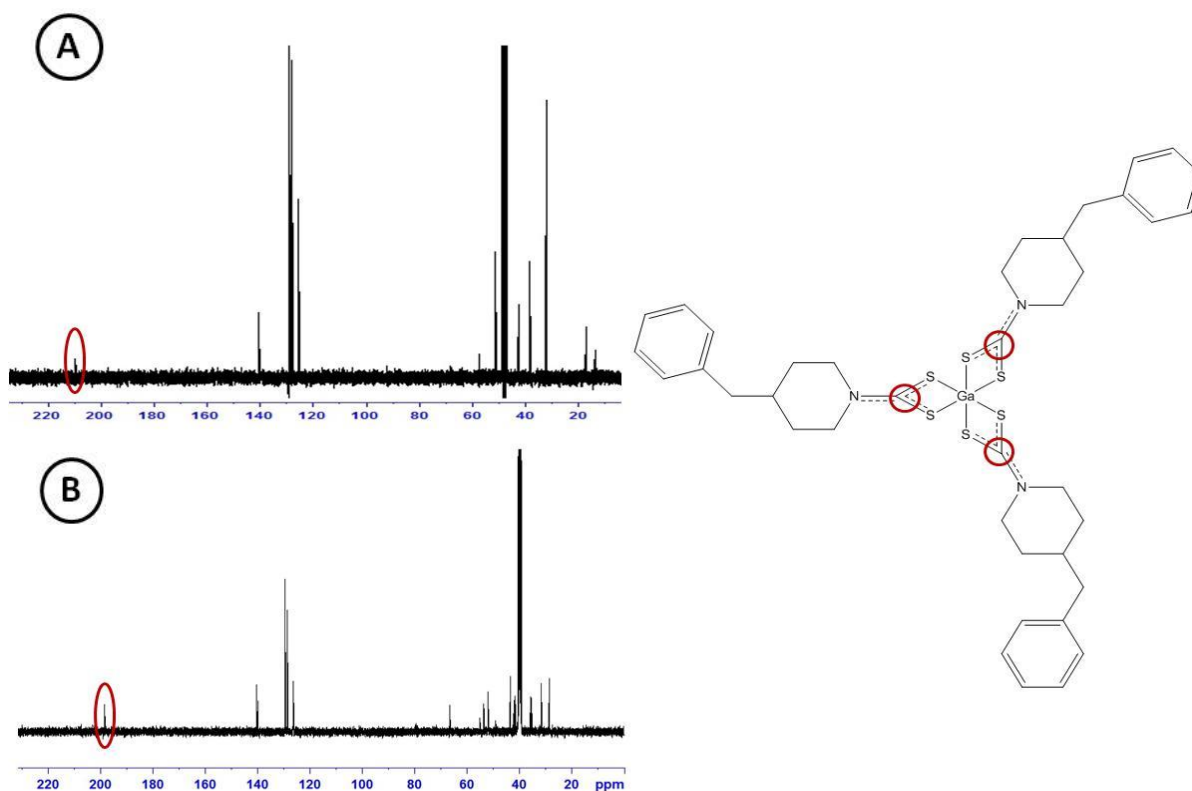


Fig. B20. Spettri ^{13}C -NMR del legante DTC-L25 (A) e del relativo complesso di gallio(B) in cui è evidenziato lo spostamento a *chemical shift* inferiore del segnale relativo al CS_2 nel complesso rispetto al legante libero.

Per quanto riguarda i complessi con ditiocarbammati ciclici, nella zona alifatica degli spettri ^1H NMR tra 1.2 e 4.8 ppm si registrano i segnali relativi all'eterociclo di cui è parte l'azoto ditiocarbammico. Tra questi, i segnali con *chemical shift* più elevato sono quelli associati ai protoni in posizione α rispetto all'azoto ditiocarbammico, che risentono maggiormente della presenza dell'atomo di azoto elettroneattrattore con effetto deschermante da cui consegue uno spostamento a frequenze di risonanza maggiori. Lo stesso fenomeno si osserva, anche se in misura inferiore, per i protoni in β rispetto all'azoto ditiocarbammico nei leganti caratterizzati dalla piperazina quali DTC-L4 e PIPE-1. Nei casi di dei ditiocarbammati piperidinici DTC-L9, DTC-L16, DTC-L20 e DTC-L25, la presenza di sostituenti in posizione 4 all'anello piperidinico determina una mancata equivalenza magnetica dei protoni in posizione assiale ed equatoriale legati allo stesso carbonio della piperidina. Ciò comporta uno spettro ^1H -NMR più complesso, i cui segnali sono stati comunque attribuiti grazie anche alle correlazioni ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C evidenziate negli esperimenti bidimensionali ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC. In particolare, lo spettro ^1H - ^{13}C HSQC consente di identificare i protoni metilenici non equivalenti, dal momento che essi presentano un analogo picco di correlazione con lo stesso atomo di carbonio. In Figura B21 sono riportati, a titolo di esempio, gli spettri monodimensionali e bidimensionali registrati con le relative assegnazioni per il complesso $[\text{Ga}(\text{DTC-L16})_3]$.

In tutti gli spettri ^{13}C NMR raccolti, il segnale del carbonio ditiocarbammico è scarsamente visibile, collocandosi quasi a livello del rumore di fondo. Tuttavia, esso è identificabile nella mappa bidimensionale ^1H - ^{13}C -HMBC, in cui compare il picco di correlazione con i protoni dei metileni in α all'azoto ditiocarbammico, con i quali accoppia secondo una $^3J_{\text{CH}}$. Anche per l'assegnazione dei *chemical shifts* relativi ad ulteriori atomi di carbonio quaternari presenti in diversi ditiocarbammati utilizzati, quali quelli aromatici in DTC-L9, DTC-L25 e PIPE-1, e quelli carbonilici in DTC-L10, DTC-L15 e DTC-L16, è stato utilizzato lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HMBC, con i relativi picchi di correlazione. In Figura B22 è mostrato lo spettro ^1H - ^{13}C HMBC, l'ingrandimento della zona di principale interesse del complesso $[\text{Ga}(\text{PIPE-1})_3]$ ha permesso il riconoscimento dei segnali relativi ai carboni quaternari.

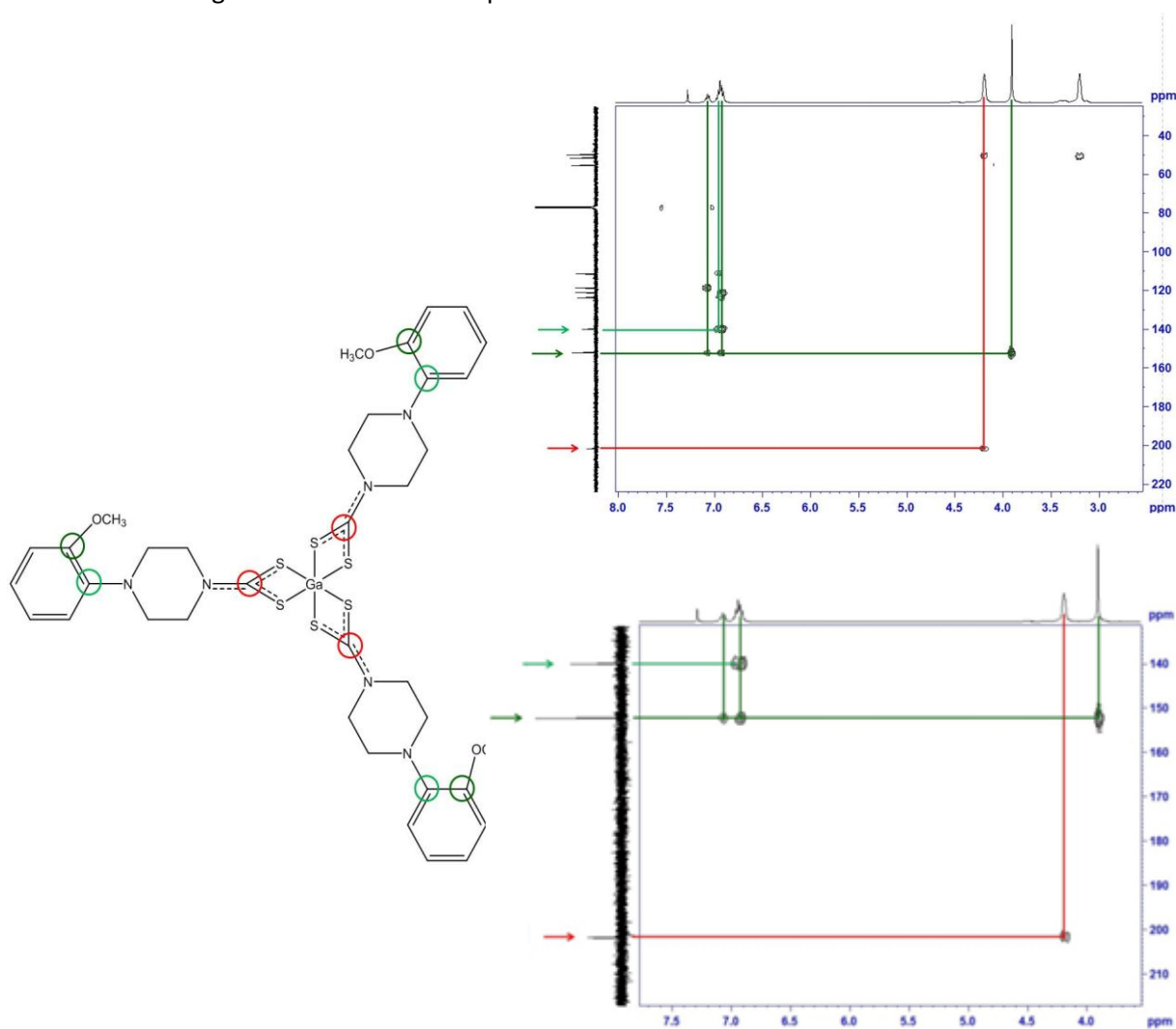


Fig. B22. Spettro ^1H - ^{13}C HMBC e ingrandimento della zona di interesse del complesso $[\text{Ga}(\text{PIPE-1})_3]$ in cui sono evidenziate le correlazioni tra il carbonio ditiocarbammico e i protoni in α all'azoto e tra i carboni aromatici quaternari e i relativi protoni.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei complessi con ditiocarbammati lineari presentano tutti i segnali relativi alla catene alifatiche tra 0.9 e 5.0 ppm, in generale, sono di più immediata interpretazione, e conservano ben evidenti tutte le loro caratteristiche molteplicità. Anche in questo caso, i protoni in posizione α rispetto ad atomi elettronegativi quali l'azoto ditiocarbammico o l'ossigeno della funzione eterea in catena laterale sono caratterizzati dai valori di *chemical shift* più elevati (3.5-5.0 ppm). Negli spettri $^{13}\text{C-NMR}$, analogamente a quanto detto in precedenza, per l'individuazione del segnale relativo agli atomi di carbonio ditiocarbammici e al carbonio del gruppo estereo in $[\text{Ga}(\text{PR-13})_3]$ si è dovuto analizzare lo spettro bidimensionale $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$, in cui si evidenziano i relativi picchi di correlazione.

Negli spettri $^1\text{H-NMR}$ relativi ai complessi con ditiocarbammati derivati da ammina primaria, invece, si sono riscontrate delle differenze più significative, in particolare a livello del protone direttamente legato all'azoto ditiocarbammico, il cui segnale è spostato a valori di *chemical shift* superiori di circa 3 unità, come riportato per il complesso $[\text{Ga}(\text{CyP})_3]$ in Figura B23.

Nei relativi spettri $^{13}\text{C-NMR}$ di particolare difficoltà è l'individuazione del segnale relativo al carbonio ditiocarbammico, dal momento che non si verifica correlazione *long-range* con il protone direttamente legato all'azoto ditiocarbammico. È stato comunque possibile procedere all'assegnazione sfruttando il picco di correlazione con i protoni dei gruppi alifatici in α all'atomo di azoto (in Figura B24 l'esempio di $[\text{Ga}(\text{NHET})_3]$). Più complesso il caso di $[\text{Ga}(\text{DTC-L8})_3]$; dal momento che non sono presenti gruppi CH o CH_2 in questa posizione, si è dovuto identificare un debole e appena visibile picco di correlazione con i protoni dei gruppi alifatici in β all'azoto ditiocarbammico.

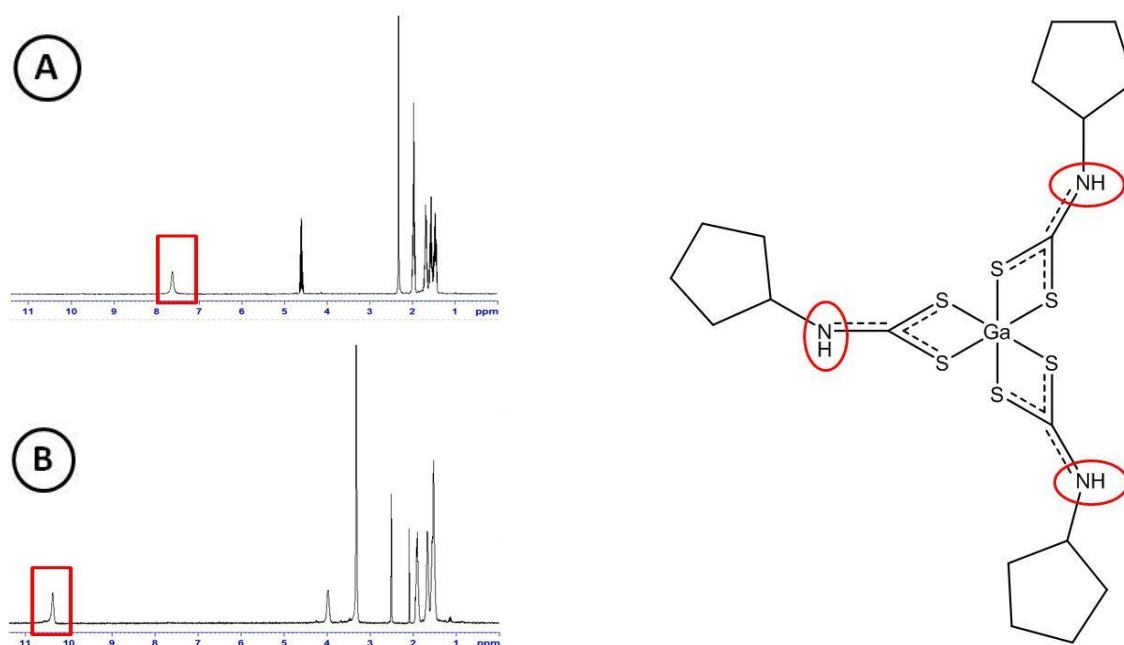


Fig. B23. Spettri $^1\text{H-NMR}$ del legante CyP (A) e del relativo complesso di gallio (B) in cui è evidenziato lo spostamento a *chemical shift* più elevati del segnale relativo all'NH nel complesso rispetto al legante libero.

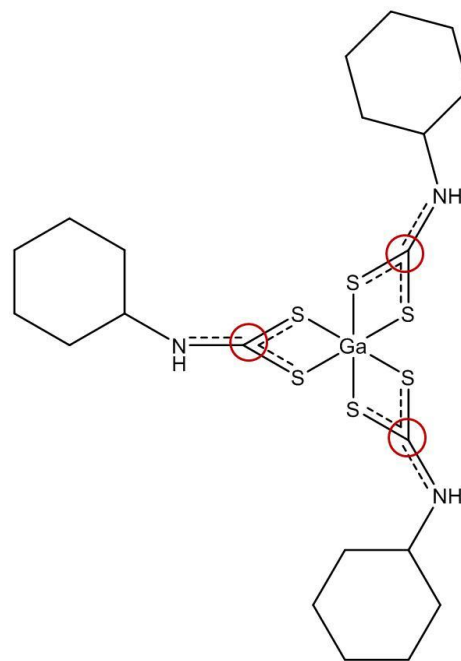
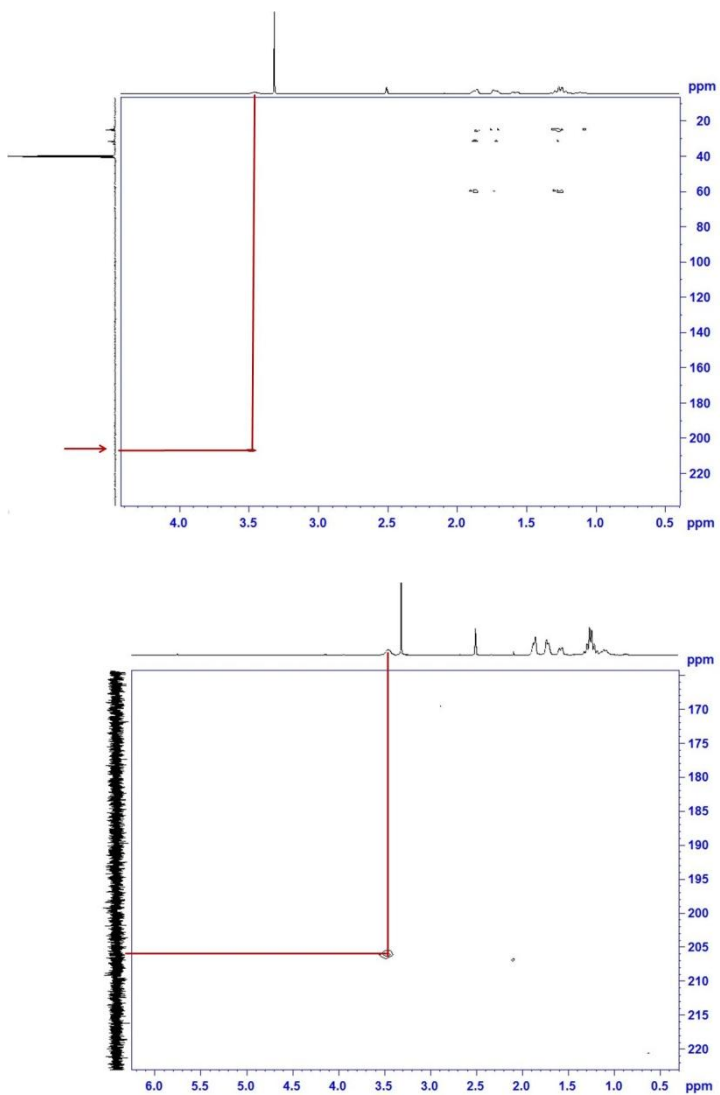


Fig. B24. Spettro ^1H - ^{13}C HMBC e ingrandimento della zona di interesse del complesso $[\text{GaCyH}]_3$ in cui sono evidenziate le correlazioni tra il carbonio ditiocarbammico e i protoni in α all'azoto.

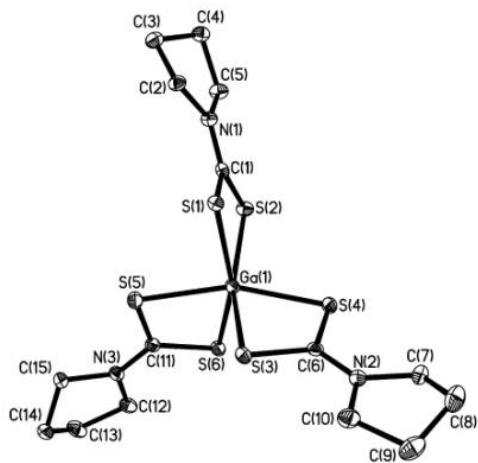
CRISTALLOGRAFIA AI RAGGI X:

Cristalli singoli dei complessi [Ga(PDTC)₃], [Ga(DTC-L2)₃], [Ga(DPDC)₃], [Ga(NHET)₃] e [Ga(DBODC)₃] sono cresciuti mediante lenta diffusione di *n*-esano in una soluzione di diclorometano. I campioni così ottenuti sono poi stati asciugati in atmosfera inerte sotto una lieve corrente di diazoto.

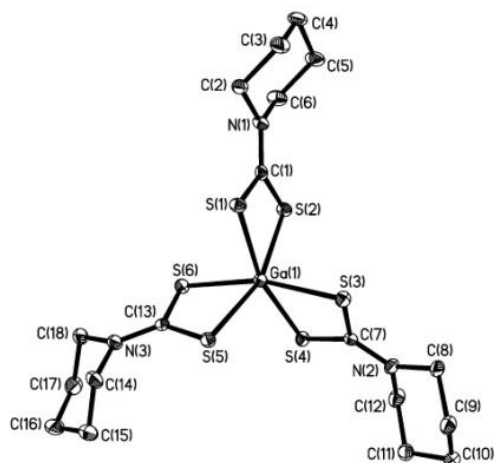
In Tabella B3 sono indicate le principali caratteristiche dei cristalli analizzati mentre in Figura B25 sono riportati i modelli ORTEP⁴⁽¹⁸⁶⁾ dei complessi, con l'annesso schema di numerazione. Nel caso particolare del complesso [Ga(NHET)₃], l'unità asimmetrica è costituita da due molecole indipendenti e strutturalmente diverse, mentre la comune nota distintiva di tutti i composti qui caratterizzati è la presenza del set donatore S₆, articolato su tre leganti bidentati identici di tipo ditiocarbammico ovvero complessi del tipo "2+2+2".

Esperimento	[Ga(PDTC) ₃]	[Ga(DTC-L2) ₃]	[Ga(DPDC) ₃]	[Ga(NHET) ₃]	[Ga(DBODC) ₃]
Formula minima	C ₁₅ H ₂₄ N ₃ S ₆ Ga	C ₁₈ H ₃₀ N ₃ S ₆ Ga	C ₂₁ H ₄₂ N ₃ S ₆ Ga	C ₉ H ₁₈ N ₃ S ₆ Ga	C ₂₇ H ₅₄ N ₃ O ₆ S ₆ Ga
Peso Molecolare	508.45	550.53	598.66	430.34	778.81
Temperatura/K	130(9)	129.8(3)	142.9(2)	175(4)	172.8(5)
Sistema cristallino	monoclinico	monoclinico	monoclinico	monoclinico	triclinico
Gruppo spaziale	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	I2/a	P-1
a/Å	13.1191(3)	13.2161(6)	10.3567(7)	17.0141(4)	10.03891(18)
b/Å	9.2840(2)	11.9598(4)	17.1715(14)	14.1126(3)	13.4326(2)
c/Å	17.8157(5)	15.9645(9)	17.2231(14)	30.8701(8)	15.1709(4)
α/°	90.00	90.00	90.00	90.00	102.8698(18)
β/°	100.383(2)	100.562(5)	90.130(7)	105.711(3)	100.4319(19)
γ/°	90.00	90.00	90.00	90.00	94.3380(14)
Volume/Å ³	2134.37(9)	2480.6(2)	3063.0(4)	7135.4(3)	1947.02(7)
Dimensioni /mm ³	0.6 × 0.22 × 0.12	0.22 × 0.20 × 0.10	0.4 × 0.25 × 0.15	0.5 × 0.42 × 0.2	0.6 × 0.45 × 0.18
Radiazione	Mo Kα (λ = 0.7107)	Mo Kα (λ = 0.7107)	Mo Kα (λ = 0.7107)	Mo Kα (λ = 0.7107)	Mo Kα (λ = 0.7107)
riflessioni	41908	31922	19381	34329	32664
Indici R finali (R ₁ ;wR ₂)	0.0434, 0.0668	0.0776, 0.1105	0.1379, 0.2061	0.0667, 0.1081	0.0507, 0.0956

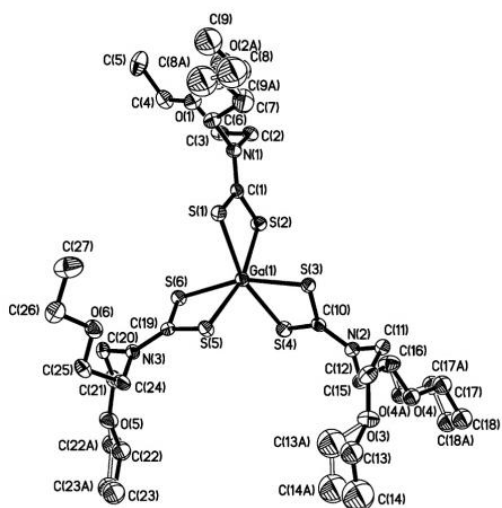
Tab. B3. Principali caratteristiche dei cristalli analizzati.



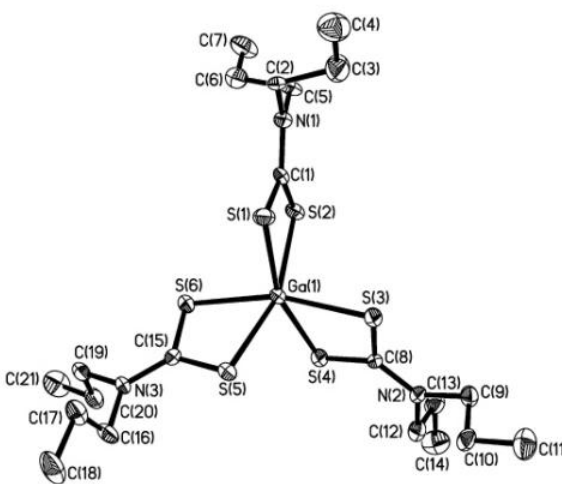
$[Ga(PDTC)_3]$



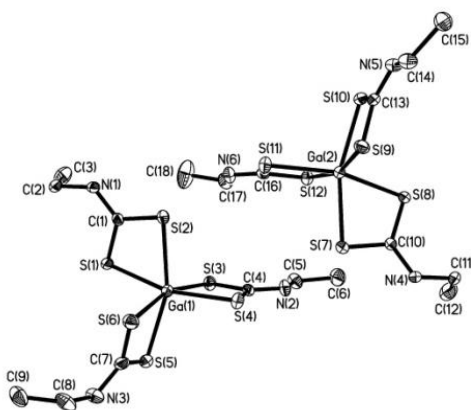
$[Ga(DTC-L2)_3]$



$[Ga(DPDC)_3]$



$[Ga(DBODC)_3]$



$[Ga(NHET)_3]$

Fig. B25. Schema ORTEP dei complessi $[Ga(DTC-Ln)_3]$. Gli ellissoidi di rotazione sono stati disegnati al livello di probabilità del 40%.

Gli atomi di idrogeno sono stati omessi per chiarezza.

Un esame dell'intorno di coordinazione di tutti i complessi ha chiaramente indicato che detto intorno è virtualmente immutato. Infatti, i valori dello scarto quadratico medio sono compresi tra 0.07 e 0.11 Å, per una sovrapposizione di venti atomi in ogni coppia. Questo consente di dire che la variazione del gruppo sostituito a livello dei leganti produce effetti molto limitati nella sfera di coordinazione del metallo. La geometria, che a prima vista potrebbe essere considerata di tipo ottaedrico distorto, in realtà è trigonale prismatica (TP) distorta. Lo testimoniano i valori dell'angolo diedro formato dalle facce opposte triangolari, come rappresentato nel caso del complesso [Ga(PDTC)₃] in Figura B26. Nelle sei molecole rinvenute nei cinque complessi, l'angolo oscilla tra 0.1° e 3.3°, praticamente corrispondente al valore ideale di 0°. Anche l'angolo di *twist* tra i corrispondenti vertici delle facce triangolari opposte, misurato dall'angolo diedro formato dagli atomi di zolfo di uno stesso legante dtc e dai centroidi geometrici delle facce triangolari (ad es. S1-C_{S1S3S5}-C_{S2S4S6}-S2) rimane praticamente costante, ed oscilla tra 36.1 e 40.4°.

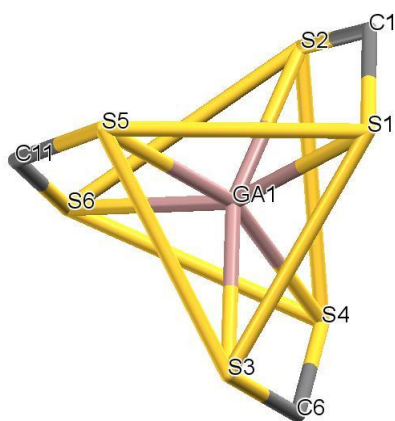


Fig. B26. Il comune intorno di coordinazione nei cinque complessi. Sono evidenziate le facce triangolari opposte S1-S3-S5 ed S2-S4-S6.

Relativamente alle distanze Ga-S nella sfera di coordinazione, a differenza di quanto ci si potrebbe aspettare, data l'identica natura dei tre leganti chelanti intorno al centro metallico, esse non sono rigorosamente identiche. In tutti i casi c'è una certa variazione (*range* complessivo tra 2.407 e 2.487 Å), anche se le distanze medie misurate all'interno della singola molecola mostrano minore variabilità. Infatti, nel caso di [Ga(PDTC)₃] e [Ga(NHEt)₃] è di circa 2.44 Å, nei rimanenti tre complessi di 2.43 Å. Vi è sempre almeno una distanza Ga-S più allungata rispetto alle altre, con un differenziale minimo di +0.02 Å in [Ga(DTC-L2)₃] ed uno massimo di +0.04 Å in [Ga(PDTC)₃] e [Ga(NHEt)₃]. Tuttavia, il *range* complessivo e le distanze di punta risultano essere ricomprese nell'ambito dei pochi dati riportati in letteratura per altri complessi esaordinati Ga-ditiocarbammati⁽¹⁸⁷⁾ (*range*: 2.404-2.492 Å). Considerazioni simili possono essere fatte a proposito delle distanze C-S nel legante ditiocarbammitico; in questo caso la variazione è minore (*range* dei valori tra 1.70 e 1.73 Å), e distanze medie nell'ambito di ogni molecola oscillanti da 1.714

a 1.729 Å. Così pure avviene per le distanze C-N, che mostrano lo stesso differenziale delle distanze C-S (0.03 Å) e distanze medie per ogni singola molecola che oscillano da 1.317 e 1.327 Å.

Per quello che riguarda invece gli angoli di legame intorno al gallio, gli angoli di *bite* dei leganti ditiocarbammici sono anch'essi tutti molto simili (media dei tre valori per ogni singola molecola oscillante tra 73.6° in [Ga(PDTC)₃] e 74.0° in [Ga(DTC-L2)₃]). La deformazione imposta all'intorno esacoordinato da questi vincoli è certamente la prima responsabile della geometria trigonale prismatica. Per effetto di tale geometria, anche gli angoli S-Ga-S con i due atomi di zolfo reciprocamente in *trans* deviano significativamente, in media di circa 20°, dal valore ideale di 180°; il *range* nelle diverse molecole varia da 159.7° in [Ga(PDTC)₃] a 163.3° in [Ga(DTC-L2)₃]. La geometria trigonale prismatica, peraltro non è nuova in complessi a n.c.=6 con intorno *sulfur-rich*: una indagine nel database di Cambridge⁽¹⁸⁸⁾ rivela non meno di un centinaio di strutture con un *set* di angoli confrontabile con quello trovato in questa serie di composti. L'intorno all'azoto è invece chiaramente di tipo *sp*₂, con angoli di poco superiori all'ideale valore di 120°. Questo, unitamente alla uniformità delle distanze C-S e C-N supporta l'idea che nel residuo ditiocarbammico vi sia una estesa mesomeria.

Per una visione di insieme di seguito sono riportate in Tabella B4 e B5 le distanze e gli angoli di legame di maggiore interesse.

Esperimento	[Ga(PDTC) ₃]	[Ga(DTC-L2) ₃]	[Ga(DPDC) ₃]	[Ga(NHEt) ₃]	[Ga(NHEt) ₃]	[Ga(DBODC) ₃]
				Mol 1	Mol 2	
Ga1-S1	2.4551(4)	2.4515(7)	2.4228(15)	2.4211(9)	2.4634(9)	2.4633(6)
Ga1-S2	2.4354(4)	2.4124(6)	2.4336(14)	2.4707(9)	2.4074(9)	2.4189(6)
Ga1-S3	2.4868(4)	2.4134(6)	2.4164(16)	2.4306(9)	2.4296(10)	2.4169(6)
Ga1-S4	2.3973(4)	2.4435(7)	2.4327(16)	2.4295(9)	2.4789(9)	2.4445(6)
Ga1-S5	2.4084(4)	2.4251(6)	2.4544(15)	2.4870(9)	2.4290(9)	2.4264(6)
Ga1-S6	2.4870(4)	2.4270(6)	2.4131(15)	2.4169(10)	2.4514(9)	2.4111(6)
S1-C_{dtc}	1.7216(16)	1.729(2)	1.713(5)	1.712(3)	1.720(3)	1.718(2)
S2-C_{dtc}	1.7261(15)	1.729(2)	1.714(6)	1.722(3)	1.711(3)	1.720(2)
S3-C_{dtc}	1.7188(16)	1.728(2)	1.728(6)	1.711(3)	1.709(3)	1.724(2)
S4-C_{dtc}	1.7202(16)	1.724(2)	1.702(5)	1.720(3)	1.722(3)	1.717(2)
S5-C_{dtc}	1.7243(16)	1.728(2)	1.712(5)	1.710(4)	1.722(3)	1.718(2)
S6-C_{dtc}	1.7189(16)	1.734(2)	1.722(5)	1.712(4)	1.714(3)	1.727(2)
N1-C_{dtc}	1.313(2)	1.319(3)	1.315(7)	1.318(4)	1.317(4)	1.332(3)
N2-C_{dtc}	1.318(2)	1.323(3)	1.328(7)	1.314(4)	1.320(4)	1.328(3)
N3-C_{dtc}	1.321(2)	1.324(3)	1.338(6)	1.330(5)	1.316(4)	1.321(3)

Tab. B4. Principali distanze (Å) di legame dei complessi [Ga(DTC-Ln)₃].

Esperimento	[Ga(PDTC) ₃]	[Ga(DTC-L2) ₃]	[Ga(DPDC) ₃]	[Ga(NHEt) ₃]	[Ga(NHEt) ₃]	[Ga(DBODC) ₃]
				Mol 1	Mol 2	
S_{dtc}-Ga1-S_{dtc}	73.841(13)	73.76(2)	73.82(5)	73.55(3)	73.99(3)	73.465(19)
	73.590(14)	74.13(2)	73.79(5)	74.18(3)	73.39(3)	73.947(19)
	73.513(14)	74.10(2)	73.46(5)	73.45(3)	73.62(3)	74.012(18)
S-Ga1-S_(trans)	158.045(15)	164.82(2)	161.91(6)	164.33(3)	159.41(3)	164.51(2)
	160.425(16)	164.41(2)	160.65(6)	160.66(3)	162.91(3)	161.90(2)
	160.777(16)	160.77(2)	163.69(6)	161.87(3)	163.12(3)	160.67(2)
N1-C_{dtc}-S_{dtc}	121.99(12)	123.11(18)	121.7(4)	122.3(2)	120.3(3)	122.19(17)
	121.11(12)	121.75(18)	121.6(4)	120.6(2)	122.3(3)	121.55(16)
N2-C_{dtc}-S_{dtc}	122.16(12)	121.43(18)	120.7(4)	122.1(3)	121.5(3)	121.22(16)
	121.22(12)	122.59(18)	123.1(4)	120.6(3)	121.0(3)	122.40(16)
N3-C_{dtc}-S_{dtc}	120.73(12)	122.37(18)	122.5(4)	119.8(3)	120.6(3)	123.36(15)
	122.63(12)	122.40(17)	121.6(4)	122.2(3)	122.8(3)	121.28(15)

Tab. B5. Principali angoli (deg) di legame dei complessi [Ga(DTC-Ln)₃]

Per quello che riguarda le distanze delle varie catene laterali, siano esse cicliche o lineari, esse non appaiono diverse da quanto ci si potrebbe attendere e non meritano particolari commenti. Quanto all'arrangiamento di tali residui, nei casi dei ditiocarbammati a catena lineare i gruppi sostituenti all'azoto si presentano invariabilmente in configurazione estesa, mentre nel caso dei ditiocarbammati ciclici, si può notare che il *puckering* dei tre anelli pentaatomici in [Ga(PDTC)₃] è due volte di tipo *envelope* (C₃) ed una volta di tipo *half-chair* (C₂), in [Ga(DTC-L2)₃], tutti e tre gli anelli esaatomici sono in conformazione *chair*. Per concludere, è stata fatta un'analisi delle interazioni di non legame. Nella maggioranza dei casi, a dispetto delle più o meno estese ramificazioni delle catene laterali agli atomi di azoto, non sono stati trovati nè legami a idrogeno "canonici" nè interazioni di non legame in cui il contatto avvenisse ad una distanza inferiore di 2.7 Å. L'unico caso in cui si presentano delle interazioni rilevanti è quello del complesso [Ga(NHEt)₃]. In questo caso, il composto si impacca in una cella alquanto larga, dove trovano spazio 16 (8 coppie) molecole. Difatti, ogni coppia è costituita da due molecole che sono tenute in posizione da alcuni legami a idrogeno non particolarmente rigidi. A tale nucleo si uniscono poi ulteriori contatti, anch'essi alquanto poco intensi, che si estendono in due delle tre direzioni dello spazio e stabilizzano l'impaccamento complessivo. Le principali interazioni di non legame (Tabella B6, Figura B27) sono riportate di seguito.

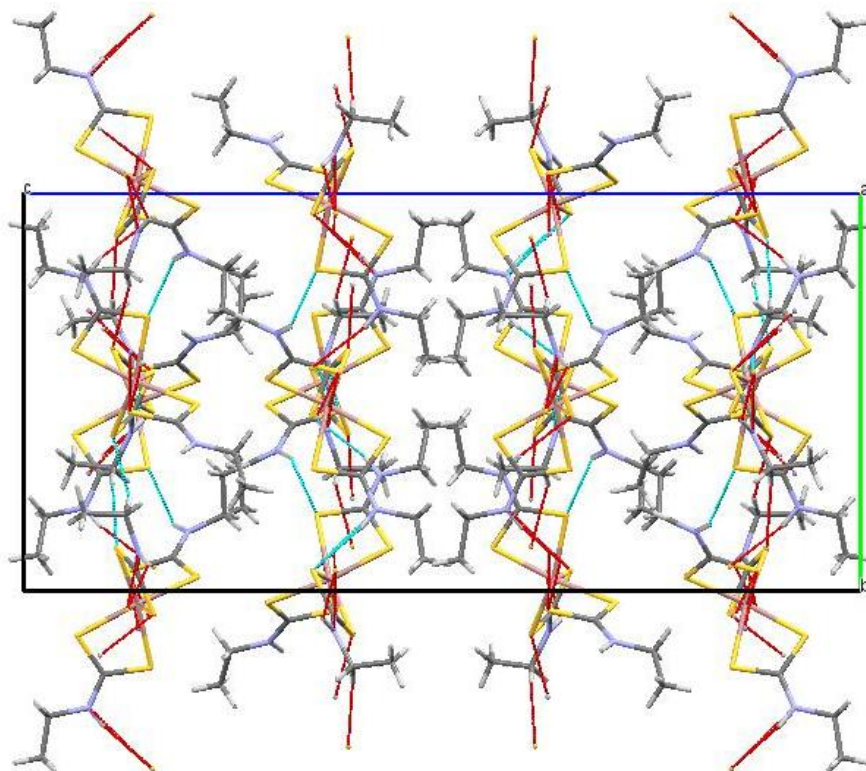


Fig. B27. Interazioni di non legame nel complesso $[\text{Ga}(\text{NHEt})_3]$.
In azzurro i legami a idrogeno, in rosso i contatti secondari di non legame.

Accettore	Donatore	Genitore ^a	Distanza A...D (Å)	Angolo A-D-G (°) ^b
S5	H1	N1	2.64	137.9
S7	H2	N2	2.63	138.0
S10	H4	N4	2.61	142.2

Tab. B6. Interazioni di non legame più efficienti nel complesso $[\text{Ga}(\text{NHEt})_3]$.

^a Atomo genitore del donatore nel contatto di non legame; ^b angolo accettore-donatore-genitore.

B3.2 Valutazione dell'attività biologica di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] nei confronti di cellule tumorali 2008 e LoVo.

L'attività citotossica determinata da una serie di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] è stata valutata nei confronti di cellule tumorali umane 2008 e LoVo mediante il test dell'MTT. In particolare le 2008 sono cellule di carcinoma ovarico sensibili al cis-platino mentre le LoVo sono una linea cellulare umana di adenocarcinoma colon-rettale.

L'MTT test è un test colorimetrico largamente utilizzato in diversi protocolli di *drug screening* per la determinazione dell'attività biologica di nuove sostanze come già riportato in Sezione A, pag. 139.

Le cellule, in terreno e in condizioni di crescita esponenziale, sono state seminate e trattate per 24 e 72 ore con concentrazioni crescenti dei complessi di gallio. Al termine dell'esposizione le cellule sono state trattate con MTT per 5 ore e poi lisate *overnight*. Le concentrazioni di formazano sono state determinate mediante lettura spettrofotometrica a 570 nm. I dati ottenuti sono stati elaborati al fine di ottenere i valori di IC₅₀ riportati in Tabella B7.

Composto	IC ₅₀ (μM) ± D.S.	
	LoVo	2008
[Ga(PDTC) ₃]	0.82±0.53	2.22±0.84
[Cu(DEDTC) ₃]	0.71±0.54	2.87±0.92
[Ga(DTC-L2) ₃]	0.98±0.23	2.94±1.03
[Ga(DTC-L4) ₃]	9.65±1.63	9.65±3.23
[Ga(DTC-L9) ₃]	14.22±2.29	17.42±2.74
[Ga(DTC-L16) ₃]	ND	ND
[Ga(DTC-L17) ₃]	7.15±1.97	6.45±2.34
[Ga(DTC-L22) ₃]	ND	ND
[Ga(DTC-L25) ₃]	29.32±3.64	37.51±2.97
[Ga(PIPE-1) ₃]	6.11±0.63	5.63±0.90
[Ga(DPDC) ₃]	2.56±0.84	4.32±1.04
[Ga(DPODC) ₃]	8.39±2.46	7.60±2.15
[Ga(CyH) ₃]	ND	ND
Cisplatino	9.34±2.38	2.22±1.65

Tab. B7. Valori di IC₅₀ di complessi del tipo [Ga(DTC-Ln)₃] nei confronti di cellule tumorali umane LoVo e 2008.

I valori di IC₅₀ sono stati calcolati mediante regressione non lineare logistica a quattro parametri (P < 0,05).

D.S. è la deviazione standard. ND = non determinato.

I risultati ottenuti indicano come in generale i complessi del tipo $[Ga(DTC-Ln)_3]$ presentano una attività citotossica migliore o paragonabile a quella del cis-platino nei confronti di cellule di adenocarcinoma colon-rettale LoVo mentre in cellule 2008 l'attività è spesso inferiore o nel migliore dei casi simile a quella del cis-platino.

In particolare i complessi $[Ga(DED)_3]$ e $[Ga(PDTC)_3]$, utilizzati come riferimento rispettivamente per la serie dei ditiocarbammati lineari e ciclici, risultano essere circa 10 volte più attivi rispetto al cis-platino nei confronti delle cellule LoVo, mentre hanno un'attività molto simile in cellule 2008.

Il complesso $[Ga(DTC-L2)_3]$ presenta un comportamento paragonabile al complesso di riferimento $[Ga(PDTC)_3]$ e quindi, in questo caso, la sostituzione dell'anello pirrolidinico con una piperidina non incide sull'attività citotossica del composto. La diversa natura dell'eterociclo legato all'azoto ditiocarbammico non porta, quindi, ad alcuna variazione dell'attività finale.

L'introduzione di sostituenti a livello dell'anello piperidinico determina invece una certa diminuzione (da 2.5 a 9 volte) dell'attività citotossica rispetto al complesso di riferimento come evidenziato nei casi di $[Ga(DTC-L17)_3]$. La presenza di sostituenti particolarmente ingombranti, caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico, in $[Ga(DTC-L9)_3]$ e $[Ga(DTC-L25)_3]$ causa, invece, una diminuzione tra le 8 e le 35 volte dell'attività. Anche la presenza di un anello piperazinico al posto della pirrolidina determina una diminuzione dell'attività da 3 a 11 volte rispettivamente nei casi di $[Ga(PIPE-1)_3]$ e $[Ga(DTC-L4)_3]$.

In tutti questi casi la diminuzione dell'attività citotossica determina anche la mancanza di una maggiore efficacia nei confronti di cellule LoVo rispetto a cellule 2008 come è invece riscontrato nel caso del complesso di riferimento $[Ga(PDTC)_3]$.

Per quanto riguarda i complessi con ditiocarbammati lineari, l'allungamento della catena laterale in $[Ga(DPDC)_3]$, dove il gruppo etilico del complesso di riferimento $[Ga(DED)_3]$ è sostituito da una catena propilica, comporta una perdita di attività limitata, di circa 2-3 volte. L'allungamento più significativo e la presenza di atomi di ossigeno in catena laterale causa invece, nel caso di $[Ga(DPODC)_3]$, una diminuzione più evidente, tra le 4 (per le cellule 2008) e le 10 volte (per le cellule LoVo).

Nei complessi in cui non è stato possibile determinare dei valori di IC_{50} si è probabilmente verificato un problema di solubilità nel terreno di coltura con conseguente microprecipitazione dei prodotti e l'ottenimento di risultati sottostimati e non riproducibili. Gli esperimenti dovranno essere quindi nuovamente effettuati modificando le condizioni di solubilità con la possibilità di aggiungere degli agenti solubilizzanti quali delle ciclodestrine.

In generale complessi del tipo $[Ga(DTC-Ln)_3]$ hanno dimostrato una buona attività citotossica, soprattutto nei confronti di cellule di adenocarcinoma colon-rettale LoVo. Dai dati raccolti sembra che la presenza di sostituenti ingombranti o di lunghe catene laterali a livello dell'azoto ditiocarbammico siano responsabili di

una diminuzione dell'attività. In quest'ottica è di sicuro interesse verificare l'attività biologica di complessi ottenuti con semplici ditiocarbammati derivati da ammina primaria quali $[\text{Ga}(\text{NHEt})_3]$ e $[\text{Ga}(\text{CyP})_3]$.

B3.4 Effetto del pH sulla formazione di complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$

Nella prospettiva di trasferire la chimica a livello di tracciante con ^{68}Ga è stata valutata la resa di reazione dei complessi di gallio in funzione del pH. Il comportamento in soluzione dello ione Ga^{3+} è, infatti, fortemente influenzato dal pH dal momento che già in condizioni moderatamente acide (pH 3-4) precipita sotto forma di $\text{Ga}(\text{OH})_3$ mentre a valori di pH superiori a 7 torna in soluzione grazie alla capacità di formare il complesso tetraidrossigallato ($[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$). Per questo motivo nei protocolli di sintesi in soluzione dei complessi radiomarcanti con ^{68}Ga è necessario lavorare in condizioni di pH decisamente acide, favorite dal fatto che lo stesso radioisotopo viene eluito dal generatore per mezzo di una soluzione acida (HCl 0.1 M). In alternativa, qualora i leganti utilizzati siano sensibili a condizioni estreme di pH, è possibile mantenere in soluzione lo ione $^{68}\text{Ga}^{3+}$ attraverso degli opportuni sistemi tampone che, pur determinando valori di pH più blandi, formano una sfera di coordinazione attorno al centro metallico. Il complesso così formato impedisce la precipitazione di $\text{Ga}(\text{OH})_3$ ma allo stesso viene facilmente coinvolto in una reazione di scambio dei leganti che porta alla formazione del radiocomposto desiderato. Un sistema tampone comunemente utilizzato a questo scopo nella sintesi di complessi a base di ^{68}Ga è il tampone acetato.

Nel caso dei complessi del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ è stata valutata in particolare la resa di formazione del complesso $[\text{Ga}(\text{DEDCC})_3]$ in funzione del pH per verificare le condizioni migliori da utilizzare quando la chimica di coordinazione verrà trasferita a livello di tracciante radioattivo. I diversi valori di pH testati sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di varie soluzioni tampone in grado di mantenere l'ambiente di reazione nelle condizioni desiderate.

I risultati ottenuti sono riportati in Figura B28.



pH	Resa %
3.5	0
5	54.4
6	84.2
6.8	84.6
9	39.5
10	0
13	0

Fig. B28. Effetto del pH sulla resa di formazione del complesso $[\text{Ga}(\text{DEDCC})_3]$.

Dai dati ottenuti è possibile evidenziare che valori estremi di pH, nonostante consentano al Ga^{3+} di rimanere in soluzione, impediscono la formazione del complesso. Tale comportamento è molto probabilmente dovuto all'instabilità intrinseca del legante ditiocarbammico a condizioni estremamente acide, con conseguente degradazione dello stesso in seguito alla protonazione dell'azoto con successiva liberazione di solfuro di carbonio e dell'ammina corrispondente, come già ricordato in Sezione A, pag. 150. Anche a valori di pH decisamente alcalini non si osserva la formazione del prodotto, e ciò probabilmente a causa della formazione del complesso tetraidrossigallato ($[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$), favorito dall'elevata concentrazione di ioni idrossido in soluzione. Le rese più elevate sono riscontrate invece a valori di pH ≈ 6 ottenuti grazie al tampone MES (morfolin-etansolfonato).

I risultati ottenuti indicano, quindi, che nel momento in cui si affronterà la sintesi dei complessi con il radioisotopo ^{68}Ga non sarà possibile lavorare a pH estremamente acidi che, pur mantenendo lo ione Ga^{3+} in soluzione, causano la degradazione del legante ditiocarbammico. Sarà invece necessario utilizzare un opportuno sistema tampone che consenta di lavorare a pH ≈ 6 evitando la degradazione del legante e allo stesso tempo la precipitazione del $\text{Ga}(\text{OH})_3$ ponendo in questo modo le basi per raggiungere elevate rese di marcatura.

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In questo lavoro sono stati sintetizzati e completamente caratterizzati una libreria di complessi neutri e simmetrici di Ga^{3+} del tipo $[\text{Ga}(\text{DTC-Ln})_3]$ con leganti ditiocarbammici, suddivisi nelle tre classi di riferimento dei ditiocarbammati ciclici, lineari e derivati da ammina primaria. Come materiale di partenza è stato impiegato gallio nitrato e sono state affrontate diverse vie sintetiche soprattutto per far fronte alle diverse caratteristiche di stabilità dei ditiocarbammati utilizzati. I composti ottenuti sono caratterizzati dalla presenza di tre leganti ditiocarbammici che coordinano il centro metallico ciascuno attraverso due atomi di zolfo per avere dei complessi a numero di coordinazione 6 e a sfera di coordinazione S_6 .

In tutti i casi i prodotti sono stati ottenuti in alta resa e sono stati ampiamente caratterizzati mediante analisi elementare, spettroscopia NMR, IR e diffrazione a raggi X. Le strutture cristallografiche ottenute evidenziano chiaramente che i complessi hanno una geometria trigonale prismatica e che la lunghezza del legame metallo-zolfo non è influenzata dalla presenza dei diversi sostituenti all'azoto ditiocarbammico.

Dal momento che la solubilità e la reattività del Ga^{3+} è fortemente influenzata dal pH, è stata valutata la resa di formazione del complesso $[\text{Ga}(\text{DEDC})_3]$ in funzione del pH. I risultati ottenuti sono concordi con il comportamento generale del gallio in soluzione e possono essere sfruttati per il trasferimento della chimica di coordinazione e livello di tracciante con ^{68}Ga dal momento che il radioisotopo viene eluito dal generatore con una soluzione acida (HCl 0.1 M) e necessita di un opportuno sistema tampone per rimanere in soluzione alle condizioni di pH necessarie per effettuare una reazione di marcatura.

Infine, è stata valutata l'attività biologica di alcuni dei complessi ottenuti nei confronti di cellule di adenocarcinoma umano colon-rettale (LoVo) e di carcinoma ovarico (2008). I risultati indicano che questa classe di composti, ed in particolare i complessi caratterizzati dalla presenza di ditiocarbammati i cui sostituenti all'azoto ditiocarbammico sono poco ingombranti, hanno una elevata attività citotossica fino ad un massimo circa 10 volte superiore a quella del cis-platino nei confronti delle cellule LoVo.

Sulla base dei risultati ottenuti, in prospettiva futura si procederà con la sintesi dei complessi con l'utilizzo dell'isotopo radioattivo ^{68}Ga e la valutazione delle caratteristiche di stabilità dei prodotti radiomarcati per verificare la possibile applicazione di questo sistema di coordinazione in ambito medico nucleare.

Inoltre, verrà valutata l'attività biologica nei confronti di linee cellulari tumorali dei complessi non ancora testati allo scopo di identificare in modo più preciso l'esistenza di una relazione tra l'attività citotossica riscontrata e la struttura dei leganti ditiocarbammici in modo tale da poter progettare in modo razionale la sintesi di nuovi leganti e dei relativi complessi.

Ringraziamenti:

Questo lavoro di ricerca è stato supportato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR): PRIN 20097FJHPZ-004 and FIRB RBAP114AMK

BIBLIOGRAFIA

1. Badawy R.D., *Phys. Educ.*, 2001, 36, 452-459.
2. Bradley D.C., *Prog. Stereochem.*, 1962, 3, 1,
3. N.N.Greenwood, *Adv.Inorg.Chem.Radiochem.*, 1963, 5, 91,
4. Foye W.O., *Principi di Chimica Farmaceutica*, Piccin, 1991, 921.
5. Jurisson S., Berning D., Jia W., Ma D., *Coordinations Compounds In Nuclear Medicine, Chemical Reviews*, 1993, 93, 1137-1156.
6. Funkhouser, J., *Curr. Drug Discovery* 2, 2002.
7. Kelkar S.S., Reineke T.M., *Bioconjugate chem.*, 2011, 22, 1879-1903
8. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., *Mol. Pharmaceutics*, 2008, 5, 505–515.
9. Prigodich, A.E., Seferos, D.S., Massich, M.D., Giljohann, D.A., Lane, B.C., Mirkin, C.A., *ACS Nano*, 2009, 3, 2147–2152.
10. Bryson, J.M., Fichter, K.M., Chu, W.J., Lee, J.H., Li, J., Madsen, L.A., McLendon, P.M., and Reineke, T.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106, 16913–16918.
11. Pan, D., Caruthers, S.D., Hu, G., Senpan, A., Scott, M.J., Gaffney, P.J., Wickline, S.A., and Lanza, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 130, 9186–9187.
12. Xie, J., Chen, K., Huang, J., Lee, S., Wang, J., Gao, J., Li, X., and Chen, X., *Biomaterials*, 2010, 31, 3016–3022.
13. Kim, J., Kim, H.S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I.C., Moon, W.K., and Hyeon, T. (2008), *Angew. Chem.*, 2008, Int. Ed. 47, 8438–8441.
14. Srivastava S.C., CME session number 63 Presented at 2009 SNM Annual Meeting, June 15, 2009, Toronto, Ontario, Canada
15. Herzog H., Rösch F., Stöcklin G., *J Nucl Med*, 1993, 34, 2222-2226
16. Srivastava, S.C., *Seminars in nuclear chemistry*, 2011
17. Peyrone M., *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 1844, 51,1–29.
18. Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H., *Nature* 1969; 222(5191) 385–386.
19. Galanski M., Jakupec M.J., Keppler B.K., *Current Med. Chem.* 2005, 18, 2075–2094.
20. Harrap K.R., *Cancer Treat Rev.* 1985, 12 (Suppl A), 21-33.

21. Gramont A., Finger A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., *Clin Oncol* 2000; 18, 2938-2947.
22. Jamieson E.R., Lippard S.J., *Chem. Rev.* 1999, 99, 2467–2498.
23. Appleton T.G., Hall J.R., Ralph S.F., Thompson C.S.M., *Inorg. Chem.* 1989, 28, 1989–1993.
24. Villani G., Hübscher U., Butour J.L., *Nucleic Acids Res.*, 1988; 16(10): 4407-4418
25. Meggers E., *Chem Comm*, 2009; 1001-10
26. Cohen S.M., *Curr Opin Chem Biol*, 2007; 11, 115-20
27. Ott I., Gust R., *Arch Pharm (Weinheim)*, 2007; 340: 117-26
28. Hambley T.W., *Dalton Trans*, 2007; 4929-37
29. Frezza M., Hindo S., Chen D., Davenport A., Schmitt S., Tomco, D., Dou, Q.P., *Curr. Pharm. Des.*, 2010, 16, 1813-1825
30. Fricker S.P., *Dalton Trans*, 2007; 4903-17
31. Haas K.L., Franz K.J., *Chem Rev*, 2009; 109: 4921-60
32. Matias A.C., Manieri T.M., Cipriano S.S, Carioni V.M.O., Nomura C.S., Machado C.M.L., Cerchiaro G., *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, 349 - 357
33. Orrenius S., Nobel C.S., van den Dobbelen D.J., Burkitt M.J., Slater A.F., *Biochem Soc Trans.*, 1996, 24 (4), 1032-8
34. Somers P.K., Medford R.M., Saxena U., *Free Radic. Biol Med.*, 2000, 28 (10), 1532-7
35. Malguarnera L., Pilastro M.R., Di Marco R., Scifo C., Renis M., Mazzarino M.C., Messina A., *Apoptosis* , 2003, 8 (5), 539 - 45
36. Akiyama A., Nabemoto M., Hatori Y., Nakamura H., Hirabayashi T., Fujino H., Saito T., Murayama T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006, 215, 218–227
37. Pabla N., Dong Z., *Kidney Int.*, 2008, 73, 994–1007.
38. Wang X., Guo Z., *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2007, 7, 19–34.
39. Dorr R.T., in *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy 2*
40. Borch R.F., Dedon P.C., Gringeri A., Montine T.J., in *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, ed. M. Nicolini, Martinus Nijoff Publishing, Boston, 1988, pp. 216–281.
41. Segovia N. , Crovetto G., Lardelli P., Espigares M., *J. Appl. Toxicol.*, 2002, 22, 353–357.
42. Ronconi L., Fregona D., *Dalton Trans.*, 2009, 10670-10680
43. Faraglia G., Fregona D., Sitran S., Giovagnini L., Marzano C., Baccichetti F., Casellato U., Graziani R., *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 83, 31–40
44. Osswald H., Frank N., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, 116, 448–452
45. Marzano C., Trevisan A., Giovagnini L., Fregona D., *Toxicol. in Vitro*, 2002, 16, 413–419

46. Tiekink E.R.T., *Inflammopharmacology*, 2008, 16, 138–142
47. Ronconi L., Maccato C., Barreca D., Saini R., Zancato M., Fregona D., *Polyhedron*, 2005, 24, 521–531
48. Giovagnini L., Ronconi L., Aldinucci D., Lorenzon D., Sitran S., Fregona D., *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 1588–1595
49. Ronconi L., Giovagnini L., Marzano C., Bettio F., Graziani R., Pilloni G., Fregona D., *Inorg. Chem.*, 2005, 44, 1867–1881
50. Bindoli A., Rigobello M.P., Scutari G., Gabbiani C., Casini A., Messori L., *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253, 1692–1707
51. Milacic V., Fregona D., Dou Q.P., *Histol. Histopathol.*, 2008, 23, 101–108
52. Ronconi L., Marzano C., Fregona D., *It. Pat.*, 0001347835, 2003
53. Rodemaker-Lakhoi J.M., Van Den Bongard D., Pluim D., Beijnen J.H., Schellens J.H.M., *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 3717–3727
54. Jakupec M.A., Arion V.B., Kapitza S., Reisner E., Eichinger A., Pongratz M., Marian B., Graf von Keyserlingk N., Keppler B.K., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, 43, 595–596
55. Giovagnini L., Sitran S., Castagliuolo I., Brun P., Corsini M., Zanello P., Zoleo A., Maniero A., Biondi B., Fregona D., *Dalton Trans.*, 2008, 6699–6708
56. Brewer G.J., *Exp. Biol. Med.*, 2001, 226, 665–673
57. Chen S.H., Lin J.K., Liang Y.C., Pan M.H., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y., *Eur J Pharmacol.*, 2008, 594 (1-3): 9-17
58. Cen D., Gonzalez R.I., Bukmeier J.A., Kahlon R.S., Tohidian N.B., Meyskens F.L., *J. Mol Cancer Ther.*, 2002, 1(3), 197 - 204
59. Cen D., Brayton D., Shahandeh B., Meyskens F.L., Farmer P.J., *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 6914-6920
60. Daniel K.G., Chen D., Orlu S., Cui Q.C., Miller F.R., Dou Q.P., *Breast cancer research*, 2005, 7 (6), 897- 908
61. Giovagnini L., Sitran S., Montopoli M., Caparrotta L., Corsini M.M., Rosani C., Zanello P., Dou Q.P., Fregona D., *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 6336-6343
62. Nagy, E.M., Sitran S., Montopoli M., Favaro M., Marchiò L., Caparrotta L., Fregona D., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 117, 131 - 139
63. Fichna J., Janecka A., *Bioconjugate Chem.*, 14, 3-17, 2003
64. Smith S.V., *J. Inorg. Biochem.*, 98, 1874-1901, 2004
65. Shokeen M., Anderson C.J., *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42 (7), 832-841
66. Anderson C.J., Ferdani R., *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2009,
67. Chen X., Sievers E., Hou Y., *Neoplasia*, 2005, 7, 271
68. Li W.P., Lewis J.S., Kim J., *Bioconjug Chem*, 2002, 13, 721

69. Moi M.K., Meares C.F., McCall M.J., *Anal Biochem*, 1985, 148, 249
70. Philpott G.W., Schwarz S.W., Anderson C.J., *J Nucl Med*, 1995, 36, 1818
71. Bass L.A., Wang M., Welch M.J., Anderson C.J., *Bioconjug Chem*, 2000, 11, 527
72. Sargeson A.M., *Coord Chem Rev*, 1996, 151, 89
73. Smith S.V., Waters D.J., DiBartolo N., *Radiochimica Acta*, 1996, 75, 65
74. Weisman G.R., Rogers M.E., Wong E.H., *J Am Chem Soc*, 1990, 112, 8604
75. Hubin T.J., Alcock N.W., Busch D.H., *Acta Crystallogr*, 2000, C56, 37
76. Wong E.H., Weisman G.R., Hill D.C., *J Am Chem Soc*, 2000, 122, 10561
77. Anderson C.J., Wadas T.J., Wong E.H., *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 52, 185
78. Sun X., Wuest M., Weisman G.R., *J Med Chem*, 2002, 45, 469
79. Sun X., Wuest M., Kovacs Z., *J Biol Inorg Chem*, 2003, 8, 217
80. Ferdani R., Stigers D.J., Sherman C.D., *J Radiolab Comp Radiopharm*, 2009, 52(suppl1), 56
81. Boswell C.A., Regino C.A., Baidoo K.E., *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 548
82. Bauer W., Briner U., Doepfner W., *Life Sci*, 1982, 31, 1133
83. Anderson C.J., Dehdashti F., Cutler P.D., *J Nucl Med*, 2001, 42, 213
84. De Jong M., Breeman W.A., Bakker W.H., *Cancer Res*, 1998, 58, 437
85. Sprague J.E., Peng Y., Sun X., *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 8674
86. Hynes R.O., *Cell*, 1992, 69, 11
87. Beer A.J., Schwaiger M., *Cancer Metast Rev*, 2008, 27, 631
88. Horton M.A., *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29, 721
89. Janssen M.L., Oyen W.J., Dijkgraaf I., *Cancer Res*, 2002, 62, 6146
90. Chen X., Park R., Tohme M., *Bioconjug Chem*, 2004, 15, 41
91. Shi J., Kim Y.S., Zhai S., *Bioconjug Chem*, 2009, 20, 750
92. Sprague J.E., Kitaura H., Zou W., *J Nucl Med*, 2007, 48, 311
93. Laskin J.J., Sandler A.B., *Cancer Treat Rev*, 2004, 30, 1
94. Fan Z., Masui H., Altas I., Mendelsohn J., *Cancer Res*, 1993, 53, 4322
95. Cai W., Chen K., He L., *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34, 850
96. Xue C.B., Voss M.E., Nelson D.J., et al., *J Med Chem*, 2001, 44, 2636
97. Banerjee H.N., Verma M., *Technol Cancer Res Treat*, 2008, 7, 149
98. Shokeen M., Fettig N.M., Rossin R., *Q J Nucl MedMol Imaging*, 2008, 52, 267
99. Lee H.Y., Li Z., Chen K., *J Nucl Med*, 2008, 49, 1371
100. Liu Z., Cai W., He L., *Nature Nanotechnology* , 2007, 2, 47
101. Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, et al. *Int J Radiat Biol* 2006;82:699.
102. Dearling JIJ, Lewis JS, McCarthy DW, Welch MJ, Blower PJ *Chem Commun* 1998:2531–2.

103. Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Konishi J, *J Nucl Med* 1997;38(7):1155–60.
104. Dearling JIJ, Lewis JS, Mullen GED, Welch MJ, Blower PJ. *J Biol Inorg Chem* 2002;7:249–59.
105. Lewis J.S., Laforest R., Dehdashti F., *J. Nucl. Med.*, 49, 1177–1182, 2008
106. Fujibayashi Y., Culter C.S., Anderson C.J., *Nucl. Med. Biol.*, 26, 117–121, 1999
107. Santini C., Pellei M., Gandin V., Porchia M., Tisato F., Marzano C., *Chem Rev.*, 2013
108. Labbe S., Thiele D.J. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 500.
109. Gupta S.K., Shukla V.K., Vaidya M.P., Roy S.K., Gupta S., *J.Surg. Oncol.*, 1991, 46, 178.
110. Brewer G., *J. Exp. Biol. Med.* 2001, 226, 665.
111. Badet J., Soncin F., Guitton J.D., Lamare O., Cartwright T., Barritault D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 8427.
112. Fialho A.M., Chakrabarty A.M., *Recent Pat. Anticancer Drug Discovery*, 2007, 2, 224.
113. Yoshii J., Yoshiji H., Kuriyama S., Ikenaka Y., Noguchi R., Okuda, H.; Tsujinoue, H.; Nakatani, T.; Kishida, H.; Nakae, D.; Gomez, D. E.; De Lorenzo, M. S.; Tejera, A. M.; Fukui, H. *Int. J. Cancer* 2001, 94, 768.
114. Teknos, T.N., Islam M., Arenberg, D.A., Pan Q., Carskadon, S. L.; Abarbanell, A. M.; Marcus, B.; Paul, S.; Vandenberg, C. D.; Carron, M.; Nor, J. E.; Merajver, S. D. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2005, 131, 204.
115. Rosu, T.; Pahontu, E.; Pasculescu, S.; Georgescu, R.; Stanica, N.; Curaj, A.; Popescu, A.; Leabu, M. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 1627.
116. Yuan, J.; Lovejoy, D. B.; Richardson, D. R. *Blood* 2004, 104, 1450.
117. Belicchi-Ferrari, M.; Bisceglie, F.; Pelosi, G.; Tarasconi, P., *Polyhedron* 2008, 27, 1361.
118. Zhang, H.; Thomas, R.; Oupicky, D.; Peng, F. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008, 13, 47.
119. Puszeko, A.; Brzuszkiewicz, A.; Jezierska, J.; Adach, A.; Wietrzyk, J.; Filip, B.; Pelczynska, M.; Cieslak-Golonka, M. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 1109.
120. Rao, P. R.; Kumar, K. G.; Narayanan, M. C. *Asian J. Sci. Res* 2008, 1, 176.
121. Tan, M.; Zhu, J.; Pan, Y.; Chen, Z.; Liang, H.; Liu, H.; Wang, H. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2009, 347872.
122. Tan, J.; Wang, B.; Zhu, L. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009, 14, 727.
123. Singh, R.; Jadeja, R. N.; Thounaojam, M. C.; Devkar, R. V.; Chakraborty, D. *Transition Metal Chem.* 2012, 37, 541.
124. Pellei, M.; Papini, G.; Trasatti, A.; Giorgetti, M.; Tonelli, D.; Minicucci, M.; Marzano, C.; Gandin, V.; Aquilanti, G.; Dolmella, A.; Santini, C. *Dalton Trans.* 2011, 40, 9877.
125. Martinez-Alanis, P. R.; Ortiz, M. L.; Regla, I.; Castillo, I. *Synlett*, 2010, 423.
126. Filomeni, G.; Piccirillo, S.; Graziani, I.; Cardaci, S.; Da Costa Ferreira, A. M.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. *Carcinogenesis* 2009, 30, 1115.

127. Duran Pachon, L.; Golobic, A.; Kozlevcar, B.; Gamez, P.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta* 2004, 357, 3697.
128. Qiao, X.; Ma, Z.-Y.; Xie, C.-Z.; Xue, F.; Zhang, Y.-W.; Xu, J.-Y.; Qiang, Z.-Y.; Lou, J.-S.; Chen, G.-J.; Yan, S.-P. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 728.
129. Yang, X.-T.; Wu, H.; Ma, S.-J.; Hu, J.-J.; Wang, Y.-m. *Transition Metal Chem.* 2011, 36, 403.
130. Alemon-Medina, R.; Brena-Valle, M.; Munoz-Sanchez, J. L.; Gracia-Mora, M. I.; Ruiz-Azuara, L. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007, 60, 219.
131. Trejo-Solis, C.; Palencia, G.; Zuniga, S.; Rodriguez-Ropon, A.; Osorio-Rico, L.; Luvia, S. T.; Gracia-Mora, I.; Marquez-Rosado, L.; Sanchez, A.; Moreno-Garcia, M. E.; Cruz, A.; Bravo-Gomez, M. E.; Ruiz-Ramirez, L.; Rodriguez-Enriquez, S.; Sotelo, J. *Neoplasia* 2005, 7, 563.
132. Kumar, A.; Chinta, J. P.; Ajay, A. K.; Bhat, M. K.; Rao, C. P. *Dalton Trans.* 2011, 40, 10865.
133. Marzano, C.; Gandin, V.; Pellei, M.; Colavito, D.; Papini, G.; Gioia Lobbia, G.; Del Giudice, E.; Porchia, M.; Tisato, F.; Santini, C. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 798.
134. Eichhorn, G. L.; Shin, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 7323.
135. Selvakumar, B.; Rajendiran, V.; Stoekli-Evans, H.; Palaniandavar, M. *J. Inorg. Biochem.* 2006, 100, 316.
136. Koppenol, W. H. *Redox Rep.* 2001, 6, 229.
137. Kremer, M. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1999, 1, 3595.
138. Qin, Y.; Meng, L.; Hu, C.; Duan, W.; Zuo, Z.; Lin, L.; Zhang, X.; Ding, J. *Mol. Cancer Ther* 2007, 6, 2429.
139. Hall, I. H.; Taylor, K.; Miller, M. C.; Dothan, I. I. I.; Khan, X.; Bouet, M. A. *Anticancer Res.* 1997, 17, 2411.
140. Zeglis, B. M.; Divilov, V.; Lewis, J. S. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 2391.
141. Ikotun, O. F.; Higbee, E. M.; Ouellette, W.; Doyle, R. P. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1254.
142. Peters, J. M.; Franke, W. W.; Kleinschmidt, J. A. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 7709.
143. Goldberg, A. L. *Science* 1995, 268, 522.
144. Drexler, H. C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 855.
145. Hindo, S. S.; Frezza, M.; Tomco, D.; Heeg, M. J.; Hryhorczuk, L.; McGarvey, B. R.; Dou, Q. P.; Verani, C. N. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4353.
146. Santini, C.; Pellei, M.; Papini, G.; Morresi, B.; Galassi, R.; Ricci, S.; Tisato, F.; Porchia, M.; Rigobello, M. P.; Gandin, V.; Marzano, C. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 232.
147. Gandin, V.; Pellei, M.; Tisato, F.; Porchia, M.; Santini, C.; Marzano, C. *J. Cell. Mol. Med.* 2012, 16, 142.
148. Burger, A. M.; Fiebig, H.-H. In *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*; Figg, W. D., McLeod, H. L., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2004.

149. Hancock, C. N.; Stockwin, L. H.; Han, B.; Divelbiss, R. D.; Jun, J. H.; Malhotra, S. V.; Hollingshead, M. G.; Newton, D. L. *Free Radical Biol. Med.* 2011, 50, 110.
150. Carvallo-Chaigneau, F.; Trejo-Solis, C.; Gomez-Ruiz, C.; Rodriguez-Aguilera, E.; Macias-Rosales, L.; Cortes-Barberena, E.; Cedillo-Pelaez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; Constantino-Casas, F. *BioMetals* 2008, 21, 17.
151. Raman, N.; Jeyamurugan, R.; Senthilkumar, R.; Raj Kapoor, B.; Franzblau, S. G. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 5438.
152. Bolzati C., Salvarese N., Carta D., Refosco F., *J. Bio Inorg Chem*, 16, 137-155, 2011
153. Giovagnini L., Sitran S., Montopol M., Caparrotta L., et al., *Inorg. Chem.*, 47, 6336-6343, 2008
154. D.T. Vistica, P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, M. R. Boyd, *Cancer Res.* 1991, 51(10), 2515- 2550
155. Sarwar M., Ahmad S., *Transition Metal Chemistry*, 32, 199-203, 2007
156. Frezza M., Hindo S., Chen D., et al., *Current Pharmaceutical Design*, 16, 1813-1825, 2010
157. Giovagnini L., Sitran S., Montopol M., Caparrotta L., et al., *Inorg. Chem.*, 47, 6336-6343, 2008
158. Scanlon, K.J., Kashani S.M., Tone T., Funato T., *Pharmacol. Ther.*, 1991, 52(3), 385-406
159. Kelland L.R., Barnard C.F., Mellish K.J., Jones M., Goddard P.M., Valenti M., Bryant A., Murrer B.A., Harrap K.R., *Cancer Res.*, 1994, 54(21), 5618-22
160. Price K.A., Crouch P.J., Volitakis I., Paterson B.M., Donnelly P.S., White A.R., *Inorg. Chem.*, 2011, 50, 9594-9605
161. Puig S., Lee J., Lau M., Thiele D.J., *J Biol Chem*, 2002;277:26021–26030.
162. Illing A.C., Shawki A., Cunningham C.L., Mackenzie B., *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(36), 30485-30496
163. Tardito S., Bassanetti I., Bignardi C., Elviri L., Tegoni M., Mucchino C., Bussolati O., Franchi-Gazzola R., Marchio L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 6235-6242, 133, 2011
164. T.J. Wadas, E.H. Wong, G.R. Weisman, C.J. Anderson, *Chem Rev.* 2010, 110(5): 2858–2902
165. M.D. Bartholoma, A.S. Louie, J.F. Valliant, J. Zubieta, *Chem. Rev.* 2010, 110, 2903–2920
166. L. Brenstein *Pharmacological reviews* 1998 Vol. 50, No. 4
167. G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, *Coordination Chemistry Reviews* 253 (2009) 56-77
168. M. Fani, J. P. Andre, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging* 2008, 3, 53.
169. Y. Sun, C.J. Anderson, T.S. Pajean, D.E. Reichert, R.D. Hancock, R.J. Motekaitis, A.E. Martell, M.J. Welch, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 458-470.
170. E. Arslantas, P.M. Smith-Jones, G. Ritter, R.R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 19, 3979.
171. N.A. Viola, R.S.J. Rarig, W. Ouellette, R.P. Doyle, *Polyhedron* 25 (2006)3457.

172. K.P. Eisenwiener, M.I. Prata, I. Buschmann, H.W. Zhang, A.C. Santos, S.Wenger, J.C. Reubi, H.R. Macke, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 530. (da cambiare Pool at. all 2008; Fani et al 2008))
173. M. Gabriel, C. Decristoforo, D. Kendler, G. Dobrozemsky, D. Heute, C. Uprimny, P. Kovacs, E. Von Guggenberg, R. Bale, I. J. Virgolini, *The Journal of Nuclear Medicine*, vol 48, n4, 2007
174. J. Hoffend, W. Mier, J. Schuhmacher, K. Schmidt, A. Dimitrakopoulou-Strauss, L.G. Strauss, M. Eisenhut, R. Kinscherf, U. Haberkorn, *Nucl.Med. Biol.* 32 (2005) 287
175. S. C. Novick, T. N. Julian, S. Majuru, M. Mangelus, B. D. Brown, B. Mehta, R.P. Jr. Warrel, *J. Clin Oncol.* 2008; vol 26, 8592
176. M.M. Finnegan, T.G. Lutz, W.O. Nelson, A. Smith, Orvig, C. *Inorg. Chem.* 1987, 26, 2171–2176.
177. P. Collery, J. L. Domingo, B. K. Keppler, *Anticancer Res.* 1996, 16, 687–691.
178. M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q.P. Dou, *Current Pharmaceutical Design*, 2010, 16, 1813-1825
179. F. Silva, F. Marques, *Journal of inorganic Biochemistry* 104 (2010) 523-532
- A. Dobrov, V.B. Arion, N. Kandler, W. Ginzinger, M.A. Jakupec, A. Rufin'ska, G.N. von Keyserlingk, M. Galanski, C. Kowol, B.K. Keppler, *Inorg. Chem.* 2006, 45, 1945–1950
180. V.B. Arion, M.A. Jakupec, M. Galanski, P. Unfried, B.K. Keppler, *Journal of Inorganic Biochemistry* 91 (2002) 298–305
181. C. Bolzati, N. Salvatorese, D. Carta, F. Refosco, N. Morellato, H. J. Pietzch, R. Bergmann, G. Bandoli, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010, 16, 137 - 155.
182. M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, *Cancer Res.*, 1988, 48 (3), 589-601.
183. C.K. Johnson, ORTEP, Report ORNL–5138, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, **1976**.
184. K. Dymock, G.J. Palenik, J. Slezak, C.L. Raston, A.H. White, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1976**, 28 (REFCODE: EDTCGA); S. Bhattacharya, N. Seth, D.K. Srivastava, V.D. Gupta, H. Noth, M. Thomann-Albach, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 2815 (REFCODE: TISFOQ); E.M. Gordon, A.F. Hepp, S.A. Duraj, T.S. Habash, P.E. Fanwick, J.D. Schupp, W.E. Eckles, S. Long, *Inorg. Chim. Acta*, **1997**, 257, 247 (REFCODE: NIGJUI); X. Zhou, M.L. Breen, S.A. Duraj, A.F. Hepp, *Main Group Met. Chem.*, **1999**, 22, 35 (REFCODE: UCIGAO); U. Abram, S. Ritter, *Private Communication*, **2000** (REFCODE: EDTCGA01); D.P. Dutta, V.K. Jain, A. Knoedler, W. Kaim, *Polyhedron*, **2002**, 21, 239 (REFCODE: XIJHED)
185. F.H. Allen, *Acta Cryst.*, **2002**, B58, 380–388; Cambridge Structural Database (Version 5.34 of November 2012 + 3 updates).