



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE
CHIMICHE**

Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff"

Laboratorio Interdipartimentale di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine

SINTESI DI RADIOTRACCIANTI PEPTIDICI
MODIFICATI CON TETRAAZAMACROCICLI
VIA CLICK-CHEMISTRY PER LO SVILUPPO DI
METODOLOGIE DIAGNOSTICHE PER
IMMAGINI

Relatore:

Prof.ssa Anna Maria Papini

Tesi di Laurea di:

Lorenzo Traversi

Correlatore:

Dott.ssa Debora D'Addona

Anno Accademico 2010/2011

Sommario

1. Introduzione	3
1.1 Diagnosi e terapia dei tumori tramite uso di analoghi della somatostatina radio marcati.....	7
1.2 Coniugazione di BFCA (<i>Bifunctional Chelating Agent</i>) in posizione N-terminale di analoghi della Somatostatina.....	12
2. Presupposti della ricerca	15
2.1 Click chemistry.....	15
2.2 Il gruppo 1,2,3 triazolico e il legame ammidico.....	16
3. Scopo della ricerca	17
4. Sviluppo della ricerca	18
4.1 Sintesi di N ^α -Fmoc-ω-azido-α-amminoacidi.....	18
4.2 Sintesi peptidica su fase solida.....	20
4.2.1 Procedura generale per la sintesi peptidica su fase solida.....	24
4.3 Click chemistry.....	26
4.3.1 Click Chemistry: strategia su resina.....	26
4.3.2 Click Chemistry: strategia in soluzione.....	27
5. Conclusioni	28
6. Parte sperimentale	29
6.1 Materiali e metodi.....	29
6.2 Sintesi di N ^α -Fmoc-ω-azido-α-amminoacidi.....	30
6.2.1 Metodo A.....	30
6.2.2 Metodo B.....	31
6.3 Sintesi peptidica su fase solida.....	32
6.3.1 Procedura generale per SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) su sintetizzatore manuale.....	32
6.3.2 Procedura generale per la deprotezione, il distacco dalla resina e la purificazione dei peptidi.....	33
6.3.3 Procedura generale per la ciclizzazione dei peptidi in soluzione.....	33
6.4 Click chemistry.....	34
6.4.1 Sintesi di DOTATOC tramite click chemistry catalizzata da Cu(0).....	34
6.4.2 Sintesi di DOTATOC simili tramite click chemistry catalizzata da Cu(I).....	35
6.4.3 Sintesi di DOTATOC tramite click chemistry catalizzata da Cu(II).....	37
7. Sigle ed abbreviazioni	39
8. Riferimenti bibliografici	40

1. Introduzione

In ogni sistema sanitario, il trattamento medico inizia inevitabilmente con una fase diagnostica che permette una cura ottimale dei pazienti. Tra le malattie per cui non sia ancora stata trovata una cura efficace, se non in alcuni casi specifici, c'è il cancro. La cura dei tumori (qualunque sia la loro origine) richiede un ambiente ad alta tecnologia destinato, in primo luogo a localizzare e identificare con precisione i tessuti tumorali. In questo modo la terapia potrebbe essere applicata al paziente in modo specifico e la sua efficacia può essere valutata in maniera puntuale. Le tecniche di *imaging* utilizzate in oncologia per la valutazione diagnostica e prognostica finalizzata anche a verificare l'efficacia di trattamenti terapeutici si basano su metodi d'indagine, tra i quali si possono citare la Risonanza Magnetica (RM), la Tomografia Computerizzata (TC), la Positron Emission Tomography (PET), la Tomografia ad emissione di singolo fotone (SPECT) e metodi di *imaging* ottico.

Con la contemporanea evoluzione di queste tecniche e la riduzione dei costi operativi, l'*imaging* come tecnica diagnostica risulta sempre più diffusa. In questo contesto ad esempio il numero di analisi PET in Francia è aumentato da 8000 nel 2002 a 140'000 nel 2007. Questi numeri aumenteranno irreversibilmente nei prossimi anni con lo scopo di gestire sempre più pazienti nelle primissime fasi dello sviluppo del cancro. Dal rapporto Airtum del 2011 emerge che nel nostro Paese la sopravvivenza dei malati di tumore è in crescita, quello che fa più riflettere è la permanenza di una grossa differenza tra Centro-Nord e Sud che varia tra i 4 e i 10 punti percentuali in relazione ai diversi tumori indagati. Questo divario era già noto, ma ora l'affermazione è rafforzata dall'aumentata rappresentatività dei registri del Sud, il cui numero negli ultimi anni è raddoppiato, passando da 4 a 8.

Se si considera l'insieme di tutti i tumori (esclusi quelli della vescica e cutanei), la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi dei malati oncologici in Italia è pari al 50% per gli uomini e al 60% per le donne.

Questo dato è superiore alla media europea ed è simile a quello registrato nei Paesi scandinavi, mentre è inferiore a quello degli Stati del Nord America.

Tra il 1990 e il 2007 il periodo di permanenza in vita dei malati di cancro è aumentato del 14% per gli uomini e del 9% per le donne. Questo importante miglioramento permane anche a distanza di 10 e 15 anni dalla diagnosi.

La sopravvivenza a 5 anni per i tumori di maggiore impatto sociale mostra che a fianco di neoplasie a buona prognosi permangono ancora tumori a prognosi infausta:

- la sopravvivenza è alta per alcune sedi tumorali quali tiroide (94%), mammella della donna (87%), prostata (89%),cervice uterina (61%) e colon-retto (58%);
- è inferiore al 50% per le leucemie (43%) e il tumore dello stomaco (29%);
- ed è al di sotto del 20% per fegato (14%) e polmone (13%).

Negli uomini la sopravvivenza a 5 anni è di circa 10 punti percentuali più bassa rispetto a quella delle donne. Nella gran parte dei tumori maligni la sopravvivenza appare inversamente proporzionale all'età . L'Istat ha recentemente pubblicato i nuovi dati sulle cause di morte in Italia nel 2007. Il 38% dei decessi ha come causa principale le malattie del sistema circolatorio come seconda causa di morte invece ci sono i tumori con il 30%. Ovviamente, la gran parte delle persone che muoiono sono molto anziane, ed e' interessante verificare quali sono i tassi di mortalità per le due principali cause di morte per età. (Figura 1 e Figura 2)

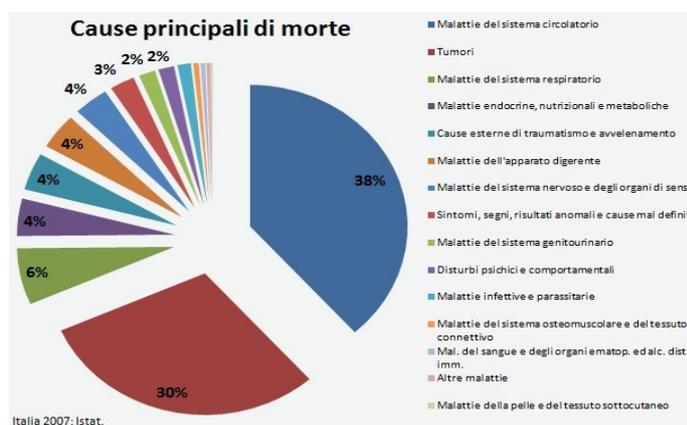


Figura 1 Dati ISTAT sulle principali cause di morte in Italia.

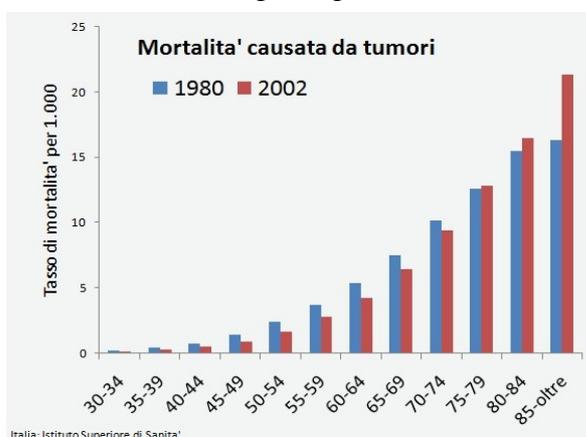


Figura 2. Mortalità causata da tumori.

Ad oggi si ritiene che una PET possa essere sufficiente per una popolazione di circa 500-600.000 abitanti, nel prossimo futuro, con l'introduzione delle nuove indicazioni e di nuovi farmaci dalle prospettive interessanti, appare sensato pensare che il bacino di utenza per sostenere una PET sarà ampiamente ridotto intorno ai 250-300.000 abitanti.¹

Recenti studi di mercato sottolineano che il mercato statunitense ed europeo dei radiofarmaci per la cura e la diagnosi delle malattie oncologiche, nefrologiche, neurologiche e altre malattie infettive dovrebbe raggiungere nel 2015 i 5,4 miliardi di dollari. La crescita del mercato dovrebbe essere particolarmente importante per i radiofarmaci utilizzati per la diagnosi, in risposta alle attività di ricerca fatta dalle industrie farmaceutiche per lo sviluppo di nuove molecole anti-cancro. Questa statistica mostra l'importanza crescente che l'*imaging* medico avrà nei prossimi anni.

Per soddisfare queste esigenze, è fondamentale continuare a mettere a frutto gli sforzi intrapresi in questi ultimi anni dalla comunità scientifica in settori di ricerca multidisciplinari applicata alla diagnostica per immagini.

In termini di miglioramento della qualità della vita del paziente i progressi scientifici nel campo delle tecniche di diagnostica per immagini riguardano vari aspetti. Il personale medico sarà in grado di proporre ai pazienti trattamenti personalizzati. Inoltre si potrà contare su nuovi strumenti di *imaging* per comprendere in modo più efficiente gli effetti dei trattamenti somministrati e il medico potrà essere in grado di prendere le migliori decisioni sulla base dei risultati delle tecniche diagnostiche nel *follow up* della malattia. La velocità e la precisione delle tecniche di *imaging* avrà anche effetti positivi sui costi operativi negli ospedali. I tempi ridotti di visite mediche si tradurranno in soggiorni più brevi in ospedale per i pazienti, una maggiore disponibilità di apparecchiature di *imaging* e di posti letto per altri pazienti, maggiore numero di pazienti presi in carico ed infine un migliore rapporto tra costi operativi medico / efficienza medica.

Nell'ambito della diagnostica e terapia dei tumori una sfida per biologi, chimici e clinici è quello di sviluppare strumenti semplici in grado di localizzare e trattare tumori umani in fase precocissima di sviluppo. Circa 15 anni fa, alcuni peptidi endogeni sono stati riconosciuti quali molecole idonee a soddisfare le esigenze dei ricercatori. Molti peptidi endogeni sono stati studiati quindi come potenziali farmaci per il trattamento dei tumori. I peptidi, e più in particolare quelli endogeni, possiedono caratteristiche che li rendono ideali per essere studiati quali nuovi strumenti diagnostici e terapeutici. Tra queste caratteristiche si possono citare la loro bassa antigenicità, la loro rapida *clearance* tissutale e la penetrazione nei tessuti tumorali. Inoltre, da un punto di vista chimico, possono essere prodotti velocemente anche su in larga scala, da personale specializzato

con tecniche automatizzate. Infine, dato che l'azione in vivo di peptidi endogeni è generalmente mediata dalla loro interazione con i loro recettori specifici, utilizzare molecole peptidiche permette un miglior controllo della selettività per i tessuti tumorali. Inoltre l'alta affinità del ligando per il recettore facilita l'accumulo del radiomarcato nel tumore, mentre le sue dimensioni relativamente ridotte facilitano la rapida *clearence* dal sangue.

Grazie al miglioramento nella comprensione della farmacologia, biologia e delle caratteristiche genetiche dei tumori, alcuni peptidi sono stati riconosciuti come molecole eccellenti per individuare sistemi biologici coinvolti nella progressione, nella metastasi e nell'angiogenesi del tumore.

L'*imaging* molecolare gioca un ruolo essenziale nel bilanciare i benefici clinici e i rischi della terapia basata su radionuclidi peptidici.

Per un efficace trattamento di singoli pazienti, una valutazione attenta della biodistribuzione, del dosaggio e della tossicità del radio farmaco è essenziale.

Radiopeptidi selettivi per specifici sistemi recettoriali sono stati individuati come un'importante classe di radiofarmaci da utilizzare per la diagnosi e la terapia di tumori che sovraesprimono specifici recettori sulla membrana cellulare.

La marcatura di tali peptidi con radionuclidi γ emettitori permette la visualizzazione del tumore quando si legano agli specifici recettori. Peptidi marcati con β -emettitori possono essere usati invece in terapia.

Nella Tabella 1 sono elencate le caratteristiche dei radionuclidi comunemente utilizzati per *l'imaging* e la terapia.

radionuclide	radiation	energy (keV)	half-life
^{99m}Tc	γ radiation	140	6.01 h
^{111}In	γ (+Auger electrons)	172 and 247 (+25 (maximum) for Auger)	2.8 days
^{68}Ga	positrons	1920 (maximum)	68 min
^{18}F	positrons	635 (maximum)	110 min
^{90}Y	β particles	2281 (maximum)	2.7 days
^{177}Lu	β particles (+ γ radiation)	430 (maximum) (+113 and 208 for γ)	6.7 days

Tabella 1. *Caratteristiche dei radionuclidi utilizzati per l'imaging e la terapia*

1.1 Diagnosi e terapia dei tumori tramite uso di analoghi della somatostatina radio marcati.

Peptidi marcati con γ -emettitori per SPECT (Single-photon emission computed tomography) (^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$) o emettitori di positroni per PET (positron-emission tomography) (^{68}Ga e ^{18}F) permettono la visualizzazione di tessuti su cui sono espressi in modo non invasivo: una tecnica riferita al PRI (peptide receptor imaging). Invece i peptidi marcati con emettitori β (^{90}Y e ^{177}Lu) hanno il potenziale per sradicare i tessuti su cui sono espressi: un approccio riferito al PRRT (peptide receptor radionuclide therapy). Un analogo peptidico marcato con un radionuclide diagnostico è usato in *imaging* per selezionare i pazienti che trarranno beneficio dalla terapia del radionuclide; questa soluzione è basata sull'elevato assorbimento da parte del tumore e sul favorire il rapporto tra le cellule malate e quelle non malate. Il radionuclide o un suo analogo marcato con un radionuclide terapeutico è usato per la successiva radioterapia. Il concetto di individuare tramite l'utilizzo di peptidi radiomarcanti i recettori espressivi delle cellule tumorali *in vivo* ha provato la sua validità e il suo valore soprattutto tramite gli analoghi della somatostatina radiomarcanti, i quali sono stati i primi e i più usati peptidi applicati per l'*imaging* e la terapia ⁱⁱ

Gli analoghi della somatostatina radiomarcanti sono stati applicati con successo nella PRI e PRRT di GEP-NET (neuroendocrini gastroenteropancreatici). L'*imaging* molecolare con radiopeptidi può visualizzare i tumori primari e le possibili lesioni metastatiche e può dare un aiuto nella grande variabilità di recettori espressivi nelle lesioni tumorali.

La somatostatina o somatotropina SRIF (Figura 3) è un importante regolatore della secrezione endocrina ed esocrina.

SRIF induce i suoi effetti biologici inibitori, su una famiglia di strutture costituite da proteine G accoppiate a recettori transmembrana (SSTR); ne esistono cinque tipi diversi e sono situati nella pituitaria, nel pancreas, nel tratto gastrointestinale, nella tiroide e nelle cellule immunitarie.ⁱⁱⁱ

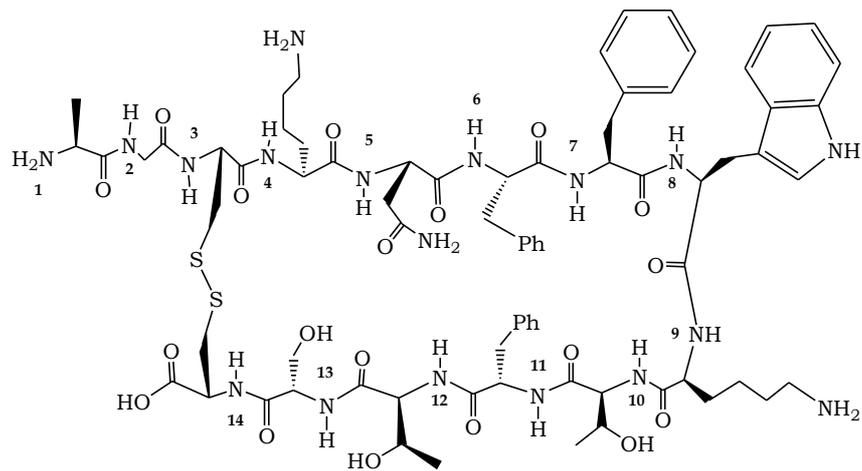


Figura 3. *Somatostatina*

Il *pattern* di secondi messaggeri che seguono all'interazione della somatostatina con i suoi sottotipi recettoriali è molto complesso ed è descritto nella Figura 4.

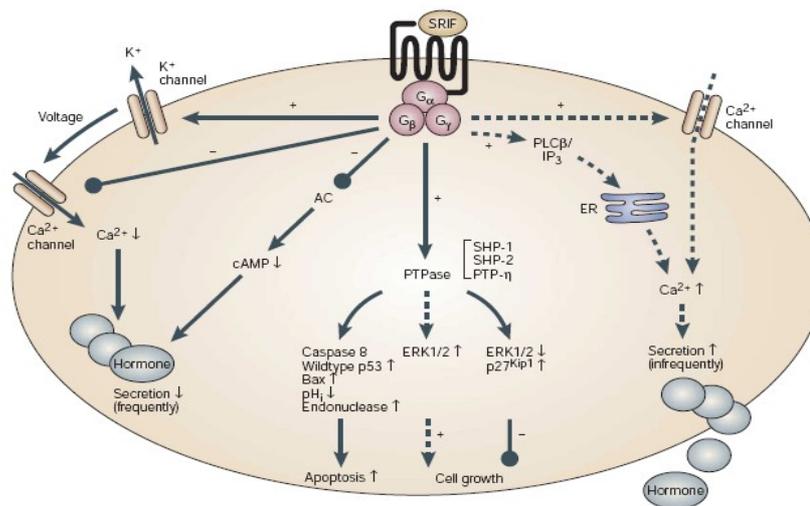


Figura 4. *Schema della cascata del segnale^{iv}*

I tumori GEP-NET sovraesprimono i recettori della somatostatina che quindi sono un *target* ottimale per la terapia e la diagnosi di questa tipologia di tumori. Molti trials clinici hanno evidenziato che il trattamento con analoghi della somatostatina è associato ad una stabilizzazione della malattia ad un' aumentata aspettativa di vita del paziente.

La somatostatina endogena (somatostatina-14, somatostatina-28) si lega con alta affinità a tutti i sottotipi recettoriali. Tuttavia, l'uso clinico dell'ormone nativo è limitato dalla sua breve emivita (circa 2 minuti) causata dalla sua rapida degradazione proteolitica nel plasma^v.

Negli ultimi trent'anni sono stati sintetizzati molti analoghi della somatostatina con sequenze peptidiche accorciate per tentare di migliorare la farmacocinetica dell'ormone nativo. La coniugazione di questi analoghi con radionuclidi o con sistemi che possono chelare radionuclidi ha aperto le porte all'utilizzo di questi analoghi della somatostatina come radioterapici e radiodiagnostici.

L'ottapeptide ciclico, Tyr³-octeotride (Figura 5) radio-marcato con ¹²³I è stato il primo analogo della somatostatina utilizzato per l'*imaging in vivo* di tumori positivi ai recettori SST. In questo analogo il radionuclide è direttamente legato al residuo di tirosina in posizione 3.^{vi}

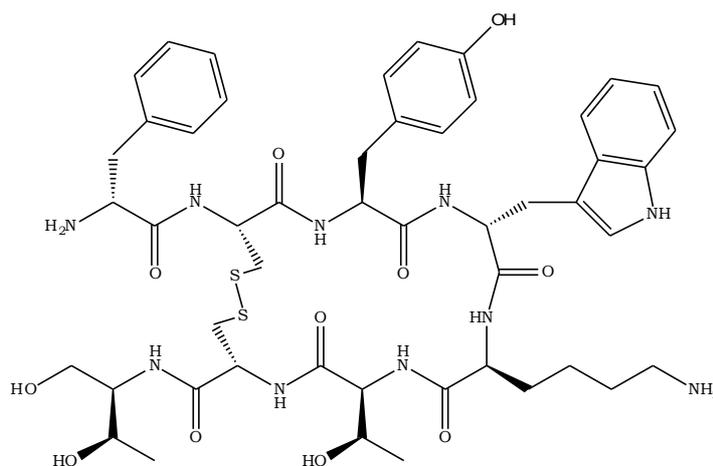


Figura 5. Tyr³-Octreotide

[¹²³I]-Tyr³-octeotride che dava una buona immagine di alcuni tumori, ma la significativa escrezione epatobiliare ne ha limitato l'uso.

Più recentemente, sistemi in grado di chelare radionuclidi sono stati ancorati nella posizione N-terminale degli analoghi della somatostatina. Nella maggior parte dei casi il chelante è un agente bifunzionale (BFCA), come il DTPA (acido 1,4,7 triazoeptano-1,1,4,7,7 pentaacetico) o DOTA (acido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano-1,4,7,10 tetraacetico) (Figura 6).

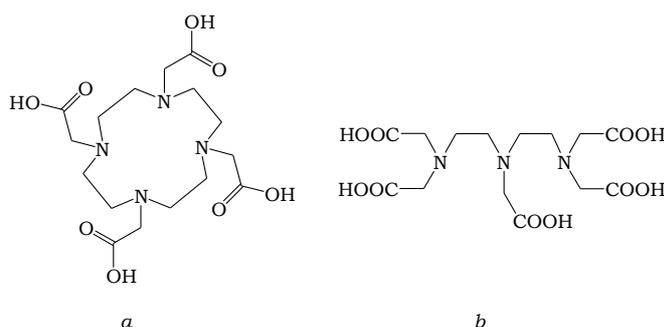


Figura 6. DOTA (a) e DTPA (b)

La ricerca di un migliore analogo radiomacato della somatostatina ha portato allo sviluppo del DTPA-octeotide (Figura 7).

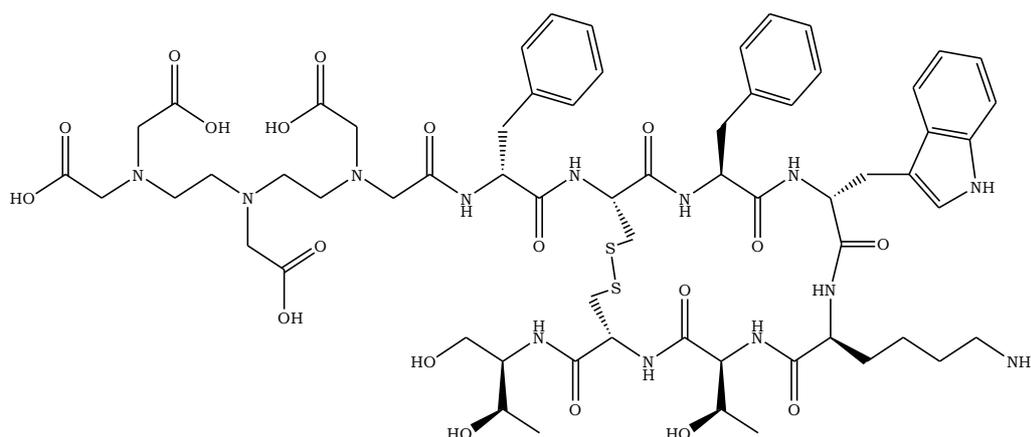


Figura 7 [DTPA]-octreotide

L'utilità del chelante DTPA, accoppiato covalentemente agli analoghi della somatostatina, permette di complessare in maniera ottimale e specifica ^{111}In ; questa peculiarità consente di utilizzarlo nella SPECT. ^{111}In -[DTPA D-Phe¹]-octreotide è stato il primo radiopeptide usato in studi clinici su pazienti: si è rivelato un buon agente per applicazioni nell'*imaging* dei tumori che esprimono i SSTR. E' diventato uno strumento importante per la loro visualizzazione, in particolare per i tumori gastropancreatici che presentano un'elevata densità di recettori SST. ^{111}In -OctreoScan è ora disponibile in commercio come OctreoScan® e utilizzato di *routine* nella procedura clinica per la localizzazione del tumore primario, per la valutazione dell'estensione della malattia, per il monitoraggio del trattamento e per la selezione dei pazienti da sottoporre alla terapia.^{vii}

La generazione successiva di analoghi modificati della somatostatina è costituita dagli analoghi che usano come BFCA il DOTA il quale forma complessi stabili termodinamicamente e cineticamente con una varietà di radio-metalli ottimali per PRI e PRRT: [^{111}In] per SPECT, [^{68}Ga] per PET, [^{90}Y] e [^{177}Lu] per PRRT.

Analoghi della somatostatina che usano come agente chelante il DOTA hanno dimostrato una migliore biodistribuzione rispetto agli analoghi con DTPA. La scintigrafia dei recettori della somatostatina che usa analoghi coniugati a BFCA è il metodo attualmente più sensibile per la localizzazione di tumori primari e delle metastasi nel tumore endocrino del pancreas e nell'insulinoma^{viii}.

Il recente sviluppo di tecnologia ibrida permette di ottenere informazioni dalla visualizzazione simultanea di immagini anatomiche, tramite tomografia computerizzata (CT), e funzionali, tramite tomografia computerizzata a emissione di singoli fotoni

(SPECT) oppure tomografia a emissione di positroni (PET), con un grande impatto sull'accuratezza diagnostica. Un notevole sforzo è stato fatto negli ultimi anni per sviluppare SPECT e PET, basandosi sugli analoghi della somatostatina capaci di colpire diversi sottotipi di recettori e sviluppando peptidi per altri tumori per poter migliorare ulteriormente le capacità diagnostiche o terapeutiche.

Dei numerosi analoghi della somatostatina solo pochi mostrano un potenziale uso clinico, tra questi quello attualmente più studiato è il [Tyr³]-octreotide. Questo peptide è stato coniugato con il macrociclo DOTA che, come abbiamo detto poco prima, permette la marcatura stabile con una serie di radiometalli (¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ecc) producendo una serie di radioleganti che sono molto utili per la SPECT, PET o per la terapia con radionuclidi. Recentemente [DOTA, Tyr³] octreotide (DOTA-TOC) (Figura 8) è stato usato per la sua affinità specifica verso i recettori sst2 e sst5 che sono quelli maggiormente espressi sui tumori. Studi clinici effettuati con DOTA-TOC radiomarcato hanno dimostrato che questo composto è efficace sia per l'*imaging* (ovvero, ¹¹¹In-DOTA-TOC e ⁶⁸Ga-DOTA-TOC), che per la terapia del radionuclide (⁹⁰Y-DOTA-TOC).

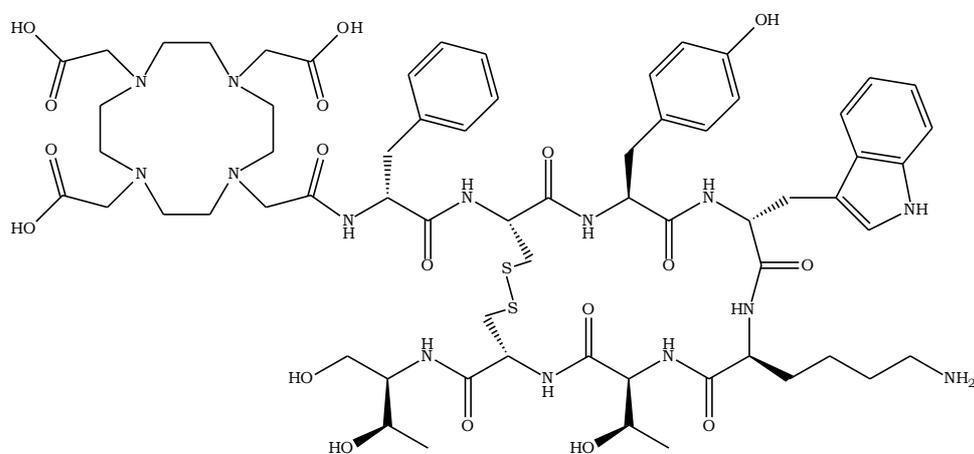


Figura 8. *DOTA-TOC*

Inoltre è stato osservato che la conversione dell'octeotride in octeotrate (modificando la funzione C-terminale Thr(olo), con treonina Thr) porta ad un aumento di selettività recettoriale, un migliore assorbimento da parte del tumore ed un notevole miglioramento della scintigrafia.

Nonostante che DTPA-octerotide e DOTA-TOC siano degli ottimi analoghi in clinica si sente ancora l'esigenza di trovare nuovi e più potenti analoghi che risolvano i problemi ad oggi riscontrati con gli analoghi sviluppati.

1.2 Coniugazione di BFCA (*Bifunctional Chelating Agent*) in posizione N-terminale di analoghi della Somatostatina

Come precedentemente descritto, il primo analogo radiomarcato della somatostatina ad essere studiato ed utilizzato in studi clinici nei primi anni novanta fu lo [^{123}I]-Tyr³-octeotride^{ix} che però presentava vari svantaggi quali per esempio la rapida *clearance* e la necessità di produrre il radioisotopo con il ciclotrone.

Per risolvere gli svantaggi di questo radiofarmaco gli analoghi della somatostatina sono stati coniugati con il *bifunctional chelating agent* (BFCA) DTPA. Lo scopo era di marcare la molecola mediante una procedura semplice con ^{111}In . Nella maggior parte dei casi il DTPA veniva legato alle proteine tramite i gruppi $\epsilon\text{-NH}_2$ dei residui di lisina. Questo metodo non era applicabile nel caso degli analoghi della somatostatina in cui il residuo di Lys⁵ è fondamentale per il *binding* recettoriale e quindi non poteva essere impegnato per la coniugazione. Per gli analoghi della somatostatina infatti il sito di coniugazione è nella quasi totalità dei casi l' $\alpha\text{-NH}_2$ del residuo N-terminale. Per coniugare in modo specifico il BFCA in posizione N-terminale evitando addotti sul residuo di Lys⁵ inizialmente veniva sfruttata la diversa pK_a degli NH_2 . Questo metodo portava ad ottenere dei sottoprodotti difficili da purificare. Con lo studio più approfondito e con la sintesi di nuovi amminoacidi protetti da utilizzare in SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis), la Lys⁵ degli analoghi veniva introdotta durante la sintesi peptidica, protetta in $\epsilon\text{-NH}_2$ ortogonalmente e deprotetta solo dopo la coniugazione in soluzione del peptide con il DTPA⁴⁰. Venne sintetizzato seguendo questa strategia il [^{111}In]-[DTPA D-Phe¹]-octreotide.

Successivamente, all'inizio degli anni 2000, il DOTA venne usato come BFCA coniugato a vari peptidi poiché conferiva migliori doti di bio-distribuzione e internalizzazione nelle cellule tumorali ai coniugati. Il DOTA infatti può chelare una grande varietà di radionuclidi, in quanto forma complessi molto stabili con vari ioni M^{2+} e M^{3+} tra cui la maggior parte dei radio-metalli utilizzati in medicina nucleare come ^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In e ^{177}Lu . Così il DOTA è attualmente utilizzato per la derivatizzazione e la radiomarcatura di molecole bioattive, impiegate nelle tecniche di *imaging* non invasive *in vivo* e nelle applicazioni terapeutiche. Inizialmente la coniugazione del DOTA sul peptide seguiva la stessa procedura sintetica adottata per il DTPA, sfruttando dunque la protezione ortogonale di Lys⁵ e l'ancoraggio in soluzione del BFCA⁴⁰.

La recente sintesi del *tris-tBu-DOTA* (Figura 9) e la sua disponibilità commerciale, hanno permesso la coniugazione del DOTA al peptide durante le normali procedure di

accoppiamento durante la SPPS con strategia Fmoc/tBu. Oltre a questo sintone molti altri derivati protetti e non protetti del DOTA sono stati descritti per la coniugazione di questo BFCA sia a peptidi che a proteine o ad anticorpi monoclonali (MAbs). Tuttavia, la maggior parte di questi sintoni si basa su gruppi ortogonali tra loro cioè, che si deproteggono con procedure diverse durante la SPPS.

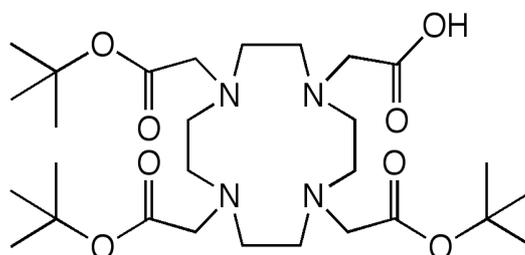


Figura 9. Sintone *tris-tBu-DOTA*

Negli ultimi anni sono state esplorate nuove strategie sintetiche per la coniugazione, che non richiedono protezioni ortogonali.

Le condizioni da rispettare nella reazione di accoppiamento sono la velocità, la chemoselettività, ed un' elevata efficienza. Una reazione che risponde a queste esigenze è la click-chemistry.^x

L'introduzione della reazione di cicloaddizione 1,3 dipolare catalizzata da Cu(I) tra gruppi alchilici ed azidici (reazione di Huisgen)^{xi, xii, xiii}, consente di ottenere un ponte 1,2,3 triazolico 1,4 disostituito, aprendo nuove possibilità di sintesi per un gran numero di biomolecole. Infatti questa reazione, considerata prototipo di "Click chemistry"^{xiv, xv}, è estremamente versatile. Azide e alchini sono relativamente facili da introdurre nelle molecole, ed inoltre sono scarsamente reattivi nei confronti di altri gruppi funzionali che possono essere presenti durante la sintesi.

Il meccanismo della reazione è descritto in (Figura 10).^{xvi}

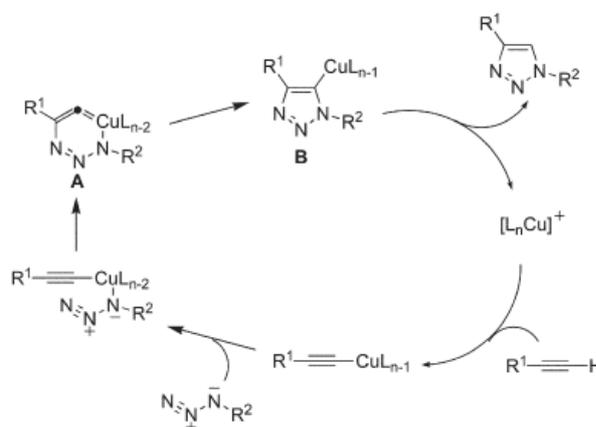


Figura 10. Meccanismo della ciclo-addizione di Huisgen¹³

Questo tipo di reazione ha caratteristiche di chemoselettività e stereospecificità, che la rendono particolarmente adatta per la sintesi di nuovi analoghi della somatostatina.

A tale scopo uno dei gruppi carbossilici del DOTA è stato funzionalizzato con un *linker* che porta un gruppo alchिनico all'estremità (Figura 11). L'octeotride è stato invece funzionalizzato all'estremità N-terminale con un gruppo azidico. La cicloaddizione rame catalizzata ha portato successivamente all'ottenimento del 1,2,3 triazolo 1-4 disostituito a ponte tra il DOTA e l'octeotride ¹³.

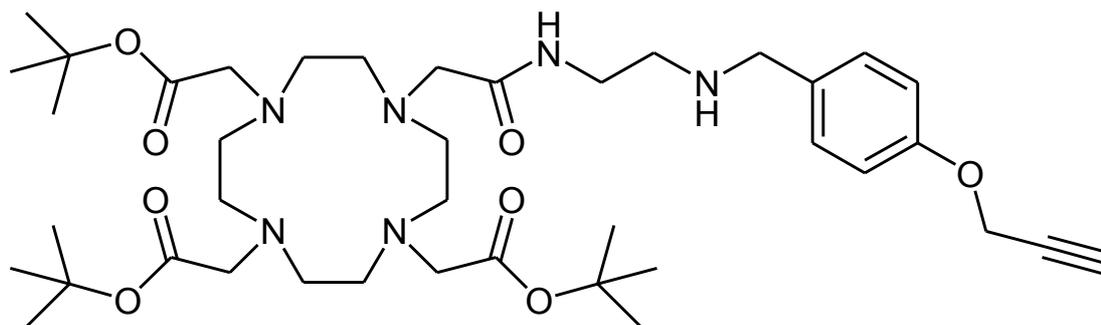


Figura 11. *DOTA funzionalizzato con un gruppo alchिनico.*

Nome IUPAC: 1,4,7-Tris(1,1-dimethylethyl)-10-[2-oxo-2-[[2-[4-(2-propyn-1-yloxy)phenylmethyl]amino]ethyl]amino]ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate.

Il vantaggio di questo tipo di reazione è duplice in quanto, da un punto di vista sintetico non ha necessità di protezioni ortogonali, mentre da un punto di vista metabolico conferisce stabilità al legame peptide-BFCA. Infatti il triazolo è stabile in ambiente proteolitico a differenza del legame ammidico comunemente utilizzato per la coniugazione.

Come sarà descritto in seguito però anche la cicloaddizione di Huisgen catalizzata da Cu(I) presenta dei limiti da un punto di vista sintetico. Su questa problematica si è basato il mio lavoro di tesi.

2. Presupposti della ricerca

2.1 Click chemistry

Con l'espressione "*Click chemistry*" si intende un intero gruppo di reazioni nelle quali vengono sintetizzate nuove molecole unendo insieme piccole unità attraverso il legame con un eteroatomo (C-X-C)¹³.

Ci sono una serie di requisiti che una reazione deve rispettare per poter risultare utile in questo contesto:

- blande condizioni di reazione;
- resa molto elevata;
- formazione di prodotti secondari che non interferiscano con il prodotto e che possano essere eliminati senza dover usare metodi cromatografici;
- stereospecificità (ma non necessariamente enantioselettività);
- elevato contributo termodinamico favorevole (generalmente superiore a 20 kcal/mol).

Tra le reazioni più interessanti che rientrano nella definizione di "*click chemistry*", vi sono le reazioni di cicloaddizione che coinvolgono eteroatomi, come ad esempio la Diels-Alder e, la cicloaddizione 1,3-dipolare che permette la formazione di eterocicli a cinque e sei termini. Ha suscitato un'attenzione particolare la cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen, che prevede la reazione tra alchini e azidi con formazione di un triazolo (Figura 12).

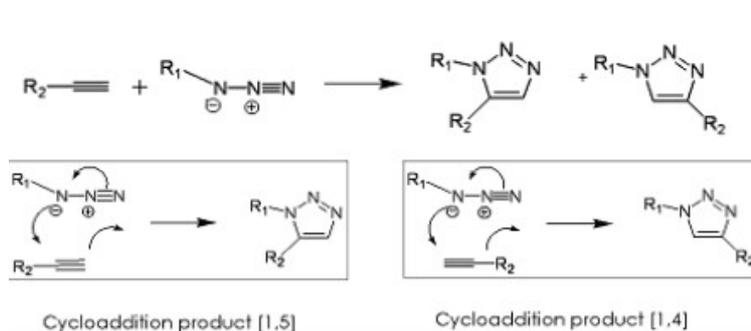


Figura 12. *Formazione di un 1,2,3-triazolo per cicloaddizione 3+2 tra un'azide e un alchino*

La chimica della funzione azide e alchino è completamente ortogonale a quella di tutti i gruppi funzionali presenti sugli amminoacidi naturali delle proteine. Normalmente la cicloaddizione tra azidi e alchini è condotta in toluene a refluxo, portando a ottenere una miscela dei regioisomeri 1,4 e 1,5. Tuttavia proteine e peptidi non sono in grado di rimanere inalterati in condizioni così drastiche. Inoltre l'ottenimento di una miscela di prodotti limita l'applicazione di questa reazione nello sviluppo di peptidomimetici.

Sharpless¹³ e Meldal¹³, hanno sviluppato un metodo efficace che prevede condizioni blande per ottenere selettivamente 1,2,3-triazoli 1,4-disostituiti, sfruttando una reazione catalizzata da Cu(I) in presenza di H₂O. Questo è stato possibile anche grazie all'elevata stabilità delle azidi nei confronti di acqua e ossigeno. Tale reazione è detta cicloaddizione azido-alchino rame-catalizzata (*Copper catalysed azide alkyne cycloaddition*, CuAAC) o anche cicloaddizione di Huisgen rame-catalizzata.

Successivamente Sharpless e collaboratori hanno anche messo a punto una cicloaddizione alchino-azido catalizzata da rutenio (*Ruthenium catalysed azide alkyne cycloaddition*, RuAAC), che consente la sintesi selettiva di triazoli 1,5 disostituiti, ma che prevede condizioni che non rispettano i requisiti della *click chemistry* descritti precedentemente^{xvii,xviii,xix,xx}.

2.2 Il gruppo 1,2,3 triazolico e il legame ammidico

Il gruppo 1,2,3-triazolico rappresenta un buon isostero del legame peptidico, grazie alle sue caratteristiche strutturali ed elettroniche. In particolare il triazolo 1,4 disostituito è mimetico del legame ammidico trans, mentre l'1,5 disostituito del legame cis (Figura 13)^{xxi}.

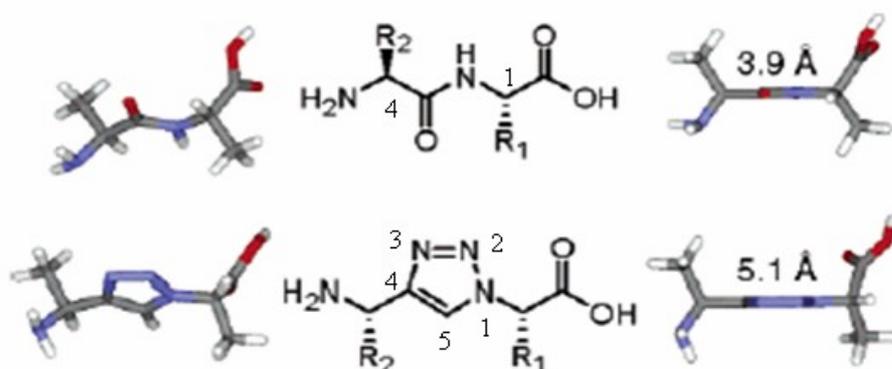


Figura 13. Similitudini tra ammidi e 1,2,3-triazoli

Infatti il triazolo è planare, possiede un forte momento dipolare e presenta siti che possono funzionare come accettori di legame a H (doppietti di N2 e N3). Tuttavia vi sono alcune piccole differenze; in particolare nel triazolo 1,4 disostituito i due sostituenti si trovano ad una distanza di 5.1 Å, equivalente al 25% in più della distanza tra due atomi di C separati da un legame ammidico di tipo trans (3.9 Å). Inoltre il triazolo presenta un momento dipolare leggermente più grande (circa 5 Debye) che seziona il piano dell'anello vicino agli atomi C5 ed N3. Ad ogni modo il triazolo ha il vantaggio, rispetto al legame peptidico, di essere stabile metabolicamente nei confronti della scissione proteolitica. Inoltre l'incorporazione all'interno dello scheletro peptidico dell'eterociclo in forma 1,4 o 1,5 disostituita, consente di ottenere peptidomimetici sia di tipo lineare che di tipo ripiegato, stabilizzando diversi tipi di strutture secondarie quali α -eliche e β -turn. Tali considerazioni rendono evidente l'utilità di questo gruppo come *linker* rigido sia per l'ottenimento di ciclopeptidi, sia nella coniugazione di BFCA a molecole bioattive.

3. Scopo della ricerca

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la CuAAC (*Copper catalysed azide alkyne cycloaddition*), per la coniugazione di analoghi del DOTA con il Tyr³-octeotride, tramite formazione di un ponte 1,2,3- triazolico 1,4 disostituito.

L'utilizzo di questa strategia nella sintesi di coniugati contenenti tetraazamacrocicli, presenta una notevole limitazione derivante dall'impiego del Cu(I). Infatti il Cu(I), ossidandosi facilmente a Cu(II), viene complessato stabilmente dal DOTA. Questo impedisce la successiva complessazione del radionuclide.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di risolvere questa problematica.

Il metodo fino ad ora utilizzato da vari autori per eliminare il Cu²⁺ dal macrociclo prevedeva di far precipitare il metallo con Na₂S^{xxii}. Tuttavia questa tecnica ha delle limitazioni. Il trattamento con solfuro di sodio del DOTA-Tyr³-octeotride, infatti, rischia di rompere il ponte a disolfuro che stabilizza il peptide ciclico. Inoltre si hanno problemi enormi in fase di purificazione dal momento che si formano dei sali insolubili solo parzialmente eliminabili tramite precipitazione da acqua.

Durante il mio lavoro di tesi ho sintetizzato, una serie di amminoacidi non naturali α NH₂-Fmoc- ω -N3-amminoacidi, con diverse lunghezze della catena laterale:

- acido 5-azido-2(R)-amminopentanoico,

- acido 6-azido-2(R)-amminoesanoico,
- acido 4-azido-2(R)-amminotetranoico,

Gli α NH₂-Fmoc- ω -N₃-amminoacidi sono stati introdotti in posizione N-terminale per l'ottenimento di tre peptidi analoghi del Tyr³-octreotide.

Sono state esplorate durante questo lavoro di tesi varie condizioni di reazione per l'ottenimento dell'1,2,3-triazolo 1-4 disostituito, allo scopo di elaborare una strategia di sintesi applicabile ogni qual volta si voglia coniugare tramite CuAAC un BFCA a un peptide modificato.

Questo lavoro di tesi ha perciò permesso di definire le migliori condizioni di reazione per la coniugazione di azamacrocicli DOTA simili a peptidi di interesse biologico riducendo tempi di reazione e fasi di purificazione rispetto alle strategie già applicate in questo campo.

Infatti i tempi di reazione sono stati ridotti da 18 ore ^{xxiii,xxiv} ad 1 ora e 30 minuti. La purificazione dei peptidi è stata effettuata direttamente tramite RP-HPLC semipreparativa evitando il trattamento con Na₂S che pregiudica la stabilità del ciclopeptide.

4. Sviluppo della ricerca

4.1 Sintesi di N ^{α} -Fmoc- ω -azido- α -amminoacidi

Comunemente, un modo per introdurre un gruppo azidico in una molecola consiste nella formazione di un legame C-N, generalmente attraverso una sostituzione nucleofila da parte dello ione azide. Questo approccio, tuttavia, nonostante abbia avuto grande successo, in alcuni sistemi può dare problemi, quali la formazione di prodotti di eliminazione o di prodotti con una non corretta configurazione stereochimica. Un metodo alternativo, efficiente e conveniente per generare azidi organiche è la reazione di diazo-*transfer* catalizzata Cu(II) catalizzato sulle corrispondenti ammine primarie tramite azide trifluorometansolfonica. ^{xxv,xxvi,xxvii,xxviii} Questa reazione è vantaggiosa in quanto può essere sottoposta a *scale-up* con elevate rese, utilizza dei reagenti facilmente reperibili in commercio e non richiede condizioni anidre. Inoltre dato che la trasformazione non coinvolge in alcun modo il C ^{α} , si verifica la completa ritenzione della configurazione a questo livello. Inizialmente questa strategia, che permette di ottenere tutti gli ω -azido- α -amminoacidi necessari, è stata applicata usando come

prodotti di partenza gli aminoacidi N^α-Boc protetti, a causa della loro stabilità nelle condizioni di reazione previste (Figura 14). Ciò però richiede due ulteriori passaggi, nei quali prima l'N^α-Boc-ω-azido-amminoacido viene deprotezionato in condizioni acide, dopo di che il gruppo amminico viene protetto con lo Fmoc usando Fmoc-succinimide (Fmoc-O-Su).

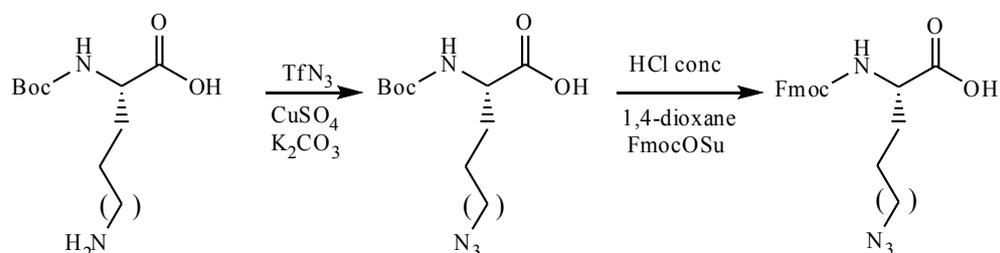


Figura 14. Sintesi di ω-azido-α-amminoacidi basata sull'uso di azide triflica

Successivamente si è osservato che in realtà anche partendo direttamente dall'amminoacido N^α-Fmoc protetto si ottengono rese paragonabili, in quanto anche se si lavora in un ambiente basico solo una piccola parte del gruppo Fmoc si deprotegge. La quantità di amminoacido che si deprotegge va più o meno ad eguagliare la perdita di prodotto che si verifica durante le fasi di deprotezione sia del gruppo Boc che Fmoc e , per cui i due metodi di fatto si equivalgono. Si consideri comunque che l'amminoacido N^α-Fmoc protetto di partenza può portare un gruppo Boc come protezione sul gruppo ω-amminico (ad esempio Fmoc-L-Orn-Boc e Fmoc-L-Lys-Boc); in questi casi è stato necessario deproteggere il gruppo -NH₂ in ambiente acido prima di dare inizio alla reazione di *diazo-transfer*. Nonostante questa reazione presenti numerosi vantaggi, è comunque associata a diverse problematiche, innanzitutto legate alla natura del reagente. Difatti l'azide triflica (TfN₃) è una sostanza esplosiva e molto instabile, per cui deve essere sintetizzata estemporaneamente da anidride triflica (Tf₂O) e sodio azide (NaN₃). Inoltre la sintesi di TfN₃ avviene con una resa piuttosto bassa e questo rende necessario l'utilizzo di un notevole eccesso della soluzione, mentre l'allontanamento dell'amide triflica che si forma come prodotto secondario può richiedere operazioni di *work-up* piuttosto complesse. Infine c'è da considerare l'elevato costo dell'anidride triflica usata come composto di partenza, che di fatto limita l'applicazione di questa reazione su larga scala. Una possibile alternativa a TfN₃ come agente di *diazo-transfer* è rappresentata dall'imidazolo-1-solfonil-azide-idrocloruro. Infatti il gruppo imidazolo-1-solfonato (imidazolato) ha una reattività molto simile al metansolfonato, ma i suoi derivati sono in genere più stabili e meno costosi da preparare.

La sintesi di questo reattivo è inoltre relativamente semplice e presenta una resa elevata (72%): prevede l'aggiunta di circa 2 equivalenti di imidazolo ad una soluzione di clorosolfonilazide in CH₃CN, ottenuta in situ da NaN₃ e solfonilcloruro (Figura 15).

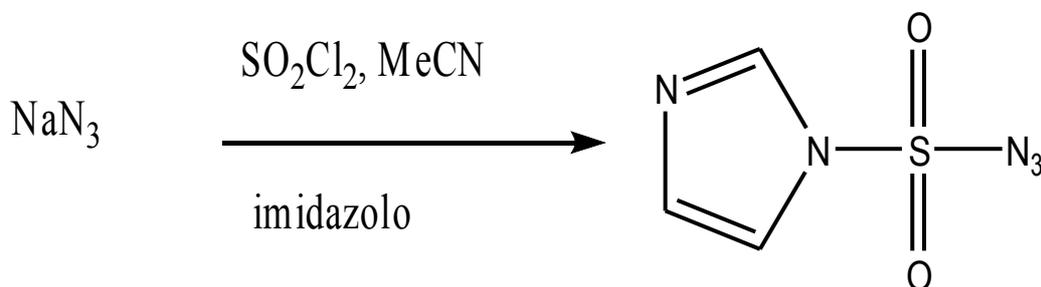


Figura 15. Sintesi dell'imidazolo-1-solfonil-azide.

L'imidazolo-1-solfonil-azide come tale è un liquido incolore, per cui è preferibile ottenerne il cloridrato, che invece è un solido cristallino conservabile, trattando il prodotto con HCl in EtOH.^{xxix} Anche questo agente di *diazo-transfer*, come l'azide triflica, è stato applicato alla sintesi degli ω-azido-α-amminoacidi in condizioni di catalisi da parte di Cu^{II}. In questo caso la reazione è stata portata avanti a partire dall'amminoacido N^α-Fmoc protetto e si è rivelata molto rapida e con buone rese.

4.2 Sintesi peptidica su fase solida

I peptidi lineari sono stati ottenuti tramite *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS). Tale tecnica sintetica si basa sull'idea di usare un supporto solido insolubile sul quale accrescere la catena peptidica dal gruppo carbossilico terminale verso il gruppo amminico terminale (strategia C → N), contrariamente a quanto avviene nella biosintesi dei peptidi nei ribosomi. La sintesi viene effettuata attraverso una serie di passaggi, ripetuti ciclicamente, che prevedono l'accoppiamento (*coupling*) di amminoacidi parzialmente protetti e preliminarmente attivati sui gruppi carbossilici, e si conclude con l'eliminazione dei gruppi protettori durante il distacco del peptide dalla resina (*cleavage*) (Figura 16).

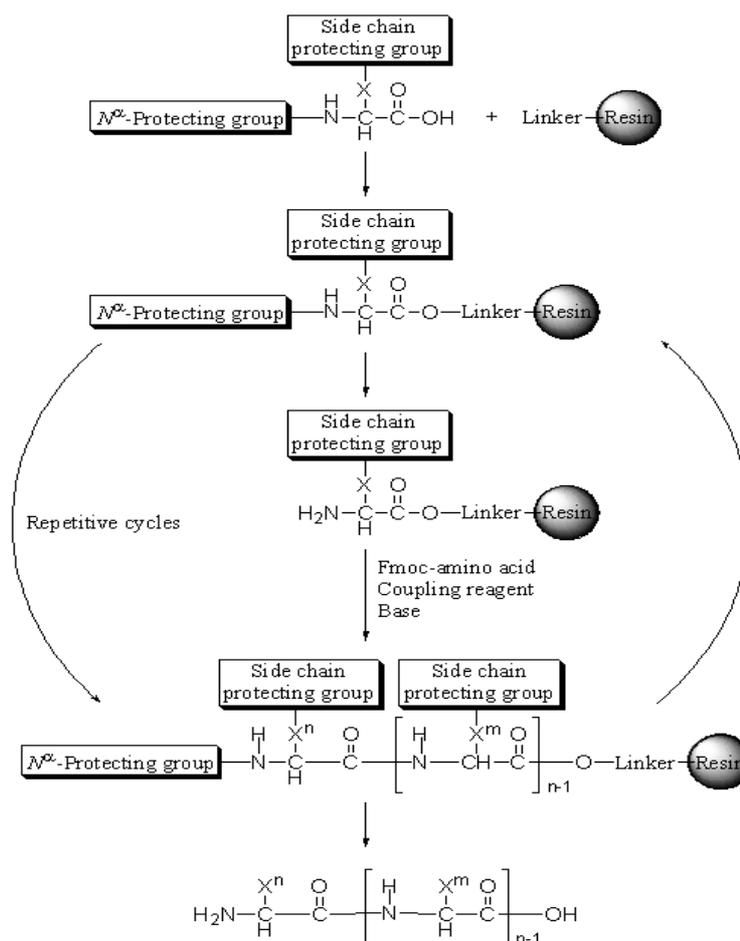


Figura 16 Procedura generale di SPPS

I supporti solidi utilizzati in SPPS devono essere insolubili in tutti i solventi usati durante la sintesi, chimicamente inerti e fisicamente stabili alle sollecitazioni meccaniche. Nonostante l'impossibilità di isolare gli intermedi, la resa nell'accoppiamento degli aminoacidi è molto elevata grazie alla possibilità di utilizzare un grande eccesso di reagenti, inoltre i sottoprodotti che si formano possono essere rimossi per semplice lavaggio della resina con un opportuno solvente.^{xxx} La resina deve consentire l'ancoraggio del primo aminoacido tramite un legame di tipo covalente, che sia sufficientemente stabile da rimanere inalterato durante l'allungamento del peptide, ma che possa essere scisso con facilità al momento del *cleavage*. Per questo scopo vengono in genere utilizzati dei *linker* opportunamente funzionalizzati, che si interpongono tra il supporto solido e il primo aminoacido. Un'altra proprietà importante della resina è il grado di sostituzione, in mmol/g, che esprime la capacità di carico, cioè la quantità di peptide che può essere portata su quel tipo di supporto. La resina da noi utilizzata è di tipo H-L-Thr(tBu)-ol-2CT (2 clorotritile treonilo terbutile) con grado di sostituzione 0.68 mmol/g. (Figura 17).

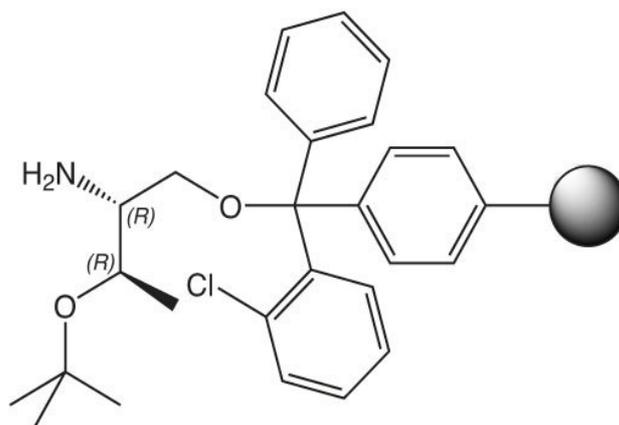


Figura 17 *H-L-Thr(tBu)-ol-2CT*

Per evitare reazioni indesiderate durante l'accrescimento della catena peptidica è necessario ricorrere a strategie di protezioni ortogonali. In particolare i gruppi protettori delle catene laterali degli aminoacidi devono essere stabili alle condizioni di *coupling* e di deprotezione delle funzioni α -amminiche, e devono essere rimossi solo durante il *cleavage*.

Nella strategia Fmoc/t-Bu, utilizzata in questo lavoro di tesi, il gruppo Fmoc (9-H-fluorenil-9-metilossi-carbonile) protettore del gruppo amminico in α viene rimosso utilizzando la soluzione di un'ammina secondaria, normalmente piperidina al 20% in DMF (Figura 17).

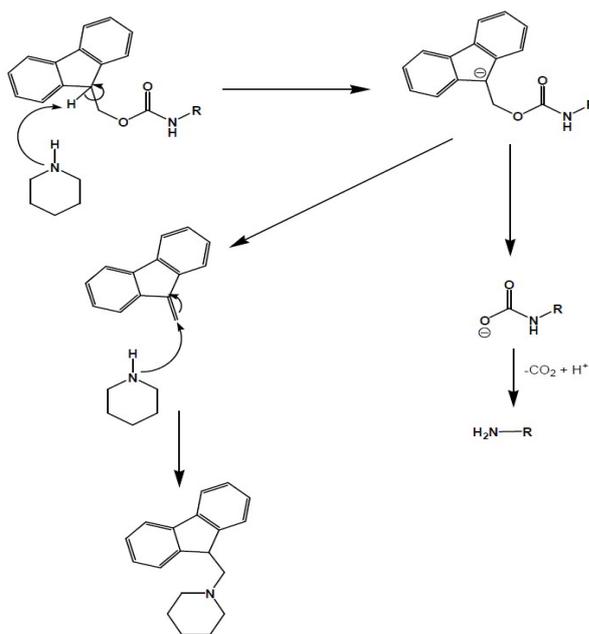


Figura 18 *Deprotezione del gruppo Fmoc*

L'amminoacido Fmoc-D-Phe-OH viene utilizzato senza protezioni in quanto le catene laterali non presentano gruppi funzionali reattivi nelle condizioni di reazione adottate nelle varie fasi della sintesi peptidica. Gli amminoacidi che devono essere protetti sono quelli con gruppi ossidrilici, amminici e carbossilici nelle catene laterali. In particolare sono stati utilizzati i seguenti gruppi protettori: Pbf (2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile), Boc (*ter*-butilossicarbonile), Trt (trifenilmetile) (Figura 19).

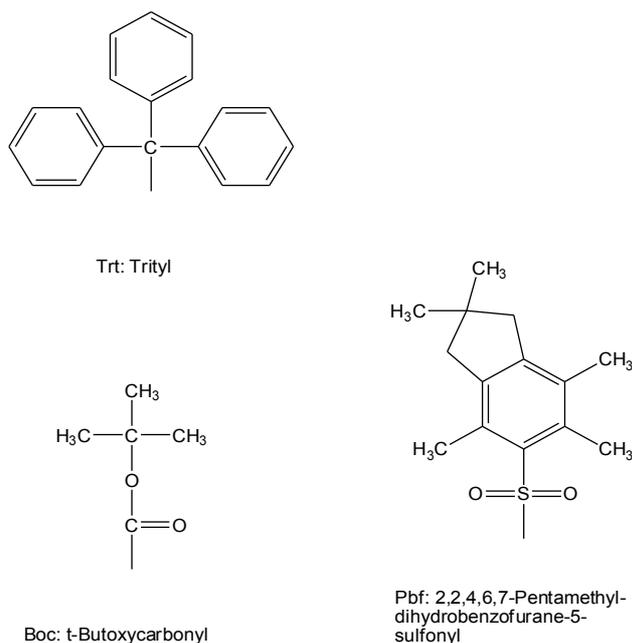


Figura 19 Gruppi protettori per le catene laterali: Pbf, Trt, Boc

Affinché si verifichi rapidamente e in maniera completa la formazione del legame peptidico, è necessario che il gruppo carbossilico dell'amminoacido da introdurre venga attivato. Per ottenere tale attivazione sono a disposizione vari metodi, che si basano sull'uso di diversi tipi di "coupling reagents". Il più comune reagente di accoppiamento per SPPS è il TBTU [O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato], che viene usato in presenza di HOBt (1-idrossi-benzotriazolo) e di una base (N-metilmorfolina, NMM). Il TBTU è un sale di uronio che converte l'*N*^α-Fmoc-amminoacido in estere 3-idrossi-1,2,3-benzotriazolico, in presenza di un equivalente di base (Figura 20).

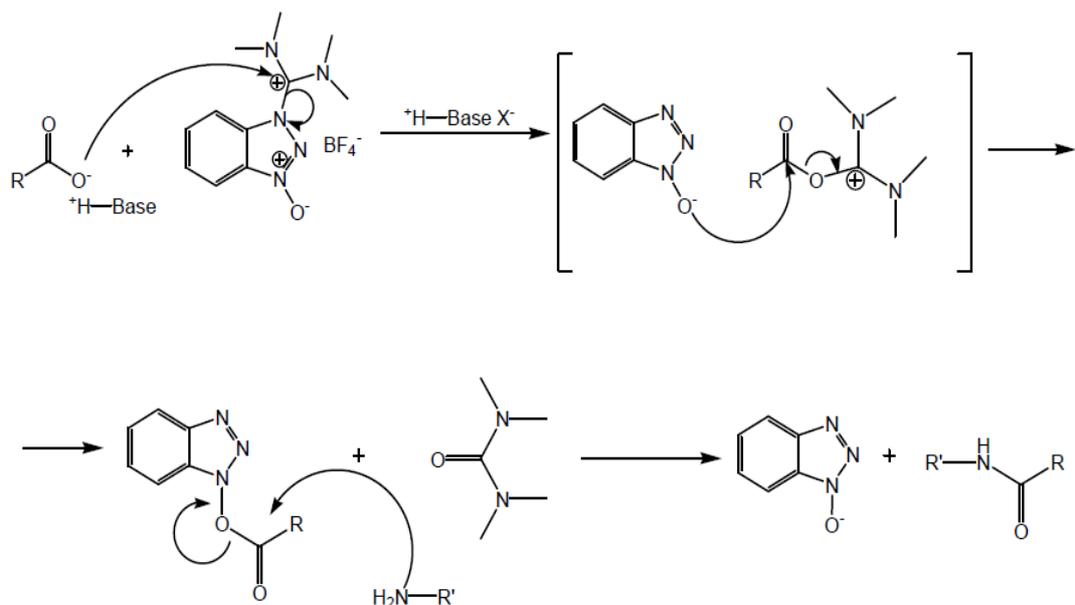


Figura 20 Reazione di accoppiamento mediata da TBTU

Dopo l'accoppiamento di ogni amminoacido si può controllare la completezza o meno della reazione tramite un test colorimetrico direttamente su resina, indicato come test di Kaiser 1. Questo è in grado di rivelare la presenza sulla resina di gruppi amminici primari, grazie alla reazione a caldo tra questi e ninidrina, con lo sviluppo di una colorazione blu scura molto intensa. Il metodo ha il vantaggio di richiedere solo una piccola quantità di resina per l'analisi e di dare il risultato in appena cinque minuti. Un altro modo per controllare la sintesi peptidica durante il suo svolgimento è il *microcleavage*, che prevede il distacco dalla resina e l'analisi di una piccola quantità di intermedio.

4.2.1 Procedura generale per la sintesi peptidica su fase solida

I peptidi lineari sono stati sintetizzati con un sintetizzatore manuale (PLS 4x4, Advanced ChemTech) seguendo la strategia Fmoc/t-Bu, in cui i gruppi protettori delle catene laterali vengono eliminati in ambiente acido, mentre il gruppo Fmoc, protettore della funzione α -amminica, viene rimosso in condizioni basiche (piperidina).

La resina viene fatta rigonfiare in DMF (1 ml per 100 mg di resina) per 30 minuti. Dopodiché è stata fatta depositare su una colonna munita di setto poroso e impaccata con una piccola quantità di DMF.

Ogni ciclo della sintesi peptidica su fase solida (SPPS), prevede i seguenti passaggi:

- 1) Deprotezione del gruppo Fmoc, protettore temporaneo del gruppo amminico, con piperidina al 20% in DMF.
- 2) Lavaggio con DMF per eliminare dall'ambiente di reazione gli eccessi dei reagenti.
- 3) Accoppiamento dell'amminoacido successivo in sequenza tramite attivazione *in situ* della funzione carbossilica con HOBt/TBTU.
- 4) Lavaggi con DMF.

La reazione di accoppiamento viene monitorata tramite test di Kaiser^{xxxii}.

Alla fine di ogni sintesi i peptidi vengono acetilati sulla funzione N-terminale, per rendere i peptidi quanto più simili a un frammento proteico.

L'acetilazione viene effettuata direttamente su resina, dopo aver deprotetto il gruppo amminico dell'amminoacido N-terminale e trattando la resina con una soluzione di anidride acetica e NMM in diclorometano.

Il *cleavage* del peptide dalla resina, insieme alla simultanea deprotezione delle catene laterali degli amminoacidi, viene effettuato tramite acidolisi da parte di acido trifluoroacetico (TFA) (Figura 21). Durante tale processo si verifica la liberazione di specie cationiche altamente reattive, che possono interagire con quei residui amminoacidici che contengono gruppi funzionali nucleofili (ad esempio il Trp). Per evitare ciò, il TFA viene usato in presenza di vari tipi di reagenti nucleofili, che si comportano come *scavengers* nei confronti di queste specie elettrofile. In particolare nel nostro caso è stata usata una miscela di *cleavage* costituita da TFA/H₂O/1,2 etanditiolo/fenolo (94:2:2:2 v/v/v/v). Una volta evaporato il TFA sotto flusso di azoto, i peptidi vengono precipitati in etere dietilico a freddo, centrifugati e infine liofilizzati.

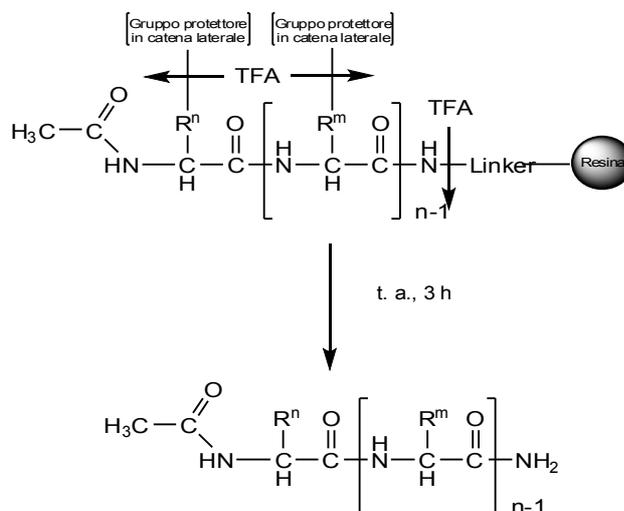


Figura 21 *Cleavage del peptide dalla resina*

Tramite SPPS sono stati ottenuti quindi i seguenti peptidi:

- a) $n=1$; L-DAP-(N₃)-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys--L-Thr(olo);
- b) $n=2$; L-Orn-(N₃)-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys-L-Thr(olo);
- c) $n=3$; L-Lys-(N₃)-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys-L-Thr(olo).

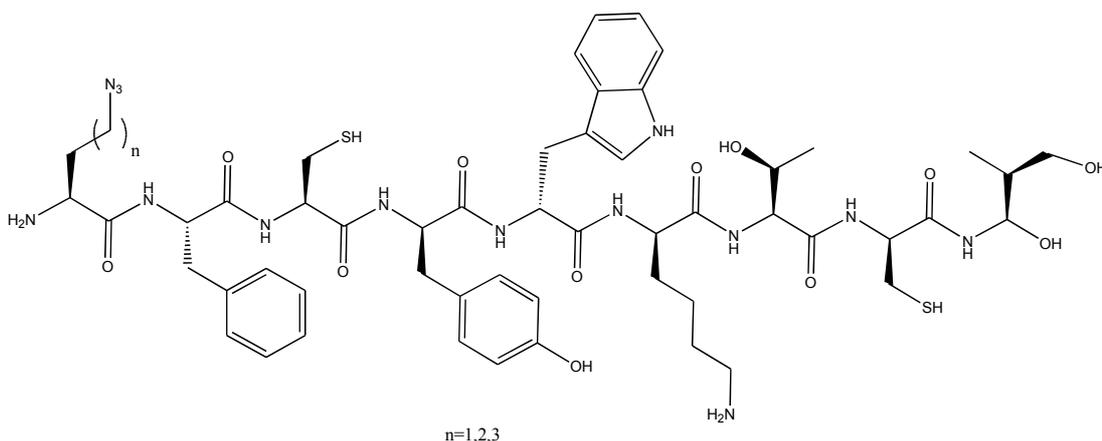


Figura 22. Peptide lineare sintetizzato con $n=1,2,3$

Grazie alla collaborazione del nostro laboratorio con l'ICMUB (institut de chimie moleculaire de Bourgogne) abbiamo avuto a disposizione il chelante DOTA (acido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano.1,4,7,10 tetraacetico) opportunamente modificato ad una delle estemità con un alchimo terminale; questo ci ha permesso di utilizzarlo tal quale durante l'accoppiamento con la cicloaddizione di Huisgen.

4.3 Click chemistry

4.3.1 Click Chemistry: strategia su resina.

La prima strategia che è stata tentata per l'ottenimento dei coniugati peptidici è stata quella di effettuare la reazione di *click chemistry* direttamente su resina. L'accoppiamento dei peptidi (a,b,c) su resina con il DOTA è stata effettuata in modo semplice; un reattore per sintesi peptidica insieme al peptide ancorato su resina (1eq.) ed al macrociclo (1eq.) sono stati aggiunti a seconda del tipo di sintesi, acido ascorbico, 2,6 lutidina, DIPEA. Tutte le reazioni sono state eseguite in miscela DMSO/H₂O di composizione variabile. Successivamente è stato eseguito il *cleavage* della resina.

Nonostante le diverse condizioni di reazione tentate il prodotto di reazione non è stato osservato in nessun caso. Inoltre nella soluzione di lavaggio analizzata tramite RP-HPLC-ESI-MS si ritrova il segnale sia cromatografico che quello di massa relativo all'addotto del macrociclo con il rame (Tabella 2).

Catalizzatore	Basi	T (°)	Tempo di reazione	Solventi	Risultato
CuSO ₄ ·5H ₂ O (1eq) Acido ascorbico (1eq) Cu ⁰ (1 eq.)	//	RT	overnight (ON)	DMSO/H ₂ O 2/1	//
CuBr (1eq) Acido ascorbico (1eq)	2,6 lutidina (10 eq), DIPEA (10 eq)	RT	overnight (ON)	DMSO/H ₂ O 1/1	//
CuSO ₄ ·5H ₂ O (6eq) Acido ascorbico (1eq)	//	RT	overnight (ON)	DMSO/H ₂ O 1/1	//

Tabella 2. Reazioni su resina.

4.3.2 Click Chemistry: strategia in soluzione.

Dato che l'accoppiamento tra DOTA e i due peptidi (b,c) su resina non ha avuto successo si è proceduto con l'accoppiamento in soluzione. Ciascun peptide lineare è stato distaccato dalla resina, così che sia possibile scioglierlo in DMSO. Il peptide grezzo deprotetto è stato utilizzato per eseguire la reazione di *click chemistry*; la reazione è stata fatta in palloncino, dove oltre al macrociclo e al peptide sono stati aggiunti diversi reagenti descritti in tabella 3. Nelle reazioni 2 e 3 tutti i reagenti prima di essere inseriti nell'ambiente di reazione sono stati solubilizzati a parte: il macrociclo, il peptide e il Cu(I) in soluzione di DMSO saturato di N₂, l'acido ascorbico in H₂O. Nel palloncino di reazione le soluzioni preparate sono state aggiunte in questo ordine: le soluzioni di macrociclo e peptide, quella di ascorbato, le basi e infine la soluzione con il Cu(I) o Cu(II). In tutte le reazioni si rende l'atmosfera inerte con azoto e si oscura l'ambiente di reazione, accorgimenti che servono ad evitare l'ossidazione del Cu(I) a Cu(II) al momento dell'aggiunta (Tabella 3).

	Catalizzatore	Basi	T (°)	Tempo di reazione	Solventi	Risultato	Resa
1	Cu ⁰ (34 eq.) Acido ascorbico (2eq)	//	RT	overnight (ON)	THF/H ₂ O 2/1	X	Con c) 10 %
2	CuBr (1eq) Acido ascorbico (1eq)	2,6 lutidina (10 eq), DIPEA (10 eq)	RT	1h 30'	DMSO/H ₂ O 1/1	X	Con b) 16% Con c) 20 %
3	CuI (1eq) Acido ascorbico (1eq)	2,6 lutidina (10 eq), DIPEA (10 eq)	RT	1h 30'	DMSO/H ₂ O 1/1	X	Con b) 27,7% Con c) 18,4%
4	Cu(AcO) ₂ (0,05 eq) Acido ascorbico (0,2eq)	DIPEA (0,4 eq)	RT	overnight (ON)	DMSO/H ₂ O 1/1	//	

Tabella 3. Reagenti per reazioni in soluzione

Le reazioni 1-3 sono state positive; la prima è stata trattata con Na₂S per eliminare il [Cu²⁺] chelato dal macrociclo, e successivamente purificato. Dalla seconda e dalla terza reazione invece si è ottenuto l'addotto senza alcuna presenza del rame nel macrociclo.

5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata applicata la strategia di formazione di un ponte [1,2,3] triazolico 1,4 disostituito, al fine di ottenere l'addotto DOTA-octeotride senza che il [Cu²⁺] rimanesse chelato dal DOTA. Questo è stato ottenuto tramite una reazione di cicloadizione 1,3-dipolare azide-alchino catalizzata da Cu(I) (CuAAC) tra il DOTA funzionalizzato con un gruppo alchino Figura e l'octeotride funzionalizzato con un gruppo azido terminale sulla catena laterale dell'amminoacido N-terminale. Per questo scopo è stata sviluppata un'adeguata strategia di sintesi di N^α-Fmoc-ω-azido-α-amminoacidi, ottenuti tramite diazo-*transfer* su ω-ammino-α-amminoacidi N^α-protetti. Sono stati sintetizzati tre peptidi lineari, che differiscono tra loro per la posizione rispettiva in *i*+8 degli amminoacidi portanti la funzione ω-azidica in catena laterale, che sono stati ciclizzati a formare l'octeotride successivamente alla reazione click. L'obiettivo di formare l'addotto, evitando la chelazione del [Cu²⁺] da parte del DOTA è stato pienamente raggiunto, riducendo i tempi di reazione e trovando la giusta quantità di catalizzatore da impiegare.

6. Parte sperimentale

6.1 Materiali e metodi

Tutti i reattivi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. Gli amminoacidi Boc-L-DAP-OH, Fmoc-D-Phe-OH, la resina e l'attivante HOBt sono stati acquistati da Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germania); gli amminoacidi Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH e Fmoc-L-His(Trt)-OH da CBL (Patrasso, Grecia); la Fmoc-L-Nleu da NeoMPS (Strasburgo, Francia); l'attivante TBTU da Advanced Biotech Italia (Milano). La DMF per sintesi peptidica è stata acquistata da Scharlau (Barcellona, Spagna), l'Acetonitrile da Carlo Erba, mentre diclorometano (DCM), acido trifluoroacetico (TFA), piperidina, anidride acetica (Ac_2O) e N-metilmorfolina (NMM) da Sigma Aldrich. Per il distacco del peptide dalla resina sono stati usati come scavenger: 1,2 etanditiolo (EDT), tioanisolo e fenolo (PheOH), acquistati rispettivamente presso Acros Organics, Jansenn Chimica e Carlo Erba.

I peptidi lineari sono stati sintetizzati con un sintetizzatore manuale (PLS 4x4, Advanced ChemTech).

Le cromatografie su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC) sono state condotte su lastre in alluminio rivestite di gel di silice (Merck; 60 Å F254) e rivelate mediante: UV (254 e 366 nm), ninidrina in acetone, soluzione di permanganato [KMnO_4 (3g), K_2CO_3 (20 g), e NaOH (0.25 g) in H_2O (300 ml)].

I prodotti sono stati analizzati e caratterizzati tramite LC-ESI-MS. Le LC-ESI-MS sono state eseguite su uno strumento UPLC analitico con sistema di pompe Waters Alliance 2695 e rivelatore UV a diode array Waters 2996, accoppiato a spettrometro ESI-MS a singolo quadrupolo (Waters micromass ZQ), usando una colonna C18 Phenomenex Kinetex (100x3mm, 2.6 μm , C18, 100Å) con un flusso di 0,450 mL/min di una miscela di eluenti a composizione variabile (A 0.1% TFA in H_2O MilliQ e B 0.1% TFA in Acetonitrile 84%). Per liofilizzare i peptidi è stato usato un liofilizzatore Edwards modello Modulyo.

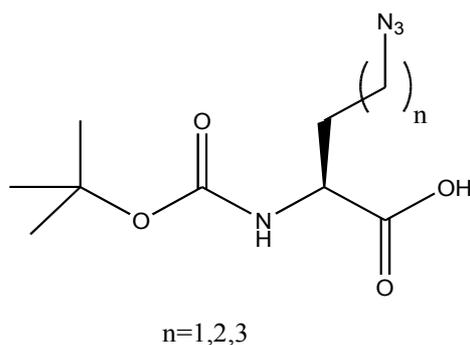
La purificazione dei peptidi è stata effettuata mediante HPLC semipreparativa in fase inversa con strumento Waters modello 600 e detector di assorbanza a due λ Waters 2487, su colonna C18 Phenomenex Jupiter (250x10 mm, 10 μm , C18, 300 Å) a flusso di 4 mL/min di miscela di eluenti a composizione variabile (A 0.1% TFA in H_2O MilliQ e B 0.1% TFA in Acetonitrile 84%). Le soluzioni utilizzate per il test di Kaiser sono state ottenute nel seguente modo: ninidrina (5 g) in etanolo (100 ml), fenolo (80 g) in etanolo (20 ml), KCN (2 ml di una soluzione acquosa 1 mM) in piridina (98 ml).

6.2 Sintesi di N^α-Fmoc-ω-azido-α-amminoacidi

6.2.1 Metodo A

Diazo-transfer su N^α-Boc-amminoacidi

Si prepara una miscela costituita dall' amminoacido N^α-Boc-protetto (1.14 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ [(n+0.5 mmol), con n=numero di mmol di acido nel sistema] e CuSO₄·5H₂O (1,14 μmol, 0.01 eq.) in 33 ml di MeOH. Si aggiunge l'imidazolo-1-solfonil-azide idrocloruro (1.14 mmol, 1.5 eq) e si lascia reagire a temperatura ambiente in agitazione per 40 minuti. Si controlla la reazione mediante TLC (iPro-OH/Et-OAc/H₂O 6/1/3, rivelata tramite UV 254 nm e ninidrina in acetone). Si diluisce con 30 ml di H₂O, si acidifica fino a pH 2 con HCl 0.1 M e si estrae con DCM (3x50 ml). Si disidrata la fase organica e si elimina il solvente per evaporazione sotto vuoto, ottenendo così il prodotto grezzo.



Acido 6-Azido-2R-[[t-butil-carbonato]amino] esanoico o 6-azido-Boc-L-DAP-OH (n=1) (1)

resa: 70,6 %. RP-UPLC: R_t 3.30 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti).

Acido 6-Azido-2R-[[t-butil-carbonato]amino] eptanoico o 6-azido-Boc-L-Ornitina (n=2) (2)

Resa: 78,0 %. RP-UPLC: R_t 3.79 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti)

Acido 6-Azido-2R-[[t-butil-carbonato]amino] ottanoico o 6-azido-Boc-L-Lisina (n=3) (3)

Resa: 65,5 %. RP-UPLC: R_t 4.25 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti).

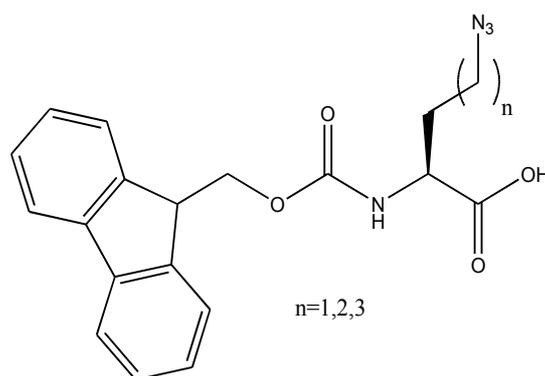
Deprotezione del gruppo α-amminico e inserimento dello Fmoc a partire di N^α-Boc-ω-azido-α-amminoacidi.

L'amminoacido N^α-Boc-protetto (1.14 mmol) viene lasciato sotto agitazione con un eccesso di HCl 2 M (2.5 ml) a temperatura ambiente per 2 ore. Il residuo viene diluito con 5 ml di H₂O e liofilizzato. Per introdurre lo Fmoc si solubilizza l'amminoacido deprotetto in 30 ml di diossano e si aggiunge goccia a goccia una soluzione di Fmoc-O-Su (1.26 mmol) in 25 ml di diossano. Si porta poi a pH 8 con NaOH 1 M e si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per un'ora. Si aggiungono 12 ml di H₂O e si acidifica fino a pH 3 con HCl 2 M. Si estrae con DCM (3x30 ml), si disidrata la fase organica e si evapora sotto vuoto.

6.1.2 Metodo B

Diazo-transfer su N^α-Fmoc- amminoacidi

Si prepara una miscela costituita dall' amminoacido N^α-Fmoc-protetto (0.73 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ [(n+0.5 mmol), con n=numero di mmol di acido nel sistema] e CuSO₄·5H₂O (7.3 μmol, 0.01 eq.) in 30 ml di MeOH. Si aggiunge l'imidazolo-1-solfonil-azide cloridrato (1.1 mmol, 1.5 eq) e si lascia reagire a temperatura ambiente sotto agitazione per 10 minuti. Si controlla la reazione mediante TLC (DCM/MeOH 10:1, rivelata tramite UV 254 nm e ninidrina in acetone). Si diluisce con 30 ml di H₂O, si acidifica fino a pH 2 con HCl 0.1 M e si estrae con DCM (3x50 ml). Si disidrata la fase organica e si elimina il solvente per evaporazione sotto vuoto, ottenendo così il prodotto grezzo.



Acido 6-Azido-2S-[[*(9H*-fluoren-9-ilmetossi) carbonil]amino] ottanoico o 6-azido-Fmoc-L-Lisina (n=3) (4)

Resa: 70,5 % . RP-UPLC: R_t 4.28 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti).

Acido 6-Azido-2S-[[9H-fluoren-9-ilmetossi) carbonil]amino] eptanoico o 6-azido-Fmoc-L-Ornitina (n=2) (5)

Resa: 80,2 % . RP-UPLC: R_t 3.81 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti).

Acido 6-Azido-2S-[[9H-fluoren-9-ilmetossi) carbonil]amino] esanoico o 6-azido-Fmoc-L-DAP-OH (n=1) (6)

Resa: 75,6 % . RP-UPLC: R_t 3.34 minuti (dal 50 al 100% di B in 5 minuti).

6.3 Sintesi peptidica su fase solida

6.3.1 Procedura generale per SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) su sintetizzatore manuale.

I peptidi lineari sono stati sintetizzati con un sintetizzatore manuale (PLS 4x4, Advanced ChemTech), usando un reattore di Teflon (10 ml) , partendo dalla resina 2-clorotritile treononilo terbutile (300 mg, 0.68 mmol/g) e usando la strategia Fmoc/t-Bu. Prima dell'uso la resina è stata rigonfiata con DMF (1 ml/100 mg di resina) per 20 minuti.

La sintesi del peptide è stata effettuata eseguendo, per l'aggiunta di ogni amminoacido, il seguente ciclo (si utilizza 1 ml di solvente ogni 100 mg di resina):

- *Swelling* in DMF per 10 minuti.
- Deprotezione del gruppo Fmoc: la resina viene lavata due volte, prima per 5 minuti e poi per altri 20, con una soluzione di piperidina al 20% in DMF .
- Lavaggi: con DMF (3x5 minuti).
- Accoppiamento: si utilizza una miscela costituita da TBTU/HOBt/NMM (2eq./2eq./3eq.) a cui si aggiungono 2 eq. di amminoacido Fmoc-protetto (in alcuni casi per Xaa e Yaa sono stati utilizzati solo 1.5 eq.). Il tutto viene solubilizzato in DMF e lasciato reagire per 50 minuti.
- Lavaggi: 3x3 minuti con DMF e 2x3 minuti con DCM.
- Test di Kaiser: usato come controllo di routine per verificare l'avvenuta reazione di accoppiamento. In caso di positività al test è necessario eseguire un doppio accoppiamento.

Procedura per il test di Kaiser: una piccola quantità di resina viene posta in un apposito tubicino e ad essa sono aggiunte tre gocce di ognuna delle seguenti soluzioni: ninidrina in etanolo, fenolo in etanolo, KCN in piridina (98 ml). Il tubicino viene posto in bagno

di sabbia a 100°C per 5 minuti. Un test positivo è evidenziato da un'intensa colorazione blu-violetta dei granuli di resina e attesta la presenza di almeno il 2% di gruppi amminici liberi.

6.3.2 Procedura generale per la deprotezione, il distacco dalla resina e la purificazione dei peptidi

Il distacco del peptide dalla resina e la deprotezione delle catene laterali degli amminoacidi sono stati ottenuti usando una miscela costituita da TFA/H₂O/1,2 etanditiolo/fenolo (94:2:2:2 v/v/v/v). La resina viene lasciata in contatto con 3 ml di questa soluzione per tre ore, a temperatura ambiente e sotto forte agitazione, dopo di che è filtrata e lavata con TFA. Dopo parziale evaporazione della soluzione sotto flusso di N₂, si fa precipitare il peptide tramite l'aggiunta di etere etilico freddo. Si isola poi il precipitato per centrifugazione e si sottopone ad alcuni lavaggi con etere etilico freddo in ghiaccio, in modo da eliminare le tracce residue degli additivi aggiunti nella miscela di distacco. Dopo i lavaggi e l'allontanamento dell'etere si ottiene il grezzo, che viene solubilizzato in H₂O e quindi liofilizzato.

I peptidi sono stati purificati usando una RP-HPLC semipreparativa (metodo 10-60% di MeCN in 20 minuti) e le frazioni esaminate con UPLC-ESIMS.

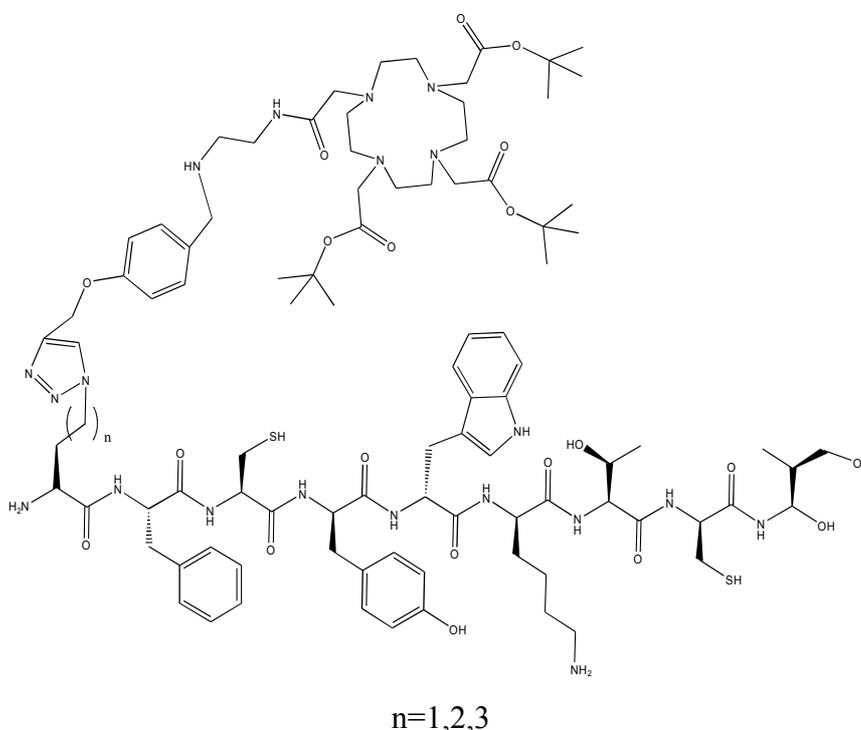
6.3.3 Procedura generale per la ciclizzazione dei peptidi in soluzione

In 5 ml di THF si aggiungono, sotto agitazione, 25 mg di peptide lineare (0.021 mmol), 0,5 ml di NH₄OAc 0,5 mM e NaHCO₃ fino a pH 7, aggiunta di 20 µL di H₂O₂. Si lascia sotto agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Il prodotto grezzo viene solubilizzato in H₂O o all'occorrenza in H₂O e CH₃CN e sottoposto a *Solid Phase Extraction* (SPE). Il peptide ciclico viene purificato tramite RP-HPLC semipreparativa (metodo 50-100% di MeCN in 20 minuti). Si liofilizzano le frazioni contenenti il peptide ciclico.

6.4 Click chemistry

6.4.1 Sintesi di DOTATOC simili tramite click chemistry catalizzata da Cu(0)

In 3 ml di una miscela H₂O/THF (1:1 v/v), sono stati aggiunti, sotto agitazione, 21 mg di peptide lineare (0,017 mmol), 13 mg di P-DOTA-azide (protected DOTA azide) (0,017 mmol), 0,11 mg di Cu(0) (0,58 mmol), 5,2 mg di sodio ascorbato (0,017 mmol). Si è lasciato reagire una notte. La reazione è stata controllata tramite UPLC-ESIMS (metodo 25-75 % di MeCN in 5 minuti). Il peptide è stato trattato con Na₂S · 9H₂O (14 mg, 1 eq.).



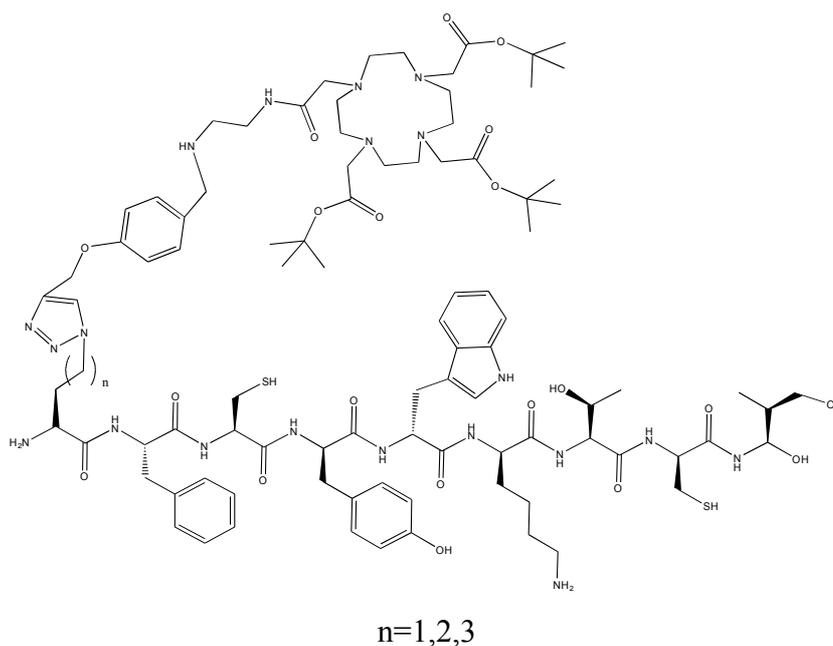
1,4,7-Tris(1,1-dimethylethyl)-10-[2-oxo-2-[[2-[4-(4-methoxy-[1-L-DAP-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys-L-Thr(ol)]1,2,3-triazol)phenylmethyl]amino]ethyl]amino]ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate(n=3) (7)

Resa: 10 %. RP-UPLC: R_t 4.29 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per C₉₇H₁₅₀N₂₀O₂₀S₂ $[[M + 2H]^+/2]$: 975,5 non trovato; m/z calcolato per C₉₇H₁₅₀N₂₀O₂₀S₂(Cu²⁺) $[[M + 2H]^+/2]$: 1006,75 ; trovato 1005,70.

6.4.2 Sintesi di DOTATOC simili tramite click chemistry catalizzata da Cu(I)

Click chemistry utilizzando CuBr su resina.

In 1 ml di DMSO saturato con N₂ sono stati aggiunti, sotto agitazione, 25 mg di peptide lineare su resina (0,019 mmol, 1 eq.), 13 mg di P-DOTA-azide (0,019 mmol, 1 eq.), 21 µL di 2,6 lutidina (0,19 mmol, 10 eq.), 32 µL di DIPEA (0,19 mmol, 10 eq.), 3,7 mg di sodio ascorbato (soluzione acquosa 20 mg/ml; 170 µL di acqua, 0,019 mmol, 1 eq.), 2,7 mg di CuBr (0,019 mmol, 1 eq.) sciolto in 125 µL di DMSO saturato con N₂. L'ambiente di reazione è stato oscurato e reso inerte con argon. Si è lasciato reagire una notte. Al termine sono stati effettuati dei lavaggi: 3x3 minuti con DMF e 2x3 minuti con DCM. Si effettua la deprotezione con Piperidina 20 % in DMF, due cicli di 8 minuti. Sono stati effettuati 3 lavaggi con DCM e si è essiccato. E' stato effettuato successivamente il distacco dalla resina e alla deprotezione di tutte le catene laterali. Si è controllato l'avvenuta reazione tramite UPLC-ESIMS (metodo 25-75 % di MeCN in 5 minuti).



(7) Resa: il prodotto non si è formato . RP-UPLC: R_t 4.29 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per C₉₇H₁₅₀N₂₀O₂₀S₂ [[M + 2H]⁺/2]: 975,5 non trovato; m/z calcolato per C₉₇H₁₅₀N₂₀O₂₀S₂[Cu²⁺] [[M + 2H]⁺/2]: 1006,75 ; non trovato.

1,4,7-Tris(1,1-dimethylethyl)-10-[2-oxo-2-[[2-[4-(4-methyloxy-[1-L-Orn-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys-L-Thr(ol)]1,2,3-triazol)phenylmethyl]amino]ethyl]amino]ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate (n=2) (8)

Resa: il prodotto non si è formato . RP-UPLC: R_t 4.25 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $C_{96}H_{148}N_{20}O_{20}S_2$ $[[M + 2H]^+/2]$: 968,5 non trovato; m/z calcolato per $C_{97}H_{148}N_{20}O_{20}S_2[Cu^{2+}]$ $[[M + 2H]^+/2]$: 999,75 ; non trovato.

1,4,7-Tris(1,1-dimethylethyl)-10-[2-oxo-2-[[2-[4-(4-methyloxy-[1-L-DAP-D-Phe-L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Thr-L-Cys-L-Thr(ol)]1,2,3-triazol)phenylmethyl]amino]ethyl]amino]ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate (n=1) (9)

Resa: il prodotto non si è formato . RP-UPLC: R_t 4.22 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $C_{95}H_{146}N_{20}O_{20}S_2$ $[[M + 2H]^+/2]$: 961,5; non trovato; m/z calcolato per $C_{95}H_{146}N_{20}O_{20}S_2[Cu^{2+}]$ $[[M + 2H]^+/2]$: 992,75; non trovato.

Click chemistry utilizzando CuBr in soluzione.

Su 100 mg di resina (0,075 mmol, 1 eq.) si è effettuato il distacco del peptide e la deprotezione di tutte le catene laterali. Si sono ottenuti 68 mg di peptide lineare grezzo. In 3,5 ml di DMSO saturato con N_2 , sotto agitazione, sono stati aggiunti 68 mg di peptide lineare (0,058 mmol, 1 eq.), 44 mg di P-DOTA-azide (0,058 mmol, 1 eq.), 67 μ L di 2,6 lutidina (0,58 mmol, 10 eq.), 102 μ L di DIPEA (0,58 mmol, 10 eq.), 11,5 mg di sodio ascorbato (soluzione in 20mg/ml in 575 μ L di acqua), 8,3 mg di CuBr sciolto in 1 ml di DMSO saturato con N_2 . Si è lasciato reagire una notte, al buio e in atmosfera inerte per argon. La reazione è stata controllata tramite UPLC-ESIMS (metodo 25-75 % di MeCN in 5 minuti). Il prodotto è stato trattato con $Na_2S \cdot 9H_2O$ (14 mg, 1 eq.). I prodotti sono stati purificati usando una RP-HPLC semipreparativa (metodo 25-75% di MeCN in 20 minuti) e le frazioni esaminate con UPLC-ESIMS (metodo 25-75% di MeCN in 5 minuti).

(8) Resa: 16 % . RP-UPLC: R_t 4.28 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $C_{96}H_{148}N_{20}O_{20}S_2$ $[[M + 2H]^+/2]$: 968,5; trovato 969, 23.

(9) Resa: 20 %. RP-UPLC: R_t 4.22 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $C_{95}H_{146}N_{20}O_{20}S_2$ $[[M + 2H]^+/2]$: 961,5 non trovato.

Click chemistry utilizzando CuI in soluzione.

In 750 μL di DMSO saturato con N_2 sono stati aggiunti, sotto agitazione, 10 mg di peptide lineare (0,0083 mmol, 1 eq.), 6,3 mg di P-DOTA-azide (0,0083 mmol, 1 eq.), 10 μL di 2,6 lutidina (0,083 mmol, 10 eq.), 30 μL di DIPEA (0,083 mmol, 10 eq.), 1,64 mg di sodio ascorbato (0,0083, 1 eq., soluzione in 125 μL di acqua), 1,6 mg di CuI (0,0083, 1 eq., soluzione in 250 μL di DMSO deareato). Si lascia reagire per 1 ora e 30 minuti. La reazione è stata controllata tramite UPLC-ESIMS. Al termine si è evaporato il DMSO sotto vuoto, ed il prodotto è stato solubilizzato in acqua e liofilizzato. I prodotti sono stati purificati usando una RP-HPLC semipreparativa (metodo 25-75% di MeCN in 20 minuti) e le frazioni esaminate con UPLC-ESIMS (metodo 25-75% di MeCN in 5 minuti).

(7) Resa: 27,7 %. RP-UPLC: R_t 4.29 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $\text{C}_{97}\text{H}_{150}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 975,5; trovato 975,18.

(8) Resa: 18,4 % . RP-UPLC: R_t 3.87 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $\text{C}_{96}\text{H}_{148}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 68,5; trovato 968,32.

6.4.3 Sintesi di DOTATOC tramite click chemistry catalizzata da Cu(II)

Metodo di Mindt

In 700 μL di una miscela tBuOH/ H_2O /DMSO (1:1:1 v/v/v) saturato con N_2 sono stati aggiunti, sotto agitazione, 15 mg (0,013 mmol, 1 eq.) di peptide lineare, 9 mg di P-DOTA-azide (0,013 mmol, 1 eq.), 21 μL di DIPEA (0,13 mmol, 10 eq.), 0,51 mg di sodio ascorbato (0,0026, 0,2 eq., soluzione in 125 μL di acqua), 1,6 mg di $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (0,05 eq., soluzione in 250 μL di DMSO saturato con N_2). Si è lasciato reagire una notte a 85° C. Si è controllato la reazione tramite UPLC-ESIMS. Al termine il DMSO è stato evaporato sotto vuoto, ed il prodotto è stato solubilizzato in acqua e liofilizzato.. I prodotti sono stati purificati usando una RP-HPLC semipreparativa (metodo 25-75% di MeCN in 20 minuti) e le frazioni esaminate con UPLC-ESIMS (metodo 25-75% di MeCN in 5 minuti).

(7) Resa: il prodotto non si è formato. RP-UPLC: R_t 4.00 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $\text{C}_{97}\text{H}_{150}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 975,5; trovato 975,18; m/z calcolato per $\text{C}_{95}\text{H}_{146}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2[\text{Cu}^{2+}]$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 992,75 ; non trovato.

Click chemistry utilizzando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ su resina.

In 1 mL di una miscela tBuOH/H₂O (1:1 v/v) sono stati aggiunti sotto agitazione 43 mg di peptide lineare (0,037 mmol, 1 eq.), 28 mg di P-DOTA-azide (0,037 mmol, 1 eq.), 44 mg di sodio ascorbato (0,222, 6 eq., soluzione in 125 μL di acqua), 55,42 mg di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Si è lasciato reagire una notte. Si è effettuato il distacco dalla resina e la deprotezione delle catene laterali. Si è trattato il prodotto con $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (14 mg, 1 eq.). La reazione è stata controllata tramite UPLC-ESIMS (metodo 25-75% di MeCN in 5 minuti). I prodotti sono stati purificati usando una RP-HPLC semipreparativa (metodo 25-75% di MeCN in 20 minuti) e le frazioni esaminate con UPLC-ESIMS.

(7) Resa: 10 % . RP-UPLC: R_t 4.47 minuti (25–75% di MeCN in 5 min) ESI-MS: m/z calcolato per $\text{C}_{97}\text{H}_{150}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 975,5; non trovato ; m/z calcolato per $\text{C}_{95}\text{H}_{146}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2[\text{Cu}^{2+}]$ $[[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2]$: 992,75; trovato 993,47.

7 SIGLE ED ABBREVIAZIONI

BFCA Bifunctional Chelating Agent

CuAAC: Copper catalysed azide alkyne cycloaddition

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformammide

DMSO: Dimetilsolfossido

DOTA: acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacetico

DTPA: acido 1,4,7 triazoeptano-1,1,4,7,7 pentaacetico

ESI-MS: Electrospray Ionization Mass Spectrometry

EDT: 1,2 etanditiolo

GEP-NETs: tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici

HOBt: 1-idrossi-benzotriazolo

NMM: N-metilmorfolina

Pbf: (2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile),

PET: Tomografia ad emissione di positroni

RM: Risonanza Magnetica

RP-HPLC: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

PRI: peptide receptor imaging

RT: room temperature

SPECT: Tomografia ad emissione di singolo fotone

SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis

SPE: Solid Phase Extraction

SRIF: Somatostatin Release Inhibiting Factor

TBTU: O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato

TC: Tomografia Computerizzata

t-Bu: tert-butile

TFA: Acido trifluoroacetico

THF. Tetraidrofurano

TLC: Thin Layer Chromatography

Trt: trifenilmetile

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

UV: Ultravioletto-t-Bu: tert-butile

8. Riferimenti bibliografici

- ⁱ AIMN - Notiziario elettronico di Medicina Nucleare ed Imaging Molecolare, Anno IV, n 111, 2008
- ⁱⁱ Marion De Jong, Wouta. P. Breeman, Dik J. Kwekkeboom, Roelf Valkema, and Eric P. Krenning. *Acc. Chem Res.* 2009 Vol. 42 No. 7 **873-880**
- ⁱⁱⁱ Yamada, Y.; Post, S.; Wang, K.; Tager, H.; Bell, G. I.; Seino, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 251-255,
- ^{iv} Weckbecker, G.; Lewis, I.; Albert, I.; Schmid, A. H.; Hoyer, D.; Bruns, C.; Opportunities in Somatostatin Research: Biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev.* **2003**, *2*, 999-1017.
- ^v Patel Y. C.; Wheatley, T. in *Vivo* and *in Vitro* Plasma Disappearance and Metabolism of Somatostatin-28 and Somatostatin-14 in the Rat. *Endocrinology.* **1983**, *37*, 632-634.
- ^{vi} Krenning, E. P.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A.; Koper, J. W.; Kooij, P.P.; Ausema, L.; Lameris, J. S.; Reubi, J. C.; Lamberts, S. W.. **1989**, *1*, 242-244.
- ^{vii} Kenning, e. P. Kwekkeboom, D. J.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A.; Kooij, P. P.; Oei, H. Y.; van Hagen, M.; Postema, P. T.; de Jong, M.; Reubi, J. C.; *et. al. Eur. J. Nucl. Med.* **1993**, *20*, 716-731.
- ^{viii} Froidevaux, S.; Heppeler, A.; Eberle, A. N.; Meier, A. M.; Häusler, M.; Beglinger, C.; Béhé, M.; Powell, P.; Mäcke H. R. . *Endocrinology.* **2000**, *141*, 3304-3312.
- ^{ix} W.H. Bakker, R. Albert, C. Bruns, W.A.P. Bremen, L.J. Hofland, P. Marbach, J.Pless, D. Pralet, B. Stolz, J. W. Koper, S. W.J. Lamberts, T.J. Visser, E.P. Krenning; *Life Sciences*, Vol.49, pp1583-1691
- *Ralf Schirmacher, Younes Lakhrissi , Dean Jolly , Julian Goodstein , Philippe Lucas , Esther Schirmacher *Tetrahedron Letters* 49 (2008) 4824
- ^{xi} Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, **1984**, pp. 1-176
- ^{xii} Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, *41*, (14), 2596-2599
- ^{xiii} Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, (9), 3057-3064
- ^{xiv} Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, (11), 2004-2021
- ^{xv} Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, pp. 1-176.
- ^{xvi} Yu L. Angell and Kevin Burgess *Chem. Soc. Rev.*, 2007, *36*, 1674-1689 | 1675
- ^{xvii} Majireck, M. M.; Weinreb, S. M.; *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 8680-8683
- ^{xviii} Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V.; *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 5337-5339
- ^{xix} Boren, B. C.; Narayan, L. K.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 8923-8930
- ^{xx} Zhang, L.; Chen, X. J.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15998-15999
- ^{xxi} Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H.; *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 919-922
- ^{xxii} Carmen Wängler , Martin Schäfer , Ralf Schirmacher , Peter Bartenstein, Björn Wängler *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19 (2011) 3864-3874
- ^{xxiii} Cheng-Bin Yim,, Otto C. Boerman,‡ Monique de Visser, Marion de Jong, Annemarie C. Dechesne, Dirk T. S. Rijkers, and Rob M. J. Liskamp, *Bioconjugate Chem.* 2009, *20*, 1323-1331
- ^{xxiv} Sampat Ingale and Philip E. Dawson, *Organic Letters* 2011, Vol. 13, No 11, 2822-2825
- ^{xxv} Cavender, C. J.; Shiner, V. J.; *J. Org. Chem.*, **1972**, *37*, 3567-3569
- ^{xxvi} Vasella, A.; Witzig, C.; Chiara, J.-L.; Martin-Lomas, M. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 2073-2077
- ^{xxvii} Alper, P. B.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *Tetrahedon Lett.* **1996**, *37*, 6029-6032
- ^{xxviii} Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778
- ^{xxix} Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V.; *Organic letters* **2007**, vol. 9 n 19, 3797-3800
- ^{xxx} Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins* **1997**
- ^{xxxi} E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook, *Anal. Biochem.* 1970, *34*, 595-598.