

UNIVERSITA' DI PISA



Facoltà di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia
Farmaceutiche

Tesi di Laurea:

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI PRECURSORI DI
¹⁸F-DERIVATI DEGLI ACIDI BILIARI PER LA
SPERIMENTAZIONE PET**

Relatore

Prof.ssa Clementina MANERA
Università degli Studi di Pisa

Relatore

Prof. Piero A. SALVADORI
Istituto di Fisiologia Clinica
- CNR Pisa -

Candidato:

Stefano DOCCINI

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM-08

Anno Accademico 2010 – 2011

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Gli Acidi Biliari _____	2
1.1.1 Biosintesi degli Acidi Biliari Primari.....	4
1.1.2 Metabolismo, Riassorbimento ed Escrezione.....	7
1.2 Recettori per gli acidi biliari _____	10
1.2.1 Farnesoid X Receptor (FXR).....	11
1.2.2 TGR5.....	15
1.3 Agonisti dei recettori FXR e TGR5 _____	18
2. IMAGING MOLECOLARE.....	28
2.1 Concetti di Radiochimica _____	34
2.1.1 Il Decadimento Beta nella Tomografia Ad Emissione Di Positroni.....	36
2.2 Molecole Radiomarcate_____	39
2.3 Sintesi di radioisotopi con breve tempo di dimezzamento ____	41
2.3.1 Radiomarcatura con ^{11}C	44
2.3.2 Radiomarcatura con ^{15}O e ^{13}N	45
2.4 Principali reazioni di Radiomarcatura con [18F] _____	46
2.4.1 Sostituzione nucleofila alifatica con fluoruro [18F].....	50
3. REAZIONI DI RADIOMARCATURA IN MICROFLUIDICA	51
4. INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	57
5. PARTE SPERIMENTALE	75

5.1	Materiali e Metodi	76
5.2	Valutazione Analitica per HPLC	77
5.3	Prove di Radiomarcatura	83
5.3.1	Radiomarcatura del 3-piraniil-7mesil UDCA Me Estere (9)	84
5.3.2	Radiomarcatura del 3-acetil-7mesil CDCA Me Estere (13)	86
5.4	Schema 1	89
5.5	Schema 2	93
5.6	Schema 3	95
6.	CONCLUSIONI	98
	BIBLIOGRAFIA:	100

1. INTRODUZIONE

Gli acidi biliari (BA), una famiglia di molecole steroidee generate nel fegato attraverso l'ossidazione del colesterolo, sono da tempo noti per il loro ruolo cruciale nell'assorbimento dei nutrienti della dieta (tra cui colesterolo, acidi grassi e vitamine liposolubili), grazie alle loro proprietà di detergenti anfipatici.

Studi condotti nell'ultimo decennio hanno inoltre rivelato numerose potenziali implicazioni terapeutiche degli acidi biliari, risaltandone le funzioni paracrine ed endocrine legate all'omeostasi del colesterolo, al metabolismo lipidico e glucidico e alla regolazione del sistema immunitario.

Inizialmente con l'identificazione dei recettori nucleari per gli acidi biliari, la ricerca si è focalizzata sugli effetti di tipo genomico (il cui effetto finale è la sintesi di specifiche proteine); solo in seguito all'identificazione dei ricettori di membrana per gli BA accoppiati a proteine G è stato possibile far luce sul loro ruolo come molecole di segnalazione, in grado di esercitare anche effetti di tipo non genomico.

1.1 Gli Acidi Biliari

Gli acidi biliari (BA) sono molecole anfipatiche con scaffold steroideo prodotte a livello epatico a partire dal colesterolo da cui derivano direttamente gli acidi biliari primari che nell'uomo sono rappresentati dall'acido colico (CA) e l'acido chenodeossicolico (CDCA) (fig.1). La struttura dei BA varia ampiamente tra le diverse specie di vertebrati e la diversità chimica del pool che si osserva viene ulteriormente ampliata dalle azioni dei batteri anaerobici dell'intestino che convertono gli acidi biliari primari in decine di acidi biliari secondari e terziari.

La loro funzione principale è quella di disperdere in soluzione acquosa i lipidi insolubili in acqua. Nella fase interdigestiva la bile, sintetizzata dal fegato, viene concentrata nella cistifellea e al bisogno riversata nell'intestino dove, grazie ai sali biliari primari e ad altre sostanze anfipatiche (fosfolipidi e lecitine), facilita la digestione e l'assorbimento dei grassi e delle vitamine liposolubili. Con la sua alcalinità, la bile neutralizza il pH acido delle secrezioni gastriche (HCl), stimola la peristalsi intestinale ed esercita un'azione antisettica nei confronti della flora batterica, inibendo i fenomeni

putrefattivi. Attraverso la bile vengono allontanati dall'organismo anche i prodotti derivanti dalla degradazione dell'emoglobina (bilirubina), sostanze ad azione tossica o farmacologica ed altre di natura endogena (ormoni tiroidei, estrogeni ecc.).

La conversione multistep enzimatica del colesterolo nei rispettivi BA, conferisce agli stessi proprietà di detergenti che sono essenziali per l'esplicazione delle loro funzioni fisiologiche come la formazione epatica della bile l'assorbimento dei lipidi nella dieta e delle vitamine liposolubili a livello dell'intestino tenue. I BA vengono efficientemente riassorbiti a livello del tratto terminale dell'ileo nel quale si accumula una certa massa di BA denominato BA pool, che circola tra intestino e fegato (circolazione enteroepatica). L'esistenza di questo pool circolante garantisce la presenza di concentrazioni adeguate di BA nel lume intestinale. Solo il 5% del riassorbimento del pool sfugge al ciclo ed è perso nell'intestino crasso e infine ed eliminato nelle feci. La perdita fecale dei BA, compensata con la biosintesi "de novo" di BA nel fegato in modo da mantenere la dimensione del pool, rappresenta una delle principali vie per il turnover del colesterolo negli esseri umani e nella maggior parte degli altri mammiferi.

La biosintesi "de novo" dei BA utilizza circa il 90% del colesterolo attivamente metabolizzato nel corpo, mentre il restante 10% rientra nei processi di biosintesi degli ormoni steroidei.

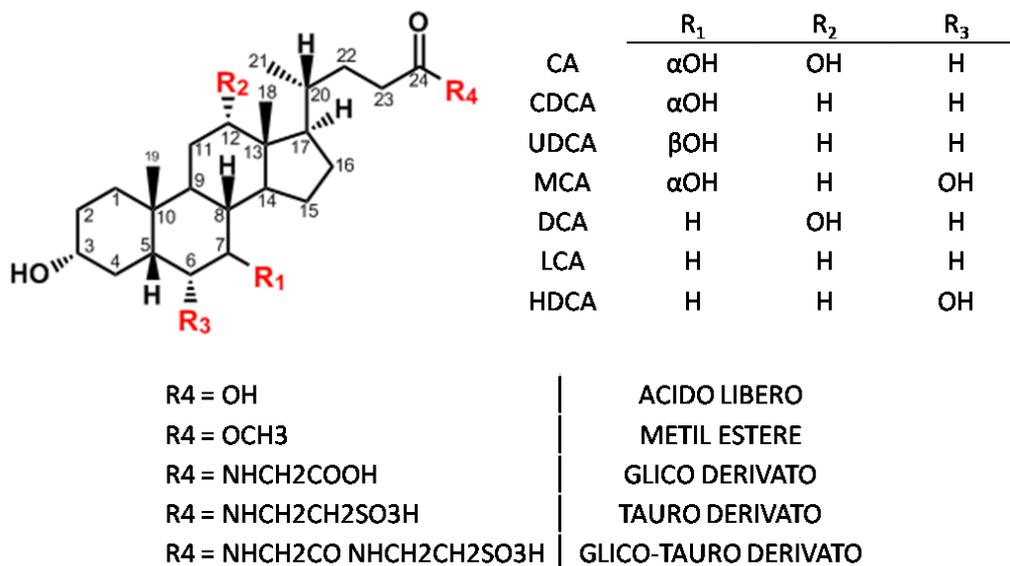


Figura 1 Struttura dei principali acidi biliari

1.1.1 Biosintesi degli Acidi Biliari Primari

La biosintesi degli acidi biliari avviene a partire dal colesterolo attraverso 5 principali trasformazioni (fig.2):

- idrossilazione in posizione 7 α del nucleo steroideo;
- saturazione del doppio legame con formazione di una giunzione cis tra gli anelli;
- inversione di configurazione dell'atomo C₃ con l'ossidrilico che passa da β ad α ;
- eventuale idrossilazione in posizione 12;
- accorciamento della catena laterale di 3 atomi di C con la formazione di un gruppo carbossilico;

La conversione segue percorsi sintetici che includono 17 diversi enzimi, molti dei quali sono preferenzialmente espressi a livello epatico, tra cui sei membri della superfamiglia di enzimi del citocromo P450 ad attività mono-ossidasi, situati nei compartimenti microsomiale e mitocondriale delle cellule.

Si distinguono due distinte vie metaboliche di biosintesi degli acidi biliari: la via classica o neutra e la via alternativa o acida.

La via "classica", specifica del tessuto epatico, produce circa il 75% del pool totale di acidi biliari rappresentato dall'acido colico e acido chenodeossicolico. La biosintesi di queste due molecole segue una reazione a cascata costituita da 14 reazioni catalizzate da enzimi contenuti nel citoplasma, mitocondri e perossisomi degli epatociti.

Il colesterolo viene convertito in 7 α -idrocolesterolo per mezzo della colesterolo 7 α -idrolasi (CYP7A), un enzima microsomiale del citocromo P450 espresso esclusivamente a livello epatico, la cui espressione genetica è regolata da una serie di piccole molecole lipofile tra cui ormoni steroidei della tiroide, colesterolo e altri acidi biliari.

La conversione del colesterolo nell'analogo 7 α -idrossilato costituisce la tappa limitante la velocità del processo sintetico e rappresenta dunque una determinante nella cinetica di reazione.

Il 7 α -idrocolesterolo è poi convertito a 7 α -idrossi-4cholesten-3-one per mezzo di una 3 β -idrossi- Δ 5-C27-steroidi deidrogenasi/isomerasi

microsomale (HSD3B7) che catalizza l'ossidazione del gruppo ossidrile in C-3 e l'isomerizzazione del doppio legame C-5,6 a C-4,5.

Questo composto è l'ultimo intermedio comune, nella via classica, sia per la formazione di acido colico che dell'acido chenodeossicolico.

Per la sintesi di acido colico, il 7 α -idrossi-4cholesten-3-one viene prima idrolizzato in posizione C-12 da una 12 α -idrolasi microsomiale (CYP8B1) e poi ridotto a 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α triolo da due enzimi citosolici: il Δ^{4-3} -oxosteroid-5 β -reduttasi (AKR1D1) e 3 α -idrossisteroide deidrogenasi (AKR1C4).

Una idrolasi mitocondriale (CYP27A1, sterol 27-idrossilasi), ossida la catena laterale dello sterole inserendo un gruppo idrossilico sul C27, che viene successivamente ossidato ad aldeide e poi a gruppo carbossilico formando l'acido 3 α ,7 α ,12 α triidrossi-5 β -colestanoico dal quale si forma a livello dei perossisomi, in seguito al processo di accorciamento della catena laterale di 3 atomi di C, l'acido colico sia in forma libera che come prodotto di coniugazione.

Per la sintesi dell'acido chenodeossicolico, invece, due enzimi citosolici, il Δ^{4-3} -oxosteroid-5 β -reductase (AKR1D1) e il 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C4), riducono il 7 α -idrossi-4cholesten-3-one a 5 β -cholestan-3 α ,7 α -diol, un precursore del CDCA.

È da tempo noto come molecole con la catena laterale idrossilata come 24-idrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo, e 27-idrossicolesterolo vengano impiegati come substrati per la sintesi di BA.

Come ampiamente discusso da Russel [1], i dati disponibili da studi sia sul ratto che sull'uomo, indicano che la formazione di 24-idrossicolesterolo (che è particolarmente importante in quanto consente l'escrezione, seppur di piccole quantità, di colesterolo cerebrale in eccesso) e 25-idrossicolesterolo, contribuiscono solo modestamente alla sintesi BA in termini quantitativi.

Al contrario, la sintesi di BA dal 27-idrossicolesterolo si verifica in quantità rilevanti, negli esseri umani, così come nei topi, attraverso un percorso solitamente indicato come la via "alternativa" di sintesi.

Da questo percorso sintetico si origina principalmente Acido Chenodeossicolico, ed è catalizzato dalla colesterolo-27-idrossilasi (CYP27A1), presente e funzionante sia nel fegato sia in tessuti periferici

come l'endotelio, che contribuisce al trasporto inverso del colesterolo. L'enzima catalizza anche successivi stadi d'ossidazione della catena laterale che portano alla formazione di acido 3 β -idrossi-5-colestenico.

In questo secondo percorso sintetico l'idrossilazione in posizione 7 α è successiva ed è catalizzata dall'enzima ossisterolo-7 α -idrossilasi (CYP7B1), presente, come per il CYP27A1, sia nei tessuti periferici che nel fegato e porta in questo caso alla formazione di acido 3 β -7 α -idrossi-5-colestenico.

Una 3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid deidrogenasi / isomerasi microsomiale (HSD3B7), catalizza come nella via classica, l'ossidazione del gruppo ossidrile in C-3 e l'isomerizzazione del doppio legame C-5,6 a C-4,5 formando in questo caso l'acido 7 α -idrossi-3-osso-4-colestenico che, una volta convertito enzimaticamente ad acido 3 α -7 α -diidrossi-5 β -colanoico, si lega al CoA andando ad ultimare nei perossisomi epatici le fasi di accorciamento della catena laterale, e formazione di CDCA in forma libera e sotto forma di prodotti di coniugazione.

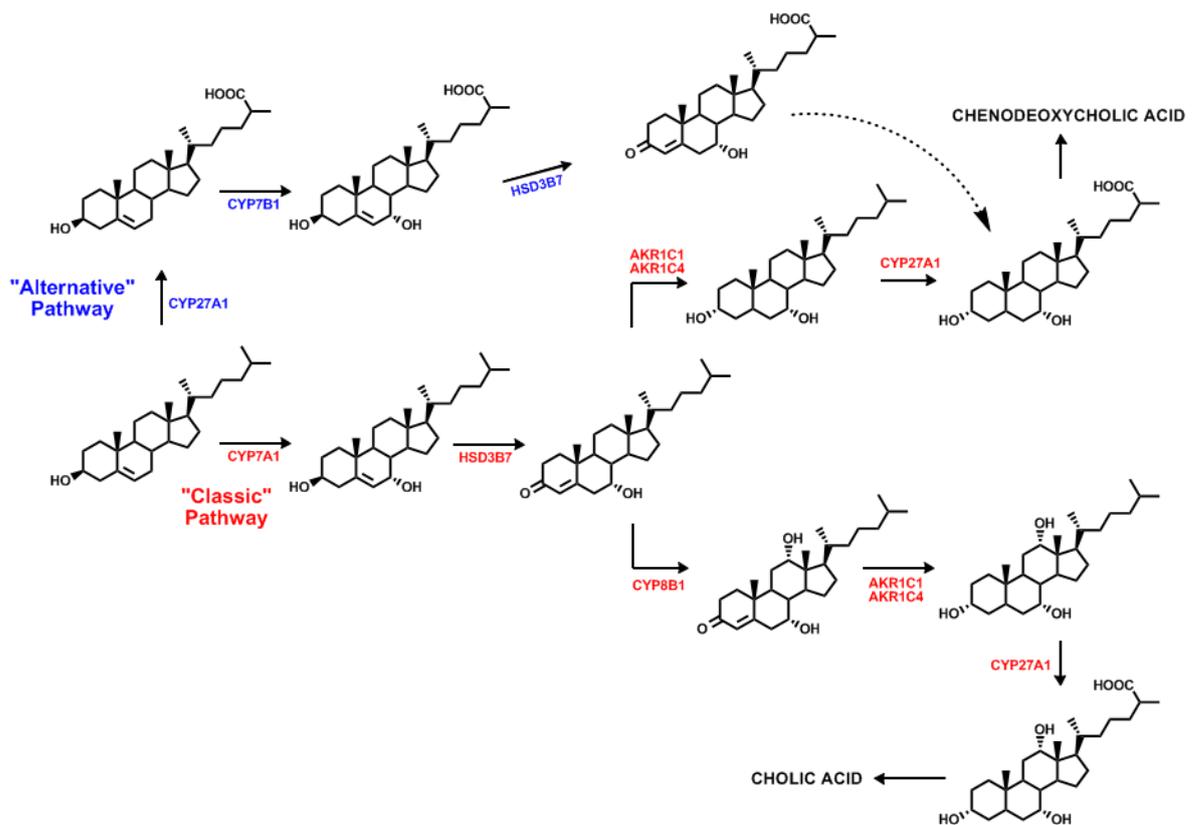


Figura 2 Biosintesi degli acidi biliari

L'acido 3 α ,7 α ,12 α -tri idrossi-5 β -colestanoico ed il 5 β -colestan-3 α ,7 α -diolo, derivanti sia dalla via classica di sintesi che da quella alternativa, vengono legati al CoA tramite un bile acid CoA synthetase (BACS) o very long chain acyl CoA synthetase homology 2 e trasportati all'interno dei perossisomi (fig. 3).

A questo livello le molecole subiscono un ciclo di β -ossidazione (lo stesso coinvolto nella biosintesi di acidi grassi) che porta ad una perdita di 3 atomi di carbonio dalla catena laterale (sottoforma di propionil CoA).

Quattro enzimi perossisomiali sono coinvolti nella reazione di β -ossidazione: il 2-methylacyl-CoA racemase, il branched-chain acyl CoA oxidase 2, il D-type bifunctional enzyme (o 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase) e il thiolase 2.

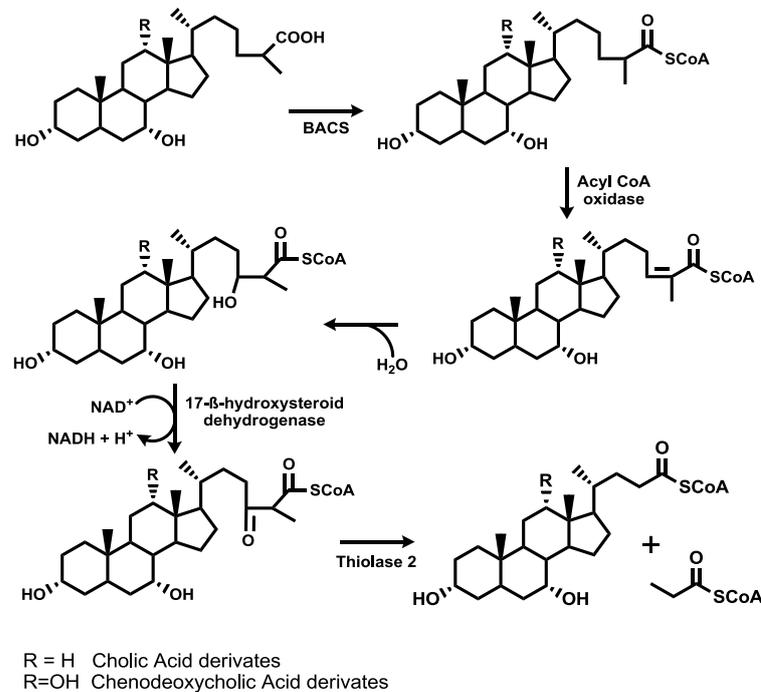


Figura 3 Beta ossidazione degli acidi bilari

1.1.2 Metabolismo, Riassorbimento ed Escrezione

Il metabolismo dei CoA-derivati degli acidi biliari, ha inizio a livello epatico mediante una reazione di coniugazione (N-acil amidazione) a livello del C-24, con gli aminoacidi glicina o taurina per mezzo dell'enzima aminoacid N-acyltransferase. Tale modifica riduce il valore di pKa del pool di metaboliti a

~ 5 favorendo, a pH fisiologico, la forma ionizzata e quindi la solubilità nella bile.

I sali biliari così formati, vengono trasportati attivamente alla cistifellea attraverso la membrana canalicolare. Dopo un pasto, la liberazione di colecistochinina dal duodeno stimola la cistifellea a contrarsi, provocando l'afflusso di bile nel duodeno.

A livello intestinale invece, gli acidi biliari contenuti nella bile vengono in parte deconiugati e deidrossilati ad opera dell'enzima 7- α -deidrossilasi prodotto dalla flora batterica dell'intestino ed i prodotti di queste reazioni, chiamati acidi biliari secondari, sono rappresentati principalmente dall'acido desossicolico e dall'acido litocolico, rispettivamente derivati dall'acido colico e da quello chenodesossicolico.

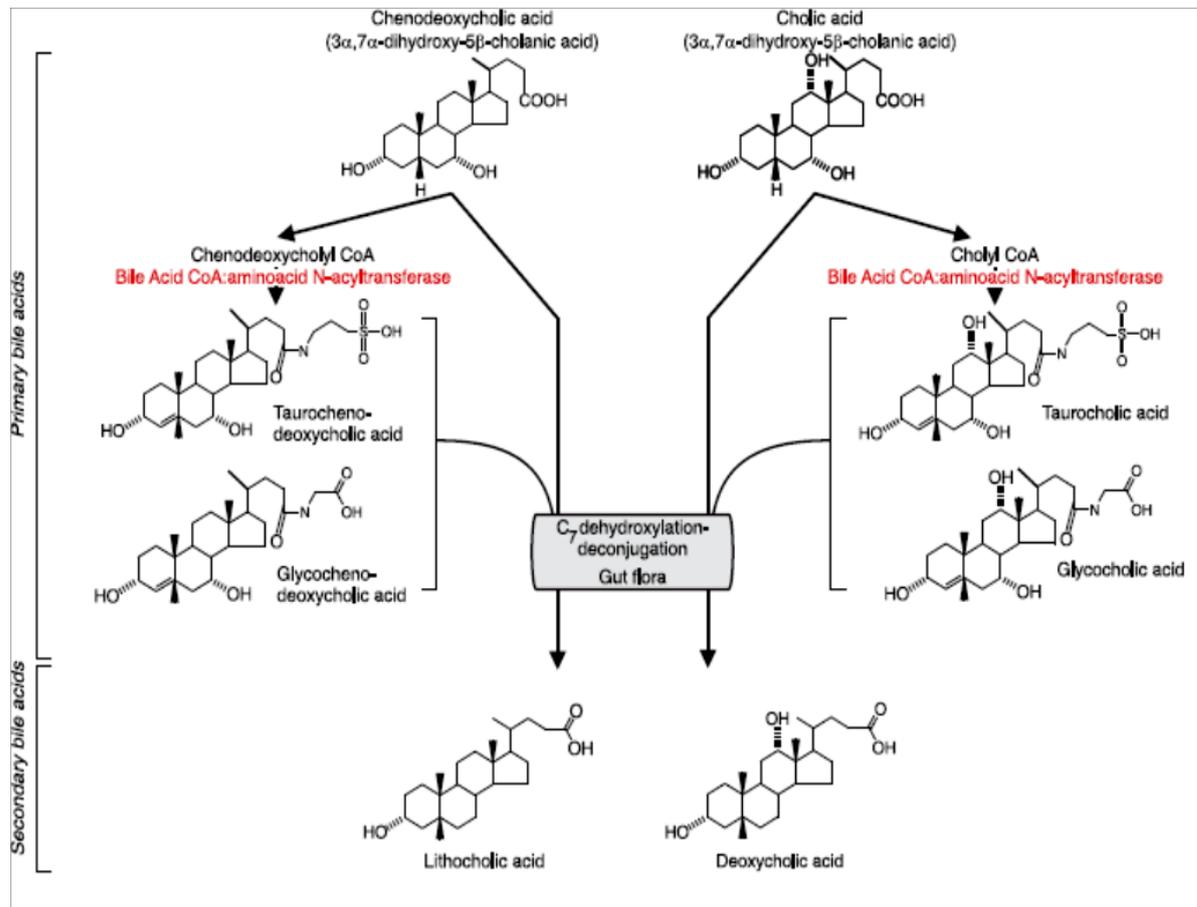


Figura 4 Metabolismo degli acidi biliari

Una adeguata concentrazione di acidi biliari viene mantenuta nel duodeno, digiuno e ileo prossimale dove ha luogo la digestione e l'assorbimento dei lipidi. È a livello dell'ileo distale che invece si compie il processo di riassorbimento degli acidi biliari, che sfrutta sistemi di trasporto attivo ad alta affinità. Una volta immessi nel flusso sanguigno, i sali biliari formano complessi con le proteine plasmatiche e tramite il circolo portale, tornano al fegato dove vengono efficientemente eliminati dalla circolazione attraverso dei trasportatori attivi presenti nei sinusoidi e sulle membrane canalicolari degli epatociti e nuovamente secreti nella bile. Questo processo è noto come circolazione enteroepatica degli acidi biliari ed ogni molecola è in grado di completare da 4 a 12 cicli enteroepatici al giorno.

Complessivamente la maggior parte (94-98%) degli acidi biliari presenti a livello intestinale viene riassorbita e ricondotta al fegato. Nel tenue e nel colon si ha un riassorbimento passivo che diventa attivo solo nell'ileo terminale (porzione conclusiva del tenue). Soltanto una piccola parte degli acidi biliari viene eliminata con le feci; tale quota è rappresentata per lo più dall'acido litocolico e deossicolico, scarsamente riassorbiti (fig.5).

La loro concentrazione inoltre, influenza la sintesi de-novo di acidi biliari, che risulta tanto più stimolata quanto minore è la quota di acidi biliari riciclabili (quelli secondari riassorbiti a livello intestinale). Grazie a questo efficiente ricircolo, solo una piccola quantità di acidi biliari raggiunge la circolazione sanguigna per esplicare effetti sistemici derivanti dall'attivazione dei recettori per gli acidi biliari. Ciò indica che l'attivazione di tali recettori è fisiologicamente limitata e si esplica in maniera evidente solo in seguito alla somministrazione degli stessi ligandi endogeni o di agonisti sintetici.

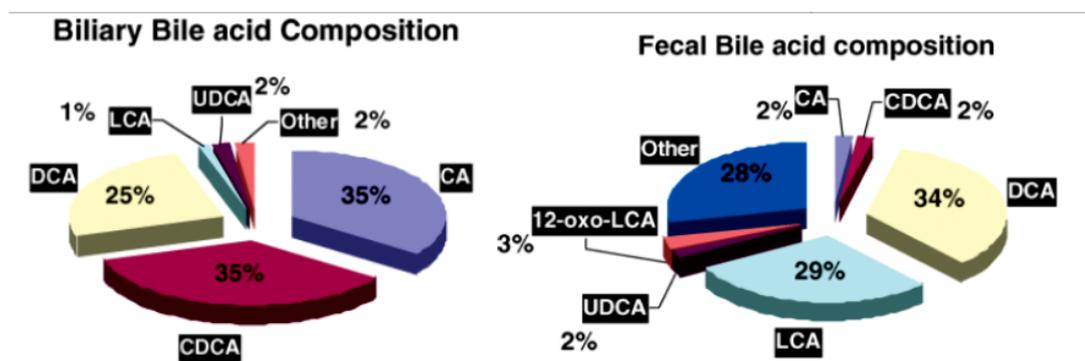


Figura 5 Composizione del pool degli acidi biliari

1.2 Recettori per gli acidi biliari

Oltre al loro fondamentale ruolo nell'assorbimento dei nutrienti, gli acidi biliari sono molecole di segnalazione che esplicano effetti di tipo sia genomico che non genomico attraverso l'attivazione dei recettori TGR5 (conosciuto anche come M-BAR, GP-BAR1 o BG37) [2] [3], recettori accoppiati alle proteina G, recentemente identificati come i primi recettori di membrana plasmatica per gli acidi biliari ed i membri appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari per gli ormoni quali il farnesoid X receptor (FXR) [4] [5], il recettore costitutivo per l'androstano (CAR, NR1H3), il pregnane X receptor (PXR, NR1H2) ed il recettore per la vitamina D.

I recenti progressi sullo studio dei percorsi di segnalazione innescati dall'attivazione dei recettori per gli acidi biliari, hanno promosso i recettori TGR5 e FXR come i meglio caratterizzati e plausibili target per i disordini dell'omeostasi del glucosio e dei lipidi. I ligandi TGR5 riducono i livelli di glicemia e aumentano la spesa energetica mentre gli agonisti FXR, reprimono la sintesi degli acidi biliari endogeni e riducono i livelli plasmatici di trigliceridi, glucosio e di colesterolo. Lo sviluppo di molecole attive su questi recettori potrebbe pertanto fornire nuove potenziali opportunità di trattamento dei disordini metabolici e fare luce sui numerosi percorsi di segnalazione che coinvolgono la loro attivazione.

1.2.1 Farnesoid X Receptor (FXR)

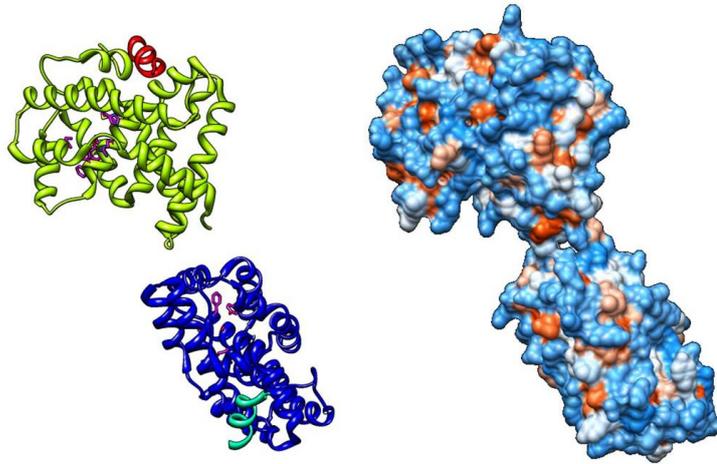


Figura 6 Immagine 3D del recettore FXR

Isolato nel 1995 per mezzo di un sistema di clonaggio YAC (Yeast Artificial Chromosome) e identificato nel 1999 come recettore per gli acidi biliari, il Farnesoid X receptor (FXR) è un recettore appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per gli ormoni. È espresso principalmente nel fegato e nell'intestino ma è presente in quantità significative nei tessuti ricchi di colesterolo, come ad esempio la ghiandola surrenale ed il tessuto adiposo.

Come una sorta di sensore per gli acidi biliari, FXR regola la sintesi e l'azione pleiotropica (i geni coinvolti nella biosintesi e nel trasporto degli acidi biliari influenzano a loro volta numerosi aspetti dell'espressione genetica) degli acidi biliari endogeni e protegge dall'accumulo tossico di BA incrementando il metabolismo di fase 2 e la secrezione della bile nei canalicoli, promuovendo in tal modo il flusso biliare.

L'attivazione recettoriale inibisce la sintesi dei BA dal colesterolo, reprimendo indirettamente l'espressione del CYP7A1, l'enzima chiave che catalizza la reazione che limita la velocità del processo di conversione del colesterolo in acidi biliari. L'inibizione del CYP7A1 coinvolge l'attivazione del recettore nucleare orfano (SHP, small heterodimer partner) (fig.7). FXR controlla inoltre l'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nel trasporto degli acidi biliari, tra cui le IBABP (intestinal bile acid-binding protein) e le BSEP (bile salt export pump).

L'attivazione FXR coinvolge processi molto diversi tra loro che costituiscono un'intricata rete di interazioni legate al metabolismo degli BAs.

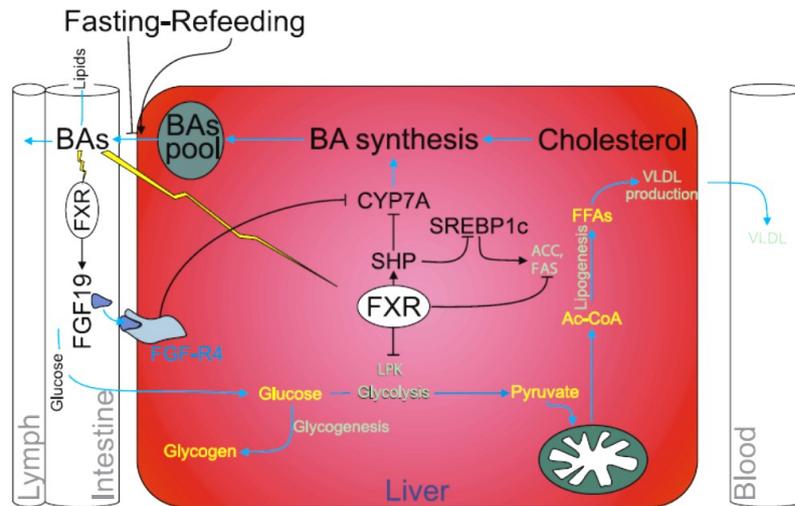


Figura 7 Percorso di segnalazione FXR-mediato

I principali meccanismi d'azione attualmente studiati riguardano la sua implicazione nell'utilizzo del glucosio attraverso la regolazione della gluconeogenesi e glicogenolisi, la regolazione della sensibilità periferica all'insulina nel muscolo striato e nel tessuto adiposo, l'infiammazione e il cancro.

Nella regolazione epatica del metabolismo del glucosio, FXR induce l'espressione della PEPCK (trasportatore del fosfoenolpiruvato), un enzima chiave nel processo di gluconeogenesi la cui espressione è indotta anche da iperglicemizzanti quali glucagone e corticosteroidi. L'insulina invece sopprime la gluconeogenesi epatica reprimendo l'espressione della PEPCK.

Poiché il diabete di tipo 2 è caratterizzato da un aumento dell'escrezione epatica di glucosio, che contribuisce ad accelerare l'iperglicemia, la modulazione farmacologica dell'espressione gluconeogenica, offre un'importante possibilità per lo studio di target innovativi nel trattamento di questa forma di diabete.

L'attivazione FXR comporta inoltre un aumento della secrezione del fattore di crescita dei fibroblasti FGF19 a livello dell'intestino tenue e tale evento inibisce la biosintesi di BA attraverso un percorso di segnalazione indipendente e alternativo all'attivazione del recettore nucleare orfano SHP nella regolazione degli BA [6] (fig.7). Studi condotti agli inizi del 2000 hanno

mostrato come l'aumento dell'espressione del fattore FGF19, migliori la velocità del metabolismo degli acidi biliari e riduca il peso corporeo.

Recenti studi [7] mostrano come gli acidi biliari endogeni, così come gli agonisti sintetici FXR, inducono una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi andando a ridurre l'espressione epatica del fattore di trascrizione SREBP1c (sterol response element binding protein 1c) e modulando la via epatica della litogenesi de novo, una sorgente di acidi grassi impiegata nell'assemblaggio del VLDL (lipoproteine a densità molto bassa). L'acido chenodeossicolico (CDCA) riduce l'accumulo epatico di trigliceridi e la secrezione di VLDL.

Numerosi dati contrastanti sono inoltre disponibili sulle implicazioni dei recettori FXR sul metabolismo dell'LDL (lipoproteine a bassa densità) e dell'HDL (lipoproteine ad alta densità).

Studi in vitro che utilizzano linee cellulari di epatociti umani [8] dimostrano che CDCA aumenta l'espressione del gene che codifica per il recettore dell'LDL (LDL-R) e ne potenzia l'attività. Questo effetto è attualmente studiato per i potenziali effetti nella prevenzione dell'arteriosclerosi.

Dalla letteratura, otteniamo tuttavia evidenti discrepanze tra i risultati ottenuti in vivo da quelli ottenuti in vitro, dovuti con tutta probabilità a percorsi di segnalazione a livello epatico e intestinale non osservabili durante gli studi in vitro.

Anche il flusso transepatico degli acidi biliari influenza i livelli di LDL, HDL VLDL e trigliceridi attraverso effetti genomici FXR-mediati. Un basso flusso trans epatico di BA coincide con una diminuzione dei livelli di LDL e colesterolo e un incremento dei livelli di trigliceridi, VLDL e HDL attraverso una riduzione dell'attivazione del percorso di segnalazione dell'FXR.

Un alto flusso trans epatico di BA induce invece l'attivazione dei recettori FXR ed è correlato con un aumento dei livelli di LDL e colesterolo nel siero e una diminuzione di HDL, VLDL e trigliceridi.

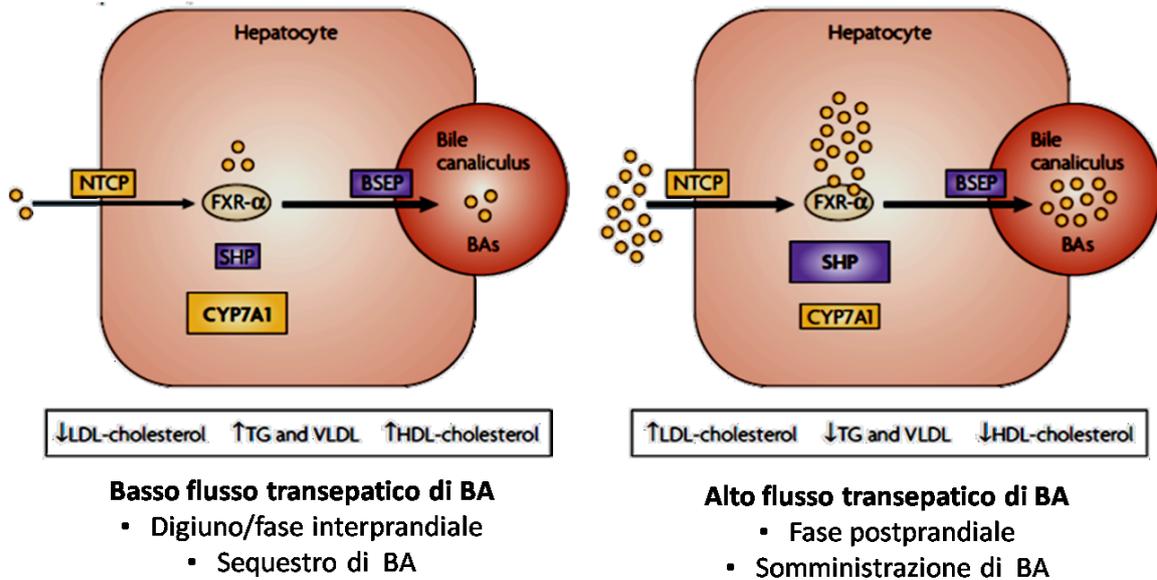


Figura 8 Effetti genomici FXR-mediati e indotti dal flusso transepatico di BA

FXR esplica un marcato effetto anche sul metabolismo dell'HDL, che trasporta il colesterolo dagli organi periferici al fegato, dal quale viene escreto sia come colesterolo libero, sia come prodotto di conversione in acidi biliari.

Reprime l'espressione del gene apoA-I che codifica per l'apolipoproteina, il principale costituente proteico dell'HDL. L'inibizione della sintesi di apoA-I induce quindi una riduzione dei livelli di HDL.

L'attivazione di tale recettore che determina un aumento dei livelli di LDL e contemporaneamente una riduzione dei livelli di HDL è associata ad un suo effetto negativo nel processo di formazione di placche arteriosclerotiche.

Il recettore FXR viene attualmente studiato come target nel trattamento della colelitiasi, colestasi, iperlipidemia e diabete mellito. Inoltre, l'attivazione FXR può essere utile nella riduzione dei livelli dei trigliceridi nel fegato e nel siero nelle condizioni di ipertrigliceridemia, sindrome metabolica, diabete di tipo 2, steatopatia non alcolica e obesità. Gli agonisti FXR modulano il metabolismo dei lipidi e promuovono effetti anti infiammatori e antifibrotici a livello renale, suggerendone un potenziale utilizzo nel trattamento delle nefropatie diabetiche e altri disordini fibrotico-renali [9].

1.2.2 TGR5

Il recettore TGR5 è uno specifico recettore metabotropico di membrana accoppiato alle proteine G e attivato dagli acidi biliari, appartenente alla sottofamiglia dei recettori rodopsino-simili [10].

Originariamente considerato un GPCR orfano, recentemente il TGR5 è stato riclassificato come il capostipite della sottoclasse recettoriale di GPCRs per gli acidi biliari ed ha consentito di far luce su numerosi aspetti riguardanti la loro omeostasi.

Il TGR5 è stato identificato agli inizi del 2000 come recettore attivato da LCA (Lithocholic acid), il suo ligando fisiologico che attiva il recettore a concentrazioni nell'ordine del nano molare ($EC_{50}^{LCA} = 300nM$, $EC_{50}^{LCA\text{-tauro derivato}} = 600nM$). Altri acidi biliari come CA, DCA e CDCA attivano il recettore a concentrazioni micro molar.

Il recettore TGR5 comprende 7 eliche trans membrana (TMH1-7), tre loops extracellulari (ECL1-3) coinvolti nell'interazione con il ligando e tre loop intracellulari coinvolti nel processo di segnalazione.

Il secondo loop intracellulare ICL2, parte del terzo ICL3 ed il segmento C-terminale costituiscono una struttura flessibile e disordinata coinvolta nell'interazione con la proteina G (fig.9).

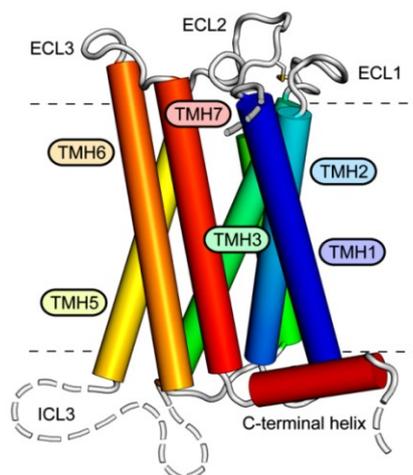
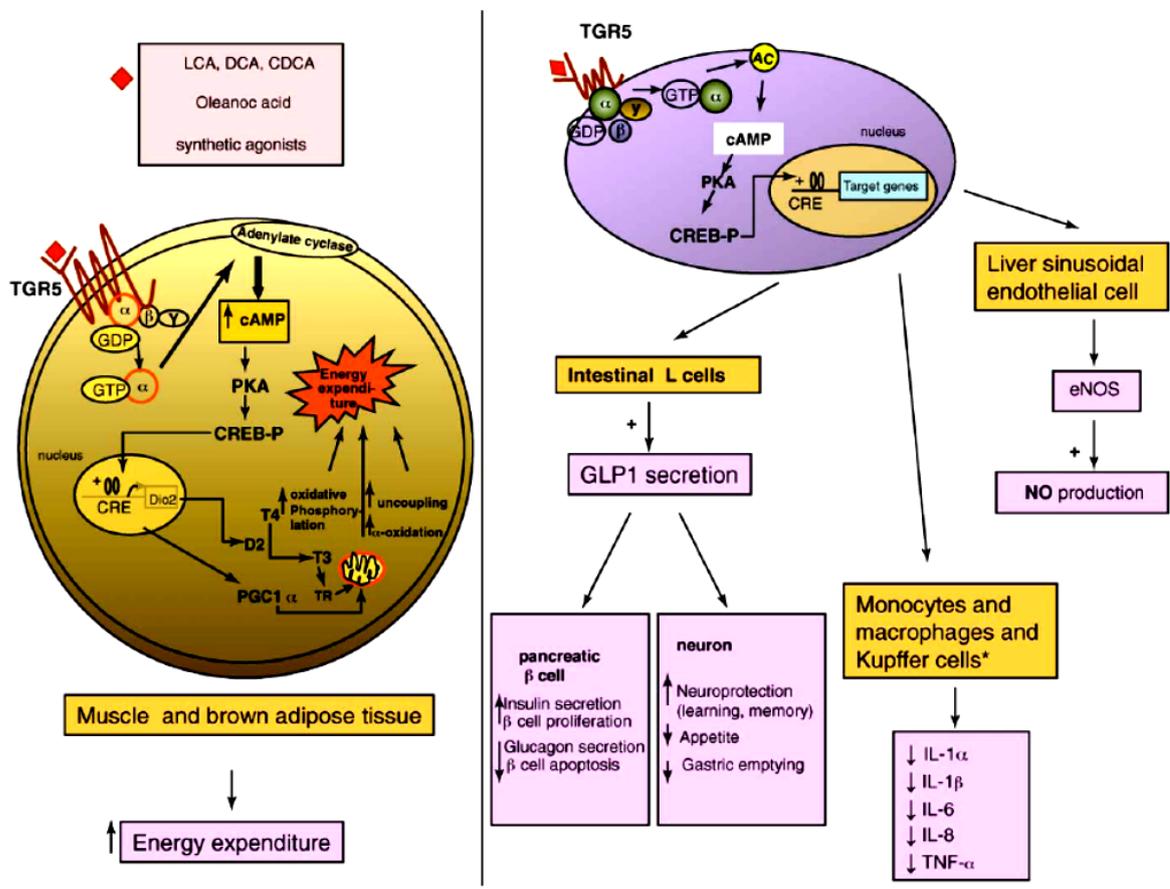


Figura 9 Struttura del recettore TGR5

L'interazione di un ligando con il recettore innesca il processo di internalizzazione in cui i recettori presenti sono inglobati in specifiche

vescicole a livello della membrana e perdono la capacità di trasdurre il segnale. Questo meccanismo di autoregolazione ha la funzione di diminuire il numero dei recettori disponibili in modo non distruttivo, senza quindi che vi sia bisogno di sintetizzarne di nuovi una volta riattivato il percorso di trasduzione, che si verifica rapidamente con la riesposizione dei recettori sulla superficie della membrana.

Sulla superficie interna della membrana si verifica il legame tra il recettore e la guanosina 5-O-3 trifosfato GTP- γ -S, un analogo della GTP resistente all'idrolisi, che rilascia la subunità $G\alpha$ dando il via alla trasduzione del segnale (fig.10)



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 10 Effetti mediati dai recettori TGR5 nelle cellule del sistema immunitario, intestinali, epatiche e nei tessuti metabolici

L'aumento intracellulare dei livelli di cAMP, che si verifica in conseguenza al rilascio della subunità $G\alpha$, consente la fosforilazione di un CREB (cAMP response element binding protein), una proteina che agisce da fattore di trascrizione attraverso il legame a sequenze di DNA dette cAMP response

element (CREs) contenuti all'interno dei promotori dei gene bersaglio (In biologia un promotore è una regione di DNA costituita da specifiche sequenze dette consenso, alla quale si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene). Le sequenze di DNA cAMP response elements (CREs), rappresentano a loro volta un fattore di trascrizione in quanto agiscono direttamente sulla modulazione della trascrizione di un determinato gene.

In tal senso gli acidi biliari sono molecole di segnalazione che esplicano, attraverso l'attivazione dei TGR5, effetti non genomici.

Nei tessuti metabolici come il BAT (tessuto adiposo bruno) ed il tessuto muscolare, l'attivazione dei TGR5 induce l'aumento dei livelli di cAMP che porta all'attivazione del gene che codifica per l'enzima D2 (iodotironina deiodinasi di tipo 2). Questo enzima, oltre a modulare il processo di attivazione e inattivazione dell'ormone tiroideo, svolge un ruolo vitale nel controllo dell'energia omeostatica e nel processo di termogenesi adattativa del tessuto adiposo bruno.

Nei macrofagi, monociti e nelle cellule del Kupffer (macrofagi specializzati localizzati nel fegato), l'attivazione dei TGR5 inibisce il rilascio di citochine (ILs Interleuchine e TNF- α Tumor Necrosis Factor).

Nel fegato, l'attivazione dei TGR5 induce l'aumento dell'attività eNOS con conseguente aumento dei livelli di NO con effetto epatoprotettivo.

Nell'intestino tenue e nel colon, l'attivazione delle cellule enteroendocrine (cellule L) da parte degli acidi biliari attraverso una stimolazione TGR5-dipendente, provoca il rilascio di GLP1 (Glucagon-like peptide 1), secreto dopo i pasti per il controllo dei livelli glicemici che si compie secondo modalità differenti:

- a livello delle cellule β del pancreas stimola il rapido rilascio di insulina e induce la trascrizione del gene per l'insulina, in modo da ristabilire le sue riserve.
- diminuisce la secrezione di glucagone (antagonista dell'insulina) da parte delle cellule alfa del pancreas;
- rallenta la motilità e dunque lo svuotamento gastrico (rendendo più "soft" la curva glicemica postprandiale) e diminuendo l'appetito.

Il GLP-1 è rapidamente degradato a peptide inattivo (cioè è disattivato) dall'enzima DPP-4 (dipeptidil-peptidasi IV). Poiché la produzione di GLP-1 diminuisce col diminuire della glicemia e la sua permanenza attiva è di soli 1-2 minuti il suo controllo sulla glicemia è calibrato in modo da evitare situazioni di ipersecrezione di insulina.

Gli agonisti selettivi dei TGR5 costituiscono dunque un promettente target nel trattamento dei disordini metabolici e nel diabete di tipo II.

1.3 Agonisti dei recettori FXR e TGR5

Oltre a gli acidi biliari endogeni che attivano sia i recettori FXR che TGR5, in letteratura sono riportati agonisti per i recettori degli acidi biliari che condividono con essi la struttura di tipo steroidea, ma anche nuove classi di agonisti sintetici a struttura non steroidea. Sono state inoltre individuate molecole selettive verso uno dei due recettori, attraverso le quali è stato possibile distinguere tra effetti genomici ed effetti non genomici degli agonisti degli BA, individuare gruppi funzionali importanti per l'attivazione dei due recettori caratterizzandone quindi le principali azioni farmacologiche e fisiologiche e poter tracciare una prima relazione struttura-attività per le diverse classi di composti.

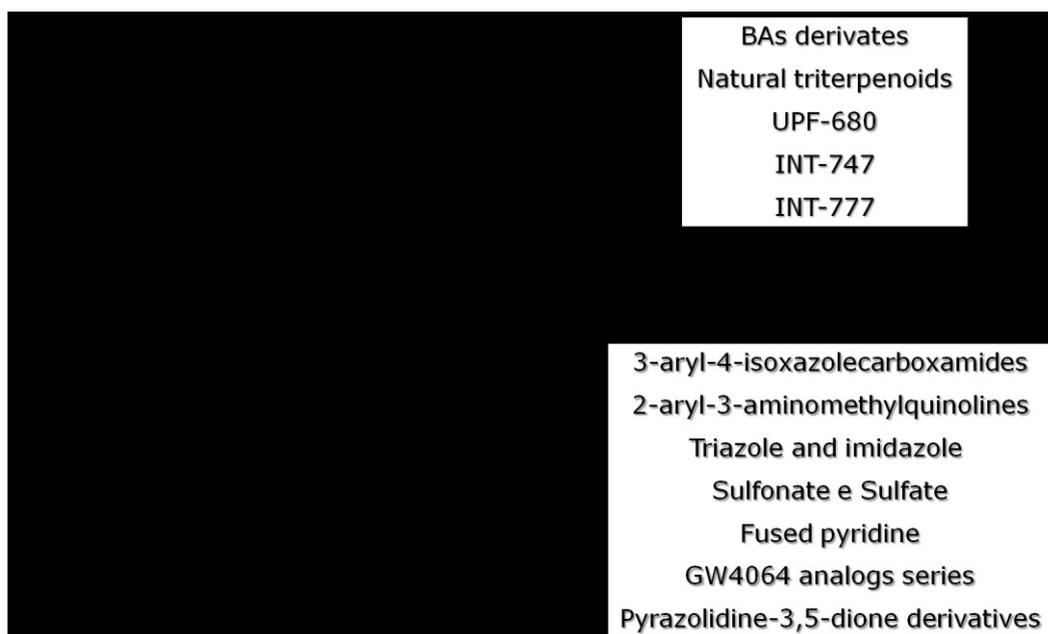
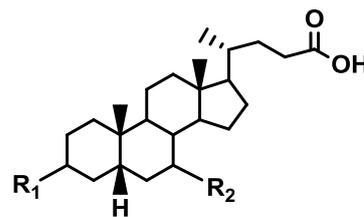


Figura 11 ligandi steroidei e non steroidei dei recettori per gli acidi biliari

I derivati semisintetici degli acidi biliari possono essere distinti sulla base delle modifiche apportate a livello dello scaffold steroideo o sulla catena laterale.

L'analisi delle modifiche introdotte sul nucleo dei BA ha indicato l'importanza della posizione C₃ per l'attività TGR5 [10]. La sostituzione del gruppo 3 α -idrossi impone una drastica diminuzione dell'attività TGR5. La sostituzione in posizione C₇- β con un alchile o un ossidrile è accompagnata da un incremento di attività verso il TGR5 (fig.12). In particolare l'inserimento di un atomo di fluoro in posizione C₇- α dell'LCA, genera un composto circa due volte più attivo dell'LCA e circa 25 volte più attivo dell'acido colico mentre il 7 β -epimero risulta circa quattro volte meno attivo dell'LCA e circa tre volte più attivo dell'acido colico. Dalle modifiche apportate alla catena laterale dei BA è stato possibile osservare come il progressivo accorciamento della catena laterale riduca l'attività sul TGR5.



			TGR5	
Compd	R₁	R₂	EC50	Efficacy
<i>LCA</i>	α -OH	-H	0.58	101
<i>5β-cholic acid</i>	-H	-H	>100	-
<i>LCA-Ac</i>	α -OCOCH ₃	-H	>102	-
<i>7α-F-LCA</i>	α -OH	α -F	0.25	99
<i>7β-F-LCA</i>	α -OH	β -F	2.29	92
<i>CDCA</i>	α -OH	α -OH	6.71	105
<i>7β-Me-CDCA</i>	-H	β -Me	6.18	105
<i>7β-Et-CDCA</i>	-H	β -Et	2.63	99
<i>7β-Pr-CDCA</i>	-H	β -Pr	0.78	108

Figura 12 attività di alcuni ligandi steroidei dei recettori degli acidi biliari in relazione alla sostituzione della posizione C3 e C7

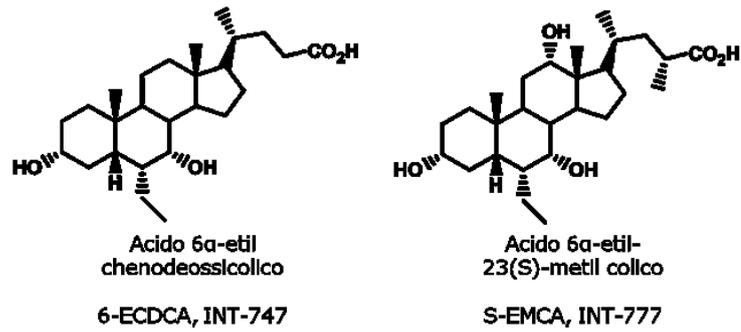
Successivamente è stato studiato l'effetto dell'introduzione di vari sostituenti in posizione C₆ degli acidi biliari e la correlazione con eventuale variazione del profilo di attività dei composti sintetizzati. In particolare è stato osservato un drastico aumento dell'attività agonista rivolta verso i recettori FXR, introducendo un etile in posizione C₆ all'acido chenodeossicolico (FXR-EC₅₀ = 13 mM). Questa scoperta ha portato alla sintesi del composto 6-ECDCA (conosciuto anche come INT-747) (fig.13) dotato di elevata potenza (FXR-EC₅₀ = 0,099 micron), selettività e stabilità [11].

Attualmente il 6-ECDCA è in fase clinica II per la cirrosi biliare primaria e per la steatoepatite non alcolica (NASH "nonalcoholic steatohepatitis", un aumento del contenuto di grasso all'interno delle cellule del tessuto epatico, avvenuto in seguito a un processo infiltrativo o degenerativo). Studi di docking su questo composto nel dominio di legame di FXR, hanno evidenziato un buon fitting a livello di una piccola cavità idrofobica accessoria, responsabile dell'incremento di potenza e selettività.

Dalla ricerca di nuovi agonisti TGR5 dotati di potenza e selettività è stato osservato come l'incorporazione di un gruppo metile nella posizione C₂₃ del CDCA della catena laterale con configurazione S, offra un aumento della selettività e delle proprietà di agonista (anche se non molto potente) verso i recettori TGR5 (TGR5-EC₅₀ = 3,58 mM, FXR-EC₅₀ > 100 mM).

Quando questa caratteristica chimica supplementare è stata introdotta nel 6-ECDCA è stato osservato un notevole cambiamento del profilo di attività.

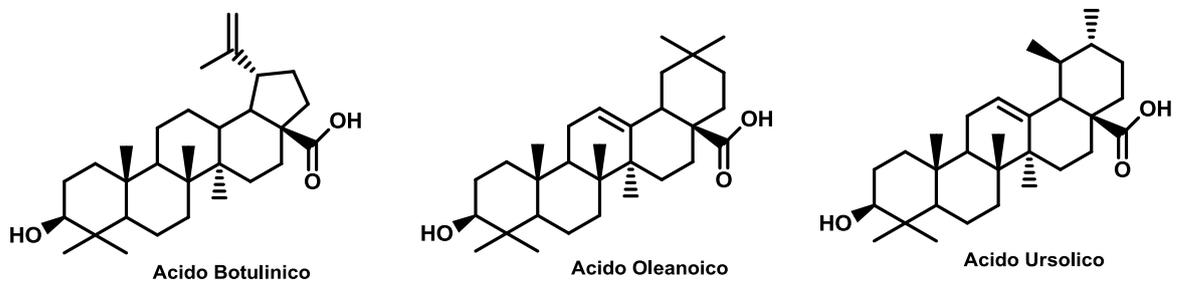
Nel risultante derivato, l'attività FXR era notevolmente diminuita (FXR-EC₅₀ = 11,80 mM) e l'efficacia TGR5 potenziata a concentrazione nanomolari (TGR5-EC₅₀ = 0,095 mM). Il composto in questione è oggi noto col nome di INT-777 (fig.12) [12].



reference compd compd	<i>Alphascreen FXR</i>	<i>FRET (cAMP) TGR5 NCI-H716cells</i>	<i>Transactivations FXR HepG2cells</i>	<i>Transactivations TGR5 HEK297cells</i>	<i>FRET (cAMP) TGR5expressing HEK297cells</i>
	CDCA EC ₅₀ = 10 μ M	LCA EC ₅₀ = 8 μ M	CDCA EC ₅₀ = 8 μ M	LCA EC ₅₀ = 6 μ M	LCA EC ₅₀ = 0,3 μ M
INT-747	0,10 μ M	20 μ M	0,03 μ M	8 μ M	0,50 μ M
INT-777	175 μ M	0,90 μ M	>1000 μ M	1,70 μ M	0,06 μ M

Figura 13 profilo di attività relativo ai composti INT-747 e INT-777

Lo screening biologico di una collezione di triterpenoidi naturali, ha rivelato l'attività agonista verso i recettori TGR5 dell'acido botulinico, oleanico e ursolico (fig.14).



<i>Compd</i>	<i>TGR5</i>		<i>FXR</i>	
	<i>EC₅₀ (μM)</i>	<i>Efficacy</i>	<i>EC₅₀ (μM)</i>	<i>Efficacy</i>
<i>Acido Botulinico</i>	1,04	83	-	-
<i>Acido Oleanico</i>	2,25	72	-	-
<i>Acido Ursolico</i>	1,43	65	-	-

Figura 14 profilo di attività relativo ad alcuni triterpenoidi di origine naturale

L'acido botulinico è stato successivamente scelto come lead compound per la sintesi di composti selettivi verso i TGR5. Tra i prodotti semisintetici più rappresentativi, il 18 dia 2 (fig.15) [13] è sicuramente quello dotato di maggiore potenza e selettività.

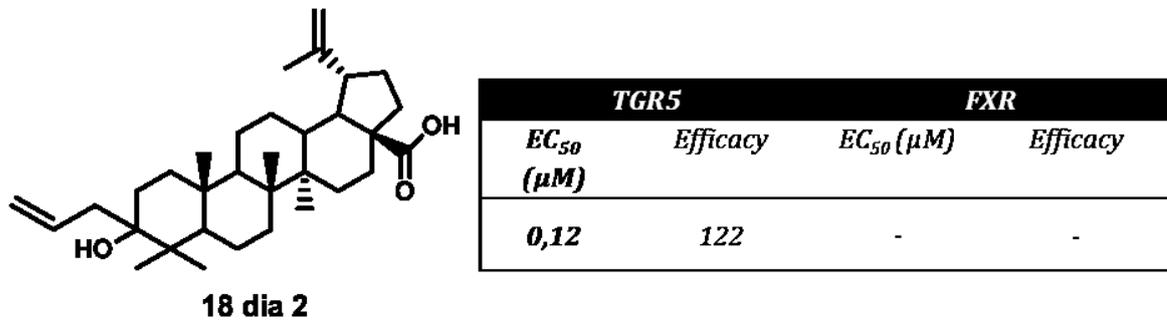


Figura 15 profilo di attività del composto 18 dia 2

Questi studi hanno consentito di svolgere una analisi ligand-based sulla tasca di legame del recettore TGR5 individuando una porzione coinvolta nell'interazione tramite legame idrogeno con il gruppo 3-idrossi degli acidi biliari, una tasca idrofobica che interagisce con le posizioni C₆ C₇ degli acidi biliari ed una tasca che ancora la catena laterale acida. Attraverso la sovrapposizione con il 7α-F-LCA, dotato di maggiore selettività e potenza, si possono osservare le porzioni coinvolte nelle interazioni con il recettore [14] (fig.16).

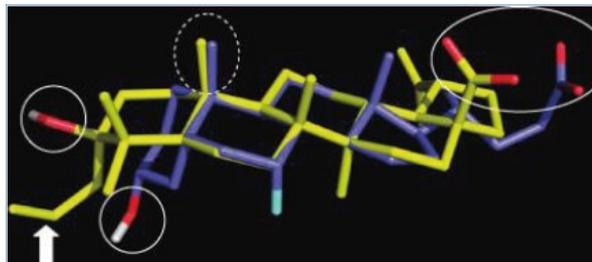


Figura 16 sovrapposizione del composto 18 dia 2 con il 7α-F-LCA

Tali informazioni sono state determinanti per lo studio di nuovi agonisti TGR5 potenti e selettivi.

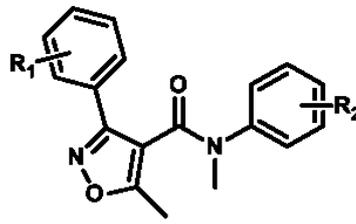
Piccole molecole non steroidee come quelle della classe delle 3-aryl-4-isoxazole carboxamides (fig.17), identificate tramite HTS, hanno mostrato

una azione di tipo agonista verso il recettore TGR5 umano. Tali molecole producono un aumento della secrezione di GLP-1 su colture primarie di cellule dell'epitelio intestinale. Su questi composti sono stati condotti studi di relazione struttura-attività [15] che hanno mostrato come la sostituzione in posizione para dell'anello fenil ammidico, generi composti con un miglior profilo di attività in vitro, rispetto a quelli orto e meta sostituiti.

Inoltre gruppi p-Cl così come p-Me offrono una migliore attività se confrontati con gruppi fortemente elettron ricchi come p-OMe. Una ulteriore indagine è stata effettuata introducendo in posizione para dell'anello fenil amidico, gruppi elettron attrattori come gruppi alchilici ramificati sia ciclici che non ciclici. Modifiche in questa regione hanno evidenziato che piccoli gruppi lipofili sono preferiti. Sostituzioni alchiliche di dimensioni maggiori del metile, mostrano infatti una riduzione della potenza.

L'introduzione di gruppi sull'anello fenilico legato all'isossazolo ha mostrato invece che le orto e meta sostituzioni risultano essere preferite rispetto a quelle in posizione para, eccezion fatta per la sostituzione con cloro che genera in posizione meta e para, composti equipotenti.

Studi ADME hanno infine evidenziato l'importanza dei gruppi alchilici legati all'isossazolo, per la stabilità metabolica del composto.



<i>Compd</i>	R_1	R_2	$TGR5 pEC_{50}$
1	o-Cl	p-Cl	7,5
2	o-Cl	o-Cl	5,7
3	o-Cl	p-Me	6,9
4	o-Cl	p-OMe	6,4
5	o-Cl	p-F	6,3
6	o-Cl	p-CF ₃	7,7
7	o-Cl	p-iPr	5,9
8	o-Me	p-Cl	7,9
9	p-Me	p-Cl	6,0

Figura 17 attività della classe delle 3-aryl-4-isoxazole carboxamides

Studi funzionali di HTS su cellule che esprimono stabilmente il recettore TGR5 umano (hTGR5), effettuati valutando la variazioni dei livelli di cAMP, hanno anche consentito di svelare l'attività TGR5-agonista delle 2-aril-3-aminometil chinoline (fig.18).

compd	R1	R2	TGR5	
			hTGR5 EC50 (µM)	mTGR5 EC50 (µM)
1		OMe	0,88	3,9
2		OMe	0,097	3,7
3		OMe	0,065	3,2

Figura 18 attività della classe delle 2-aril-3-aminometil chinoline

La relazione struttura-attività [16] ha mostrato la scomparsa dell'attività dei composti con gruppi benzilaminici (R_1) orto e meta sostituiti. Al contrario gruppi benzilaminici para-sostituiti inducono un miglioramento del profilo di attività sia sui recettori TGR5 umani che sui TGR5 di topo. La sostituzione della benzilamina con fenetilamina ha portato ad un'ulteriore aumento di attività (compd **1** e **2** fig.18) , in particolare sul hTGR5. La sostituzione dell'anello chinolinico nelle posizioni 4, 5, 6, e 8 non risulta ben tollerata a differenza dell'introduzione di un metossile nella posizione 7 che ha generato un composto con elevata potenza (compd **3** fig.18).

Altre classi di composti come triazoli e imidazoli, piridine fuse e derivati pirido-pirimidinici sono attualmente studiate come agonisti o modulatori del recettore TGR5 (fig.19).

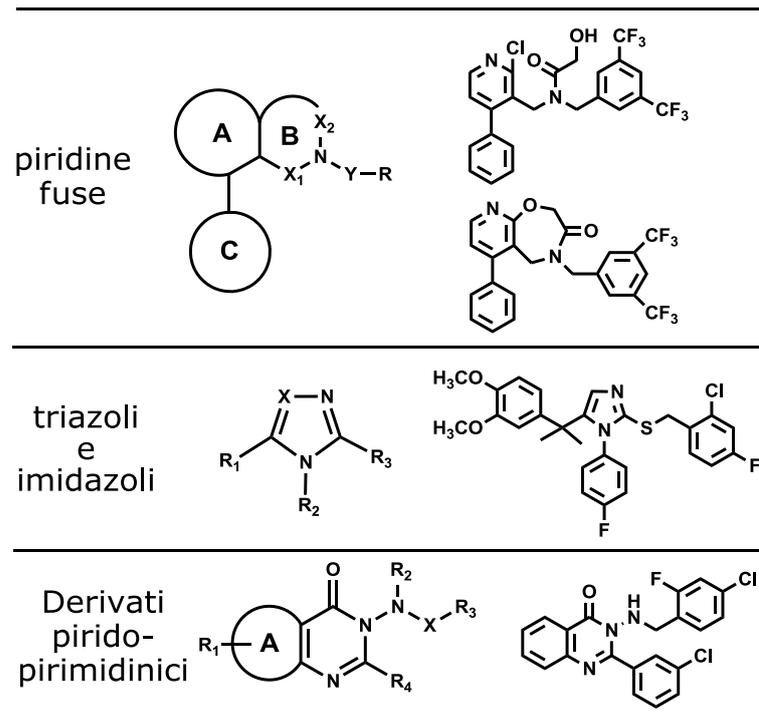


Figura 19 altre classi idi composti con attività agonista o modulatrice verso il recettore TGR5

Sono state inoltre individuate nuove classi di composti non steroidei con attività FXR-agonista. Tra questi, il primo derivato sintetico descritto in letteratura è il derivato ossazolico GW4064 (fig.20) [17], un potente attivatore dei recettori FXR, considerato uno dei più promettenti lead nello studio di farmaci FXR-agonisti.

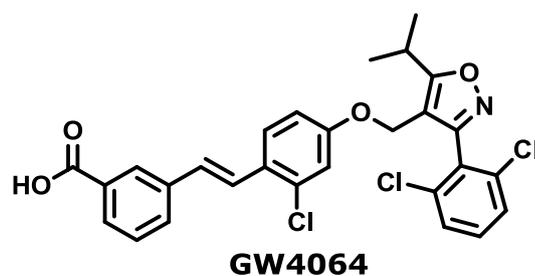


Figura 20 struttura chimica del derivato GW4064

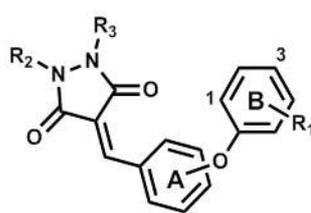
Il suo impiego in ambito terapeutico è tuttavia molto discutibile a causa della presenza della porzione trans-stilbenica, un potenziale tossicoforo che inoltre conferisce alla molecola fotolabilità. Sono stati sintetizzati diversi analoghi di questo composto senza la porzione trans-stilbenica che però non hanno mostrato attività significativa.

Altre modificazioni sulla molecola sono state effettuate nel tentativo di migliorarne le proprietà di drug-likeness, aumentarne la polarità, migliorarne la biodisponibilità oltre naturalmente ad aumentare la potenza verso il recettore FXR. Dalla serie di composti analoghi del GW4064 non è ancora stato possibile tracciare un profilo preciso di relazione struttura-attività.

Attraverso tecniche di Virtual Screening è stata inoltre identificata la classe delle pirazolidin-3,5-dione (fig.21) con attività agonista (parziale o totale) verso i recettori FXR. [18]. Sono stati progettati e sintetizzati una serie di composti con questo tipo di scaffold,

effettuando studi di molecular modeling, mirati alla ricerca delle interazioni all'interno del sito di legame dell'FXR.

Da una iniziale analisi di relazione struttura-attività, è stato osservato che introducendo gruppi elettron attrattori come F o CF₃ in posizione 3 al nucleo aromatico B (compd **1** fig.21), si ottiene un incremento dell'attività. Piccole variazioni sono state invece ottenute, modificando la posizione del sostituente sul nucleo aromatico A da meta a para. Mentre l'introduzione di sostituenti acilici in R₂ genera un miglioramento nell'interazione, introducendo due metili in R₂ e R₃ o non sostituendo i due gruppi (compd **2** e **3** fig.21), si ottiene una considerevole perdita dell'attività agonista. Il composto **5** di fig.21, che dagli studi di molecular modeling meglio si inseriva nella tasca di legame ha poi mostrato nei saggi biologici una attività paragonabile a quella del CDCA usato come composto di riferimento.



compd	R ₁	R ₂	R ₃	Posizione del sostituente sull'anello A	FXR EC ₅₀ (μM)
1	4-CF ₃	fenile	H	meta	2,04
2	CH ₃	H	H	meta	n.d.
3	CH ₃	CH ₃	CH ₃	meta	n.d.
4	H	benzoil	H	para	3,98
5	H	fenile	Fenile	para	6,17
compd	FXR EC₅₀				
CDCA	6,31 μM				

Figura 21 attività della classe delle pirazolidin-3,5-dione

Il duplice sviluppo di agonisti per i recettori FXR e TGR5 potrebbe fornire nuove opportunità per il trattamento dei disturbi lipidici e glucidici. Tuttavia l'attenzione si è ultimamente rivolta sui percorsi di segnalazione attivati dalla stimolazione dei TGR5 in quanto, tra le numerose azioni biochimiche prodotte, vi è anche l'attivazione del GLP-1 (Glucagon-like peptide 1), non indotta invece dalla stimolazione dei FXR. L'azione di questa incretina naturale (il GLP1) stimola la secrezione di insulina con modalità glucosodipendente, ed esercita altre azioni ipoglicemizzanti proprie di tale ormone, tanto da essere considerata l'ultima frontiera per il trattamento dei disordini metabolici provocati dal diabete di tipo 2. Inoltre l'agonismo selettivo sul recettore TGR5 consente di evitare gli effetti negativi sulla biosintesi dell'HDL indotti degli agonisti FXR.

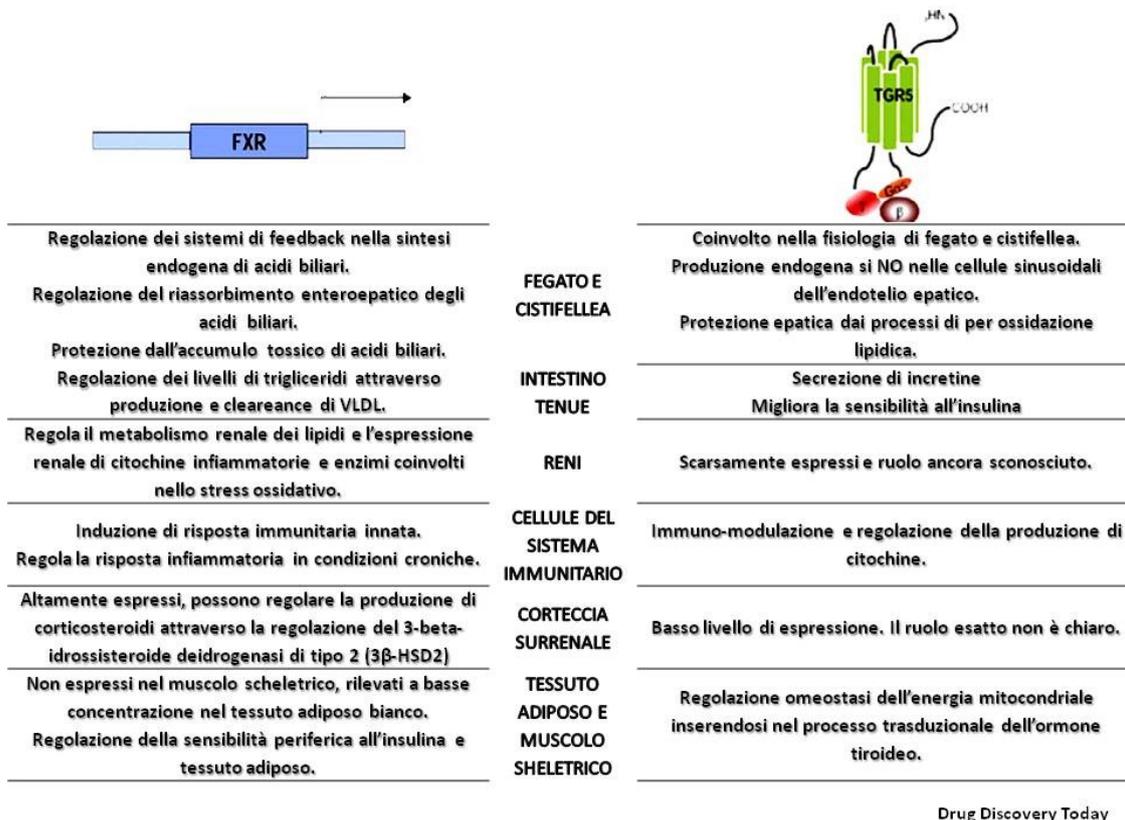


Figura 22 effetti farmacologici indotti dall'attivazione dei recettori TGR5 e FXR

2. IMAGING MOLECOLARE

L'Imaging Molecolare (MI) è una disciplina in continua evoluzione che studia fenomeni biochimici in soggetti viventi attraverso la visualizzazione di eventi cellulari e molecolari anche complessi, che evidenziano determinati stati fisiologici o patologici. L'imaging di vari target molecolari o il loro monitoraggio è solitamente relazionato alla caratterizzazione del decorso di una malattia, spesso correlata alla concentrazione di uno o più di questi target molecolari, o alla sua diagnosi precoce. Per poter visualizzare il target di interesse (solitamente un recettore) è necessario progettare un tracciante (spesso rappresentato da una molecola biologicamente attiva) che trasporti stabilmente un elemento in grado di generare il contrasto nell'immagine.

L'imaging molecolare è inoltre uno strumento di rilevante importanza nel processo di drug discovery e nella validazione di nuovi farmaci così come nel prevedere e monitorare i risultati ottenuti da diversi tipi di terapie.

La maggior parte delle tecniche MI viene eseguita mediante introduzione di un probe molecolare che sarà in seguito rilevabile nel soggetto vivente. I probe impiegati sono spesso derivati di prodotti farmaceutici e solitamente sono in grado di interagire con gli stessi loro target molecolari e ciò rende la farmacologia e l'MI saldamente correlate.

Le tecniche di imaging molecolare hanno dunque lo scopo di colmare i limiti dalle tecniche di imaging anatomico più convenzionali come l'ecografia o la tomografia computerizzata e possono contribuire a migliorare la gestione della malattia e la comprensione dei processi biologici di interesse.

Piccole molecole, peptidi, proteine ingegnerizzate e numerosi complessi nano particellari sono tutte molecole impiegabili come probe per l'MI e la possibilità di poter unire alla componente di segnalazione una componente che offra selettività per il target molecolare ed una componente capace di esplicare effetti terapeutici, impone una cooperazione tra i campi della chimica, della medicina nucleare e della chimica farmaceutica. Spesso infatti gli stessi probe utilizzati per l'imaging vengono modificati e impiegati in campo terapeutico.

Sono oggi disponibili probes che permettono di eseguire indagini di imaging molecolare che possono essere estese dal piccolo al grande animale fino all'uomo.

L'iter per l'acquisizione di una immagine realizzata tramite tecniche MI, ha inizio con lo studio dei parametri farmacocinetici e della biodistribuzione del probe impiegato, che consentono di ottimizzare la procedura operativa attraverso una corretta valutazione della via di somministrazione da utilizzare, la quantità di probe da iniettare per ottenere un segnale acquisibile, il rapporto segnale/fondo, così come altri importanti fattori.

Si procede con l'elaborazione quantitativa dei segnali acquisiti con l'immagine attraverso modelli matematici, analisi statistiche, tecniche di ricostruzione e quantificazione dell'immagine, tecniche di visualizzazione 3-D. In molti ma non in tutti i casi, lo step finale consiste nel tradurre il metodo di MI opportunamente ottimizzato, in una strategia che abbia una applicazione clinica.

Attualmente sono state messe a punto molte tecniche di acquisizione di immagini su esseri viventi che si basano sulle diverse modalità di espressione dell'MI probe (fig.23). In particolare il processo di rilevazione esterna del probe può sfruttare reazioni di bioluminescenza (optical imaging) o di γ -fotoni (imaging radionuclide-based).

Resta indispensabile attribuire all'evento biochimico che si vuol indagare, la giusta metodica imaging da utilizzare basandosi sullo studio di parametri quali:

- Sensibilità: indica la capacità di rilevare un probe molecolare, in relazione allo sfondo, misurata in moli per litro.
- Temporal resolution: indica frequenza con cui le immagini possono essere registrate/catturate dal soggetto, una volta avviato il processo di imaging.

Si riferisce al tempo necessario per raccogliere gli elementi sufficienti per generare l'immagine

- Spatial resolution: indica la minore distanza (in mm) tra due oggetti puntiformi che possono essere visualizzati come distinti.
- Limitazioni nell'applicazione clinica o a scopo di ricerca

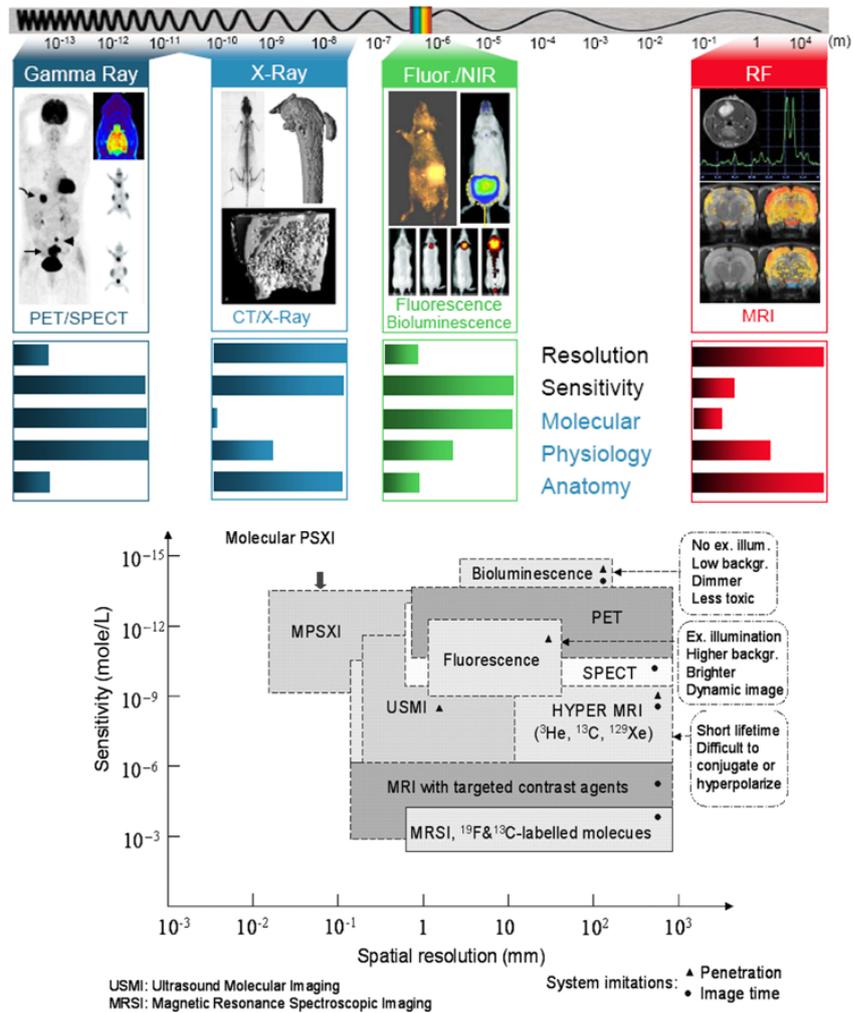


Figura 23 confronto tra le diverse metodiche di imaging

In base a questi parametri rivestono particolare importanza sia nella ricerca che in clinica, metodiche di imaging come la PET e SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), due tecniche diagnostiche tomografiche che consentono di ottenere, in vivo e in modo non invasivo, immagini di distribuzione di un tracciante radioattivo in sezioni dell'organismo.

Entrambe le metodiche forniscono immagini funzionali dell'organo in esame e sono in grado di misurare i cambiamenti biochimici di una malattia ancor prima che possano essere osservati macroscopici cambiamenti di natura anatomica. In tal senso, PET e SPECT si rivelano complementari ad altre tecniche tomografiche, quali la Tomografia computerizzata a raggi x (TC) e la Risonanza Magnetica (RM), che forniscono invece immagini ed informazioni morfologiche.

Queste tecniche di imaging si basano sulla somministrazione di sonde radioattive, che forniscono un segnale rilevabile e differiscono tra loro per i radioisotopi che impiegano: la tecnica PET utilizza radioisotopi ad emissione di positroni (particelle elettriche con carica positiva) di breve durata come ^{11}C (emivita = 6h) e ^{18}F (emivita = 110 min); la SPECT invece si basa sull'uso di composti radioattivi con maggior tempo di dimezzamento, che emettono direttamente radiazioni gamma, come ^{123}I (emivita = 13 h) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (emivita = 6h).

Rispetto alla PET, la tecnica SPECT offre una minore risoluzione spaziale e sensibilità.

Proprio per ovviare alle problematiche che derivano dall'utilizzo di metodiche con bassa sensibilità, i radiotraccianti impiegati vengono progettati affinché possano soggiornare un tempo sufficientemente lungo all'interno dell'organismo in modo da aumentare il tempo di acquisizione, ottimizzando la qualità statistica dell'immagine. Tuttavia l'aumento del tempo di stazionamento del probe all'interno di tessuti viventi, rende la tecnica meno compatibile all'utilizzo clinico.

2.1 Concetti di Radiochimica

Un atomo radioattivo si trasforma spontaneamente emettendo radiazioni ionizzanti, particelle o radiazioni elettromagnetiche, modificando per questo la composizione del nucleo.

La radioattività è dunque frutto della disintegrazione nucleare, cioè della demolizione parziale dei nuclei che tendono a portarsi verso configurazioni sempre più stabili. Il cambiamento della composizione di un nucleo avviene tramite un processo di reazione nucleare. In base alla formula di Einstein, se si conosce con precisione la massa di un nucleo atomico e dei suoi costituenti si può valutare l'energia che esso emette nel corso di reazioni nucleari.

Ciò che ne deriva è spesso un nuclide, un nucleo specifico con un determinato valore di numero atomico numero di massa, detto nucleo figlio, più leggero e chimicamente differente da quello di partenza; in questo caso si parla di trasmutazione nucleare. L'identità del nucleo figlio dipende dalla

variazione del numero atomico e del numero di massa subita dal nucleo progenitore all'atto dell'emissione radioattiva.

Non è detto che un nucleo radioattivo decada direttamente in un nucleo stabile; può accadere che esso decada in un nucleo instabile a sua volta soggetto a decadimento radioattivo. Il processo in cascata continua finché non si giunge a un nucleo stabile. Si parla allora di serie radioattiva.

Molti sono in natura gli elementi chimici e la loro natura chimica viene caratterizzata dal loro nucleo e quindi dai loro protoni. Oltre ai protoni nel nucleo di un elemento chimico, troviamo i neutroni, il cui numero può variare per uno stesso elemento chimico. Varia in tal modo il peso atomico ma le proprietà chimiche dell'elemento restano immutate (fa eccezione in questo l'idrogeno). Uno stesso elemento può avere dunque stesso numero di protoni e stesso numero atomico e diverso numero di neutroni e quindi differente peso atomico. L'elemento ha cioè più isotopi molti dei quali possono emettere radiazioni. In tal caso si parla di radioisotopi.

L'emissione di particelle radioattive avviene in tempi diversi per ciascun nuclide e può durare da milionesimi

di secondo a milioni di anni. Il tempo necessario affinché la metà degli atomi radioattivi inizialmente presenti raggiungano uno stato energetico stabile viene definito tempo di dimezzamento. Tale evento è caratteristico degli isotopi instabili ed avviene ad una velocità costante secondo una cinetica di tipo esponenziale.

Le radiazioni ionizzanti si distinguono in tre tipi:

Radiazioni α : hanno alto potere ionizzante (rapporto di ionizzazione = 10^4) e sono dunque capaci di modificare la materia che attraversano. Sono tuttavia caratterizzate da una bassa penetrabilità e sono pertanto schermabili tramite uno strato di carta.

Radiazioni β : hanno un potere ionizzante 100 volte inferiore rispetto alle radiazioni α ma sono tuttavia dotati di penetrabilità maggiore (vengono schermate tramite una lamina di alluminio).

Radiazioni γ : Sono caratterizzate da un basso potere ionizzante (~ 1) ma elevata penetrabilità (vengono schermate tramite una lamina di piombo)

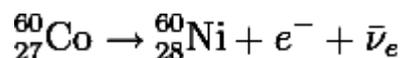
In genere gli elementi pesanti hanno probabilità di emettere radiazioni α , mentre quelle β sono più caratteristiche degli elementi leggeri. La radiazione γ accompagna solitamente una radiazione α o una radiazione β .

2.1.1 Il Decadimento Beta nella Tomografia Ad Emissione Di Positroni

Il decadimento β è uno dei processi per cui nuclidi instabili (e dunque radioattivi) si trasformano in altri nuclidi di atomi che possono a loro volta essere radioattivi (continuando a decadere) oppure stabili. In natura i nuclei sono all'interno degli atomi e questo processo causa la trasformazione dell'intero atomo da un elemento chimico ad un altro con emissione di altre particelle subatomiche secondo il principio di conservazione della massa/energia. Reazioni che comportano un decadimento di tipo β (è in particolare di tipo β^+) vengono impiegate per la produzione di radionuclidi come Fluoro-18, Carbonio-11, Azoto-13, Ossigeno-15 inseriti all'interno di molecole successivamente impiegate come radio traccianti o radiofarmaci per esami scintigrafici (PET) e per altre misurazioni di attività biologica in vivo.

Il decadimento di radioisotopi ad emissione β può avvenire in tre diversi modi:

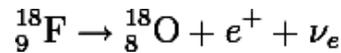
- Decadimento β^- (emissione di negatroni): il nucleo perde un neutrone che viene trasformato (decade) in un protone emettendo un negatrone più un antineutrino elettronico. Il protone resta nel nucleo atomico, mentre le altre due particelle vengono espulse (emesse). Un esempio di decadimento beta meno è il decadimento del radionuclide cobalto-60 (instabile) nel nuclide nichel-60 (stabile), che segue questo schema:



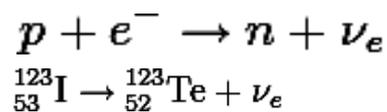
- Decadimento β^+ (emissione di positroni): il nucleo perde un protone che viene trasformato (decade) in un neutrone emettendo un positrone ed un neutrino. Questo tipo di decadimento può avvenire solo in alcuni nuclei oppure, molto di rado, libero (il protone è una particella stabile e

quindi spontaneamente non decade) ma solo in presenza di sufficiente energia avendo il protone una massa inferiore a quella del neutrone.

Un esempio di β^+ è il decadimento del radionuclide fluoro-18 (instabile) nel nuclide stabile ossigeno-18, che segue questo schema:



- Un altro fenomeno correlato, anche se non si tratta di decadimento, ma di cattura è il fenomeno della cattura elettronica, perché comporta la cattura di un elettrone atomico da parte del nucleo, con l'emissione di un neutrino monoenergetico. Per certi versi quest'ultimo processo è simile a quello del decadimento β^+ . Esempio di cattura elettronica è il decadimento del radionuclide iodio-123 (instabile) nel nuclide tellurio-123 (stabile), che segue questo schema:



Il decadimento β è un processo particolarmente legato alla tomografia PET, una tecnica che si basa sulla capacità di rilevare l'emissione di positroni da parte di nuclidi β -emittenti. Il positrone emesso non viene direttamente rilevato ma percorre una distanza breve dipendente della sua energia cinetica, dopo di che si scontra con un elettrone, dando luogo ad una reazione detta di annichilazione.

Il processo di annichilazione elettrone-positrone (fig.24) è una reazione che avviene quando un elettrone incontra un positrone, l'antiparticella dell'elettrone, ovvero unaparticella di antimateria. Il conseguente processo di collisione innesca la produzione di due fotoni di annichilazione (o più raramente 3 fotoni o altre particelle). La reazione segue le leggi di conservazione della carica elettrica, del momento angolare, della quantità di moto e dell'energia totale. Nel caso più comune vengono creati due fotoni aventi ciascuno un'energia pari all'energia di riposo dell'elettrone o del positrone (511Kev). Dal momento che inizialmente il sistema possiede una quantità di moto pari a zero, i raggi γ vengono emessi, secondo il principio di conservazione della quantità di moto, in direzioni opposte.

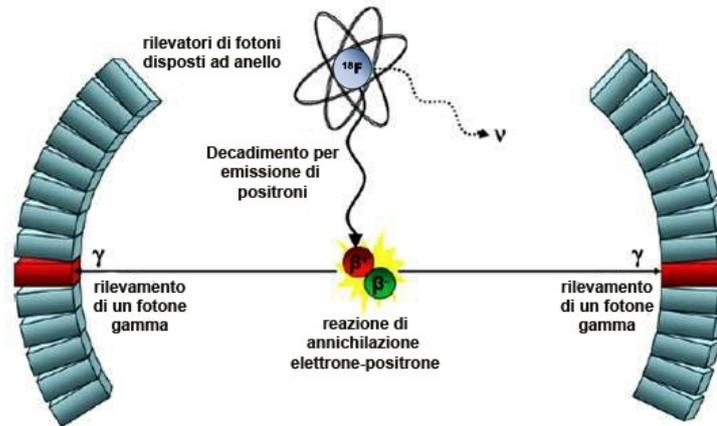


Figura 24 annichilazione elettrone-protone alla base della tecnica PET

La PET (Tomografia ad Emissione di Positroni) è una tecnica imaging, largamente impiegata in campo diagnostico per indagini di medicina nucleare mirate alla rivelazione precoce di tumori, verifica dello stadio della malattia e dell'efficacia terapeutica, studio di patologie cardiache e cerebrali; largamente applicata anche nel campo della ricerca in quanto consente di studiare e visualizzare la fisiologia umana attraverso il rilevamento dell'emissione di positroni. Informazioni sul metabolismo, studi funzionali di affinità enzima-recettore e meccanismi biochimici in tessuti viventi, possono essere ottenuti direttamente attraverso gli esperimenti di PET che forniscono immagini relative alla concentrazione ed alla distribuzione nell'organismo di particolari molecole radioattive preventivamente somministrate al paziente. Diversamente da quanto avviene per la TAC e per la Risonanza magnetica, che forniscono immagini principalmente morfologiche sulle dimensioni ed il posizionamento dei tessuti, la PET fornisce immagini funzionali, che permettono di evidenziare uno stato patologico attraverso la modificazione della funzionalità di un organo o di un apparato, fornendo quindi informazioni sul funzionamento delle cellule della regione analizzata durante situazioni che evolvono nel tempo. Grazie a ciò la PET permette, ad esempio, di seguire un flusso sanguigno o il percorso di alcuni farmaci all'interno dell'organismo, di capire come avvengono alcune funzioni metaboliche delle cellule rispetto a determinati elementi ingeriti dal paziente o, ancora, come si realizzano collegamenti tra neurotrasmettitori.

L'Imaging Molecolare tramite PET, richiede dunque la preparazione di sonde radiomarcate (o radio traccianti) ad emissione di positroni.

2.2 Molecole Radiomarcate

I radiotraccianti utilizzati nella PET, contengono nella loro struttura, uno o più radionuclidi (un atomo con un nucleo "instabile" che spontaneamente decade, emettendo energia sottoforma di radiazioni, che possono essere gamma, X o beta a seconda del radionuclide impiegato), introdotti nell'organismo in soluzione, in sospensione od in aerosol che partecipano ai processi chimici di uno o più tessuti, sia come tracciante di funzione (per una diagnosi "in vivo" sul paziente), sia come sorgente di irradiazione di tessuti malati per l'effettuazione della radioterapia (radioisotopoterapia).

I radiofarmaci, in relazione alle caratteristiche biochimiche delle molecole che li compongono, si inseriscono nei processi metabolici ed, in virtù del segnale radioattivo che emettono, possono essere rilevati dall'esterno e registrati in immagini, che sono espressione della sede e dell'intensità dei processi in cui sono coinvolti.

La peculiarità che distingue la diagnostica PET dalle altre procedure medico nucleari è data dalle diverse caratteristiche delle radiazioni emesse dai radiofarmaci impiegati, che non sono raggi gamma o X come avviene in tutti gli esami scintigrafici, anche se registrati con tecnica tomografica (SPECT o Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo), ma sono positroni. Un positrone è una struttura che possiede la stessa massa dell'elettrone ma carica di segno opposto e interagisce con gli elettroni della materia mediante un processo fisico di annichilazione.

Le informazioni più raffinate sui processi funzionali dell'organismo si possono ricavare solo impiegando gli isotopi radioattivi dei costituenti fondamentali della materia vivente, cioè Fluoro, Carbonio, Azoto ed Ossigeno (e quindi Fluoro-18, Carbonio-11, Azoto-13, Ossigeno-15), che meglio di qualsiasi altra molecola possono permetterci di "spiare" dall'esterno quello che avviene all'interno del corpo umano.

Un radiofarmaco può essere rappresentato dal farmaco stesso integrato con un nuclide radioattivo, per monitorare la distribuzione e la farmacocinetica o da una struttura capace di misurare gli effetti fisiologici del farmaco.

Il 2-deoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glucose o più semplicemente [^{18}F]-FDG è attualmente il radiotracciante più largamente utilizzato in radiofarmacia. Essendo un analogo del glucosio, viene captato in gran quantità da cellule ad alta attività glicolitica, come quelle del cervello, del rene ma anche dalle cellule tumorali.

All'ingresso nella cellula l'FDG viene fosforilato in posizione 6, impedendone la fuoriuscita dalla cellula.

Tuttavia, a differenza del glucosio l'FDG non può essere catabolizzato nella via glicolitica e rimane nella forma di FDG-6-fosfato fintantoché la molecola rimane radioattiva (e quindi visibile attraverso PET).

Il decadimento, di fatto, porta il sostituito in posizione 2 da ^{18}F a ^{18}O e genera dunque glucosio-6-fosfato, normalmente metabolizzabile dall'organismo.

La distribuzione di ^{18}F -FDG, dunque, è un ottimo metodo per valutare la biodistribuzione del glucosio e la sua fosforilazione nei diversi distretti dell'organismo. Per i motivi sopra elencati, si tratta di uno strumento estremamente preciso e pulito utilizzato nell'imaging PET per valutare il metabolismo del glucosio nel cuore e nell'encefalo ma anche come fattore diagnostico di attività tumorale che genera nei tessuti livelli di attività glicolitica fino a 200 volte superiori a quelli sani (fenomeno noto come effetto Warburg)

Benché una grande quantità di traccianti PET siano stati scoperti e convalidati, la sintesi radiochimica di nuovi traccianti impone, per avere rese di prodotto radioattivo adeguate, un periodo dalla produzione all'utilizzo clinico o sperimentale, non superiore alle tre emivite del radionuclide. Oltre al ^{18}F -FDG, solo un altro paio di molecole (^{18}F -fluoro-DOPA e ^{13}N - NH_3) vengono impiegate per uso clinico.

Nuovi traccianti possono essere progettati per analogia con molecole che si sono già mostrate attive o per complementarità recettoriale e utilizzando per la matatura isotopi radioattivi adatti, si possono ottenere immagini dettagliate del fenomeno biologico che andiamo a studiare.

Poiché alcuni dei radionuclidi emittenti positroni sono elementi che troviamo normalmente nelle biomolecole (C, N, O), è possibile sintetizzare composti radiomarcanti in grado di mantenere inalterata l'attività biologica dell'analogo bioattivo di interesse farmaceutico.

2.3 Sintesi di radioisotopi con breve tempo di dimezzamento

Gli isotopi radioattivi dell'azoto, del carbonio e dell'ossigeno, hanno una breve emivita, cioè perdono la loro capacità di emettere il segnale radioattivo così velocemente che per usarli è indispensabile avere in loco sia la macchina capace di produrli che la struttura dove sintetizzare le molecole nelle quali questi elementi devono essere incorporati. Il ciclotrone è un compatto acceleratore particellare capace di produrre fasci di protoni o deuteroni in un range di energia che innesca reazioni nucleari nel bersaglio, che in seguito all'urto, produce atomi radioattivi di ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F , utilizzati per la sintesi di radiofarmaci e radio traccianti (fig.25). I fasci di particelle vengono indirizzati verso un sistema target posto in uscita dal fascio contenente il materiale adatto alla produzione del radioisotopo necessario ed il prodotto del ciclotrone viene trasferito ad una "cella calda" schermata con piombo, dove viene convertito nel prodotto finale radiomarcato.

Un sistema PET è dunque costituito da un ciclotrone per la produzione del radioisotopo, da una radiofarmacia, da una camera gamma per l'acquisizione dei dati e da un sistema di software per la ricostruzione delle immagini.

Il Fluoro 18 (^{18}F) è caratterizzato da una veloce disintegrazione (la sua quantità di radioattività si dimezza in circa 109 minuti) che tuttavia è sufficiente da consentire la sua produzione in altra sede e la successiva spedizione ai centri che non dispongono di ciclotrone e di radiofarmacia.

L'utilizzo di composti radioattivi ad alta energia e breve emivita rende prioritaria la sicurezza dell'operatore e l'efficacia dei metodi impiegati: nelle reazioni di marcatura sono tipicamente utilizzati sistemi automatici e apparati robotici gestiti da computer in modo da ridurre il più possibile l'esposizione dell'operatore alle radiazioni.

La sfida principale per i radiochimici è quindi quella di sviluppare rapidi metodi di introduzione di radioisotopi per la sintesi di radio traccianti al fine di consentire che sintesi, purificazione, analisi e somministrazione avvengano nell'arco di tempo non superiore alle tre emivite del radioisotopo, al fine di garantire una quantità di materiale radiomarcato sufficiente alla corretta acquisizione dell'immagine..

Oltre a dover garantire una tanto rapida quanto efficace caratterizzazione del prodotto sintetizzato, è altrettanto fondamentale garantire la qualità del radiofarmaco per quanto concerne la purezza, la formulazione e la sterilità. I radiotraccianti PET sono spesso caratterizzati utilizzando una combinazione di HPLC, TLC, e la gas cromatografia (GC), combinati con dei rilevatori di massa e di radioattività.

A causa della produzione di numerosi prodotti derivanti dal processo di decadimento, rende difficoltosa una caratterizzazione tramite NMR.

Le procedure di controllo qualità per i radiotraccianti e radiofarmaci sono simili a quelle che vengono applicate ai prodotti farmaceutici iniettabili non radioattivi e coinvolgono prove fisico-chimiche e test biologici.

Le prove fisico-chimici consentono di controllare il pH (compreso tra 4,5 e 8,5) e l'isotonicità della soluzione; la purezza chimica, radionuclidica e radiochimica, le impurità chimiche, e lo stato fisico del campione. I test biologici determinano la sterilità, apirogenicità, e l'eventuale tossicità del campione.

Per poter assicurare l'efficienza del processo di radiomarcatura, si ricorre invece alla determinazione della resa radiochimica del processo (RCY) e dell'attività specifica (SA) del composto finale radiomarcato.

La RCY è la quantità di di radioattività presente nel prodotto desiderato, espressa come percentuale della radioattività totale con cui si è iniziata la sintesi del prodotto marcato. Questa misura così come tutte le altre misure di attività radiochimica devono essere riferite ad un tempo ben preciso.

La SA è una misura della radioattività per unità di massa del composto marcato espresso come Ci su mole o grammo di prodotto (Ci/mol o Ci/g).

In una preparazione radio farmaceutica è sempre presente una certa quantità di farmaco "freddo", non radioattivo che prende il nome di carrier. Esso può inserirsi nel processo di sintesi accidentalmente come avviene ad

esempio per radiofarmaci marcati con ^{11}C partendo da $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, in cui la presenza di carrier può essere dovuta ad infiltrazioni all'interno dell'apparato di sintesi di CO_2 stabile presente nell'aria o nei reagenti utilizzati. La CO_2 compete con la $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ prodotta, diminuendo, se i reagenti non sono in grande eccesso, la resa della marcatura e portando alla formazione del prodotto "freddo". È comunque tutt'altro che inusuale l'intenzionale aggiunta di carrier da parte dell'operatore al fine di regolare i valori di attività specifica. Elevate attività specifiche sono richieste per i radiofarmaci impiegati negli studi dei recettori dove con nmoli di farmaco si va in contro alla saturazione: in questo caso è dunque indispensabile eliminare dalla preparazione il carrier in quanto esso compete con il radio farmaco per il legame con il recettore.

Tipiche attività specifiche per i prodotti radio marcati utilizzati per la PET sono nell'ordine di 50-500 GBq/mmol (ca.1-15 Ci/mmol) e dal momento in cui, piccole quantità di radioattività sono in grado di generare una buona immagine di PET, si utilizza solo una quantità di radiazioni del composto da somministrare molto bassa (dose tracciante). Ciò implica che le molecole marcate possono essere studiate in vivo senza perturbare il sistema biologico e anche composti tossici possono essere studiati nell'uomo a dosi subpharmacological o subtoxicological.

Tuttavia, questo vantaggio comporta anche difficoltà quando si lavora con radioisotopi PET a breve emivita, perché a causa della bassa quantità radioisotopi prodotti dal ciclotrone (nell'ordine del picomolare o nanomolare), sono necessari per eseguire reazioni di radiomarcatura apparati miniaturizzati altamente specializzati.

L'applicazione di reattori microfluidica alla sintesi e alla produzione di traccianti PET ha recentemente generato una notevole attenzione in quanto consente un maggior controllo della reazione, aumento della resa e dell'affidabilità della procedura di radio marcatura oltre ad un aumento della sicurezza e della possibilità di automazione, che sono tutti essenziali per la produzione di rivelatori per PET per l'uso in vivo secondo GMP (norme di buona fabbricazione).

RADIOISOTOPO	REAZIONE NUCLEARE	PRODOTTO DEL DECADIMENTO	$t_{1/2}$	EMISSIONE β^+
^{18}F	$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	^{18}O	109,8 min	96,9 %
^{11}C	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ $^{11}\text{B}(p,n)^{11}\text{C}$ $^{10}\text{B}(p,n)^{11}\text{C}$	^{11}B	20,4 min	99,8 %
^{13}N	$^{12}\text{C}(d,n)^{13}\text{N}$ $^{13}\text{C}(p,n)^{13}\text{N}$ $^{10}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$	^{13}C	9,96 min	100 %
^{15}O	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ $^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$ $^{16}\text{O}(p,pn)^{15}\text{O}$	^{14}N	2,03 min	99,9 %

Figura 25 principali radionuclidi PET e loro caratteristiche fisiche

2.3.1 Radiomarcatura con ^{11}C

Il ^{11}C è ubiquitariamente presente nei prodotti organici naturali e nelle molecole sintetiche e ciò lo rende un importante isotopo beta-emittente per la radiomarcatura di molecole di interesse biologico.

I composti marcati con il ^{11}C mantengono le stesse caratteristiche chimiche e biologiche dei loro analoghi non marcati anche se, l'utilizzo di in radiochimica di questo isotopo, è notevolmente limitato dalla sua bassa emivita (20,4 minuti).

Il ^{11}C è prodotto nel ciclotrone tramite bombardamento di protoni verso il target costituito da Azoto-14 (^{14}N), secondo la reazione nucleare ^{11}C ($^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$). piccole quantità di ossigeno o idrogeno presenti nel bersaglio portano alla formazione dei precursori $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (fig.26), dai quali vengono sintetizzati quasi tutti i composti PET marcati con ^{11}C .

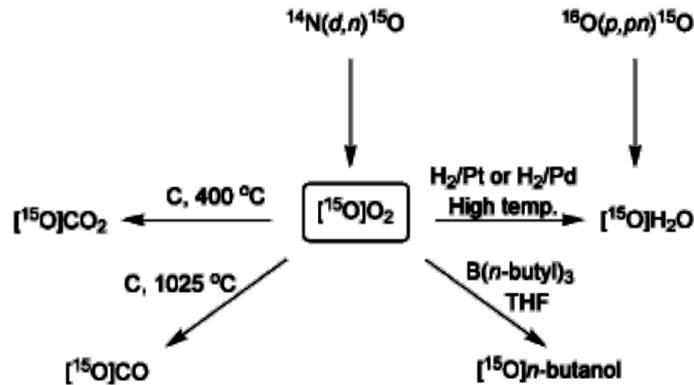


Figura 27 sintesi di composti PET radiomarcati con ^{15}O .

L'Azoto-13 (^{13}N) viene ottenuto nel ciclotrone dalla reazione nucleare $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$.

^{13}N viene generalmente prodotto come il nitrato o nitrito in acqua, dai quali si ottiene per riduzione ^{13}N -ammoniaca.

È inoltre possibile produrre ^{13}N - NH_3 aggiungendo al target etanolo o utilizzando gas metano. L'applicazione PET dell' ^{13}N è limitata all'uso di ^{13}N -ammoniaca per la misurazione il flusso sanguigno miocardico e alla marcatura dell'azoto degli aminoacidi.

2.4 Principali reazioni di Radiomarcatura con [18F]

Il Fluoro-18, può essere considerato il radioisotopo di elezione in ambito PET, grazie al lungo tempo di dimezzamento (109 min, il più lungo tra i vari radioisotopi con breve emivita) e al tipo di decadimento, che avviene per il 97% per emissione positronica e per il restante 3% per cattura elettronica.

Chimicamente, essendo in grado di formare legami covalenti piuttosto forti con i composti del carbonio, può essere introdotto in una ampia varietà di molecole organiche come sostituito di atomi di idrogeno o di gruppi ossidrilici OH (come avviene ad esempio nel caso dell' ^{18}F FDG). Il Fluoro può infatti sostituire l'Idrogeno in quanto possiede un raggio di Van der Waals di grandezza del tutto simile, che consente di evitare variazioni di ingombro sterico nella molecola marcata.

Tuttavia la diversa elettronegatività tra i due atomi (il F è più elettronegativo dell'H) conferisce alla molecola marcata proprietà biologiche diverse (es. diversa lipofilità).

In questo caso, però, si è visto che la sostituzione di un gruppo ossidrilico non comporta modifiche sostanziali nelle caratteristiche della molecola finale.

Questo radionuclide può essere prodotto in vari modi, sfruttando reazioni nucleari differenti, anche se la reazione più comune è quella che utilizza acqua arricchita con ^{18}O e che risulta caratterizzata da una resa significativamente più elevata rispetto alle altre reazioni nucleari.

Una volta ottenuto, il fluoruro viene generalmente separato dall'acqua arricchita usando colonne scambiatrici di anioni o mediante distillazione, in modo poi da utilizzare il fluoruro radioattivo nelle reazioni di marcatura.

In radiomarcatura il ^{18}F viene utilizzato principalmente per le reazioni di sostituzione elettrofila e nucleofila. Nelle reazioni di sostituzione elettrofila, il reagente utilizzato è il fluoro sotto forma di $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$, cioè fluoro gassoso, prodotto mediante la reazione nucleare $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ che utilizza un target gassoso costituito da ossigeno-18. Nonostante l'alta reattività, ha lo svantaggio di essere abbastanza distruttivo. Attualmente esso viene utilizzato soltanto per le marcature di radiofarmaci che non necessitano di un'attività specifica particolarmente elevata, in quanto la resa è generalmente non troppo alta e non supera il 50%, questo perché solo uno dei due atomi di fluoro viene incorporato nel prodotto finale marcato.

Nelle reazioni nucleofile invece, l'agente utilizzato per le marcature è il fluoro sotto forma di fluoruro $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$, in soluzione acquosa, ottenuto nella maggior parte dei casi mediante reazione nucleare a partire da acqua arricchita con Ossigeno-18.

A differenza del fluoro gassoso, F^- è caratterizzato da una reattività più bassa, ma nel corso degli anni si è cercato di migliorare questo requisito per ottimizzare le reazioni di marcatura con questo agente. Quando il target viene irradiato durante il bombardamento nel ciclotrone, il fluoruro prodotto è accompagnato da un controione con carica positiva; tuttavia, questi controioni non servono ad accentuare la sua reattività; per questo motivo, nel corso delle reazioni di marcatura, vengono volutamente aggiunti dei controioni prima della fase di evaporazione dell'acqua, in particolare

potassio, cesio o rubidio, che vengono complessati con degli agenti criptandi quali il Kryptofix 2.2.2., un etere corona che funge da catalizzatore di trasferimento di fase per trasportare il fluoruro radioattivo nella fase organica dove avviene la reazione di sostituzione.

Oggi la strategia più seguita in questi tipi di sintesi è l'uso della miscela K^+ /Kryptofix, accompagnata dall'aggiunta di un anione come l'idrossido o il carbonato, che non competono con il fluoruro nella reazione di sostituzione nucleofila.

Attualmente questa via è quella prescelta per le marcature con fluoro, in quanto è possibile ottenere rese più elevate e un'attività specifica molto buona, anche maggiore di 2 Ci/mmol.

L'acqua del target rende lo ione $[^{18}F]$ -fluoruro poco reattivo a causa dell'alto stato di idratazione e generalmente l'acqua presente deve essere rimossa al fine di ottenere un'adeguata nucleofilicità del $[^{18}F]$ -fluoruro. Solitamente questi ioni vengono solubilizzati in solventi organici prima di eseguire reazioni chimiche. Per ottenere questo, il $[^{18}F]$ -fluoruro viene incorporato in una resina a scambio ionico e successivamente fatto eluire con carbonato di potassio in acetonitrile. L'acqua viene totalmente rimossa tramite cicli consecutivi di evaporazione azeotropica con acetonitrile. Durante il processo di evaporazione viene aggiunto un reagente di trasferimento di fase come il tetrabuttilammonio carbonato, oppure un agente criptante come il Kryptofix-2.2.2 (K2.2.2) che consente al $[^{18}F]$ -fluoruro di disciogliersi in un solvente polare aprotico come acetonitrile, DMSO o DMF

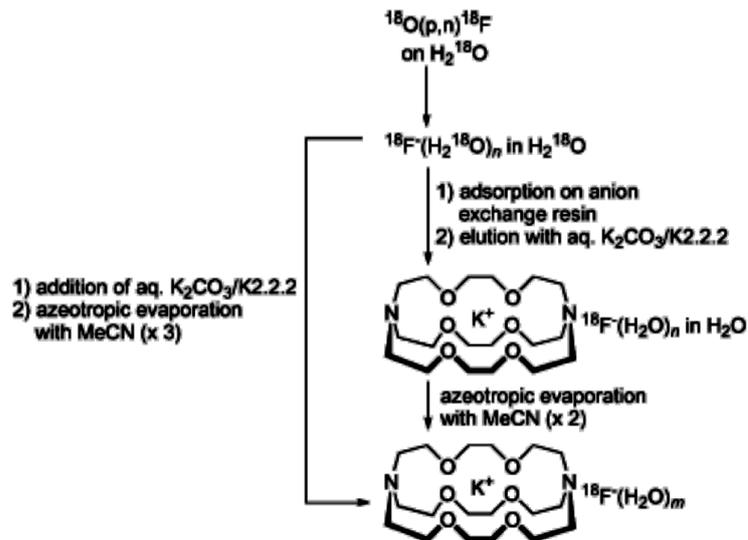


Figura 28 struttura e preparazione del complesso $[^{18}\text{F}]\text{fluoruro-K2.2.2.-K}^+$ prodotto attraverso irradiazione dal ciclotrone di acqua arricchita mediante due processi alternativi

Il K2.2.2 forma forti complessi con il catione potassio, migliorando la nucleofilicità del fluoruro. La produzione di $[^{18}\text{F}]\text{-fluoruro}$ viene effettuata anche variando la base impiegata (idrogeno, carbonato, osslato), l'agente criptante (18-crown-6) o il controione (Rb^+ , Cs^+ , tBu_4N^+). Il criptante cattura il catione metallico (solitamente K^+) e lo separa dal fluoruro, consentendo così di migliorarne il potere nucleofilo. Le principali strategie di sintesi radiochimica del nuclide ^{18}F possono essere suddivise in due aree distinte. Esse comprendono:

- fluorurazione diretta in cui l'isotopo ^{18}F viene introdotto "direttamente" nelle molecole bersaglio, in un unico step;
- fluorurazione indiretta in cui vengono impiegati i cosiddetti gruppi prostetici del ^{18}F e richiede un approccio multi-step. Questi gruppi prostetici sono in genere piccoli gruppi alchilici o arilici marcati con ^{18}F che possono anche presentare altri gruppi funzionali reattivi. Vengono utilizzati per reazioni con molecole biologiche complesse, che non sarebbero adatte o sufficientemente stabili da tollerare i metodi di fluorurazione diretta.

Solitamente l'incorporazione diretta di uno ione fluoruro in una molecola viene ottenuta mediante la sintesi di un precursore che presenta all'interno della sua struttura uno o più gruppi capaci di reagire con gli ioni fluoruro per

dare il radiofarmaco desiderato. In letteratura sono riportate diverse strategie tra cui:

- a) reazione di Balz-Schiemann e Wallach
- b) la sostituzione nucleofila aromatica
- c) Reazione di sali di diariliodonio
- d) La sostituzione nucleofila alifatica

Le radiomarcatura delle molecole impiegate in questo elaborato di tesi è stata eseguita seguendo una strategia sintetica di sostituzione nucleofila alifatica con [^{18}F]-fluoruro.

2.4.1 Sostituzione nucleofila alifatica con fluoruro [^{18}F]

La sostituzione nucleofila alifatica con [^{18}F]-fluoruro, è una reazione largamente impiegata in sintesi radio-farmaceutica in quanto produce spesso buone rese e in alcune circostanze può essere impiegata anche a scopo quantitativo. I gruppi uscenti solitamente impiegati sono derivati degli acidi solfonici (come il gruppo triflato, mesilato, tosilato, nosilato ecc.) preparati da alcoli e cloruri di solfonile, che portano solitamente alla formazioni di specie anioniche molto stabili, o altri alogenuri (Cl^- , Br^- e I^-).

La sostituzione segue un tipico meccanismo di tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ che, attraverso una cinetica di secondo ordine, favorisce la sostituzione a livello dell'atomo di carbonio meno ingombrato stericamente e comporta l'inversione della configurazione dovuta all'attacco dal retro del nucleofilo.

I carboni primari suscettibili ad un attacco di tipo bi-molecolare $\text{S}_{\text{N}}2$ includono carboni benzilici ed allilici, carboni α di gruppi carbonilici (esteri, aldeidi e chetoni) e la posizione α di ciano-gruppi e sulfonamidi. La sostituzione su carboni secondari può essere accompagnata da reazioni collaterali di eliminazione E_2 .

La sostituzione nucleofila alifatica con ^{18}F -fluoruro viene solitamente eseguita in solventi polari aprotici come l'acetonitrile, DMF, DMSO, THF, nitrobenzene, o-diclorobenzene, diclorometano, o tetrametisulfone.

L'acetonitrile è particolarmente adatto ed efficace per un ampio numero di reazioni e la possibilità di essere facilmente rimosso dall'ambiente di reazione, lo rende il solvente maggiormente impiegato.

3. REAZIONI DI RADIOMARCATURA IN MICROFLUIDICA

Gli apparati di sintesi microfluidica sono generalmente rappresentati da sistemi in grado di supportare processi chimici o biochimici e caratterizzati da strutture misurate nell'ordine del micron (10-500 μm).

Un sistema microfluidico di base genericamente include una rete di microcanali, un'unità di miscelazione, una fonte di riscaldamento ed un sistema di pompaggio per il controllo dei fluidi o dei gas.

La riduzione fisica delle misure, rispetto ad i reattori chimici convenzionali, permette di ottenere un incremento notevole del rapporto superficie/volume a livello dei microreattori (MR). In microfluidica questo parametro può essere superiore a 50.000 m^{-1} , mentre nei reattori convenzionali non supera 1000 m^{-1} . Tale incremento comporta un miglioramento nel trasporto delle masse e nel trasferimento di calore e consente di ottimizzare i processi sintetici in relazione alla velocità di reazione, alle rese dei prodotti e alla selettività in relazione al volume della reazione [19] [20]. Ulteriori vantaggi dall'utilizzo dei sistemi microfluidici, sono rappresentati dalla riduzione del consumo di reagenti, dalla miniaturizzazione, una maggiore sicurezza, una facile automatizzazione e dalla possibilità di condurre analisi on-line in tempo reale. La possibilità di poter controllare da un punto di vista temporale e spaziale, le concentrazioni dei reagenti e la reazione stessa, attraverso i canali di connessione del sistema microfluidico (dai sistemi di pompaggio al MR, nel MR e in uscita dallo stesso), permette una elevata riproducibilità e velocità del processo rendendolo compatibile con un approccio radiochimico mirato alla sperimentazione PET [21] [22].

Per tutti questi motivi i sistemi microfluidici rivestiranno, senza alcun dubbio, un importante ruolo nello sviluppo di nuovi composti radiomarcati per la sperimentazione PET.

3.1 Sistema NanoTek per la sintesi microfluidica

Il sistema NanoTek (Advion, USA, product code: 900-0003) per la sintesi microfluidica, è costituito da un modulo nel quale vengono concentrate le soluzioni (CM) e un modulo base (BM). Il controllo del sistema avviene attraverso il software NanoTek 1.4 eseguito da un comune laptop. CM è

costituito da una pompa di iniezione a bassa pressione connessa ad una valvola a 6 vie e ad un alloggiamento termostato dove può essere posta una vial da 3 ml a fondo conico (V-vial).

Questo modulo è usato per preparare il complesso anidro ^{18}F -fluoruro-Kriptofix_{2.2.2} (fig.28), attraverso una tradizionale resina a scambio ionico e distillazione azeotropica. BM è costituito da due blocchi separati: il modulo del reattore (RM) e il modulo delle pompe (PM). Quest'ultimo è costituito da due pompe di iniezione ad elevata pressione (P1 e P2), entrambe connesse ad una valvola ad 8 vie. Nel set.up utilizzato questo modulo consente di dispensare la soluzione di precursore (P1) dal loop e trasferirlo ad un ulteriore loop (P2).

Il blocco RM rappresenta il cuore del sistema ed è costituito da una pompa di iniezione ad alta pressione (P3) connessa ad una valvola di distribuzione ad 8 vie (DV) ed a 4 slot termostate dove possono essere alloggiati i MR.

P3 è utilizzata per dispensare la soluzione del complesso del ^{18}F -fluoruro e DV è utilizzata per portare le miscele di reazione in relazione alle necessità dell'operatore. In questo lavoro, i micro reattori utilizzati sono costituiti da tubi di fused-silica (2 m x 0,1 mm \varnothing) strettamente avvolti in una sede riscaldata.

Il software oltre a controllare le componenti del sistema, permette di visualizzare e registrare i dati (temperatura, pressione, posizionamento delle valvole e la radioattività). Ciascuna componente può essere gestita manualmente dall'operatore che può inoltre programmare una sequenza di operazioni (macro) permettendo lo svolgimento di procedure complesse senza intervenire direttamente sul sistema. Il software presenta una funzione macro definita "Automatic Discovery", che permette di effettuare svariate reazioni in sequenza (in uno o due steps) usando P3 per trasferire l'agente marcante, P1 per il primo reagente e P2 per un opzionale secondo reagente. I reagenti sono stoccati in loop connessi a ciascuna pompa attraverso rispettivamente le porte D-E (fig.29). I MR possono essere connessi in serie per aumentare il tempo/volume di reazione. La connessione tra le differenti componenti attive in questo lavoro, è stata impostata in modo da poter condurre un singolo step di reazione attraverso la macro Automatic Discovery. Dopo ciascuna marcatura, il sistema viene ripulito

automaticamente con un piccolo volume di solvente puro che lo rende utilizzabile per la reazione successiva.

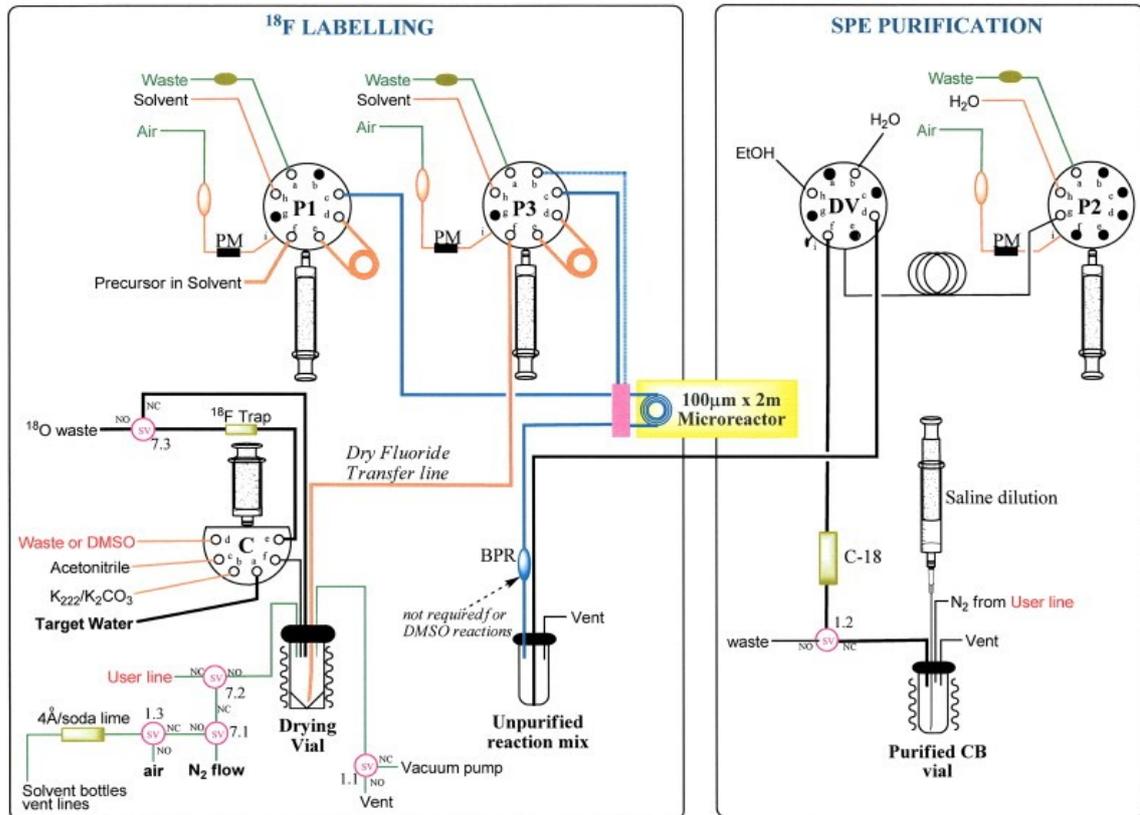


Figura 29 impianto idraulico di marcatura con ^{18}F -fluoruro e purificazione SPE.
PM= pressure monitor; BPR=back pressure regulator

3.1.1 Preparazione del ^{18}F -Fluoruro anidro per la radiomarcatura

La procedura di preparazione ^{18}F -Fluoruro anidro per la radiomarcatura si svolge nel CM. In seguito al bombardamento, l'acqua derivante dal ciclotrone (1.3 ± 0.1 ml) passa attraverso una colonna preconizionata MP-1 trap and release ed il ^{18}F -fluoruro intrappolato, viene in seguito eluito utilizzando una soluzione contenente 10 mg di Kryptofix_{2.2.2} (K_{222}) e 80 μl di una soluzione al 5% di K_2CO_3 in 1 ml di CH_3CN , all'interno del reattore pre-riscaldato a 110°C . Per facilitare l'evaporazione del solvente durante il trasferimento del ^{18}F -fluoruro, al reattore viene applicato il vuoto ed un flusso costante di azoto. I parametri di flusso sono ottimizzati per ottenere l'eluizione di un volume massimo di 100 μl di soluzione durante il processo. La radioattività viene

dunque raccolta all'interno della V-vial. La soluzione è evaporata fino a completa essiccazione. Sono quindi ulteriormente addizionati 0,5 ml di CH_3CN anidro per permettere ulteriore distillazione azeotropica applicando il vuoto per un ulteriore minuto a 110°C e in seguito per 1 min senza riscaldamento. Il complesso anidro ottenuto è successivamente risolubilizzato con 0,50-0,70 ml di CH_3CN o DMSO, in accordo al protocollo sperimentale. L'intera procedura di essiccazione dura al massimo 12 min.

3.1.2 La Procedura di Automatic Discovery

Le reazioni di radiomarcatura a singolo step sono caratterizzate dal trasferimento simultaneo dei reagenti dalla Pump1 (precursor) e Pump3 (^{18}F -complex) al micro reattore.

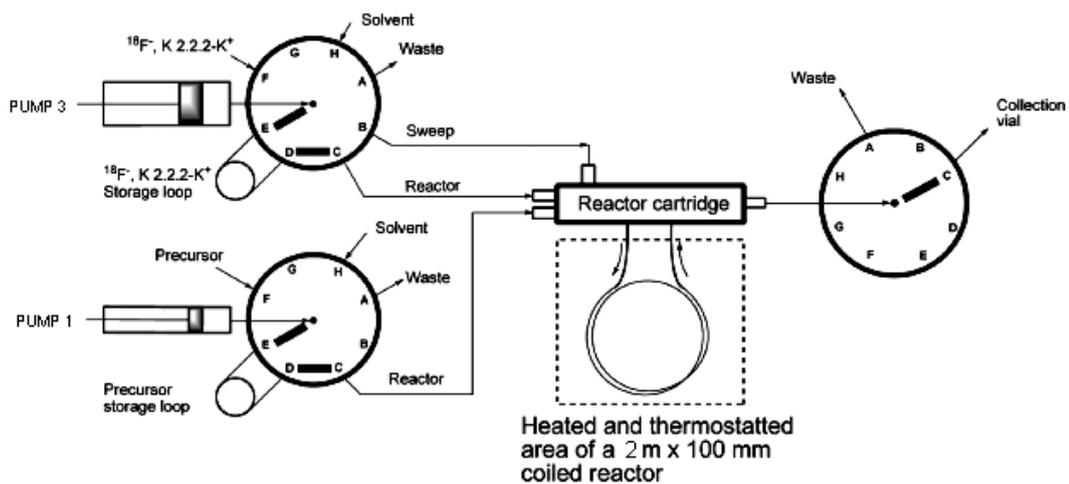


Figura 30 Set-up del microreattore, stoccaggio e trasferimento dei reagenti, direzioni di flusso per la radiosintesi nell'apparato Nanotek

L'operatore per ogni test di marcatura può intervenire su diversi parametri tra cui il volume di ^{18}F -fluoruro (solitamente $10\ \mu\text{L}$), la sua portata, rapporto ^{18}F -complex/precursore (P1/P3) e la temperatura fornita al microreattore.

In una reazione di radiomarcatura vengono trasferiti da 10 a $50\ \mu\text{l}$ di soluzione di ogni loop (tramite connessione delle valvole con le rispettive pompe $\rightarrow \text{E} \rightarrow \text{D} \rightarrow \text{C}$) nel microreattore.

Dalla P3 (tramite connessione → B) il sistema trasferisce un bolo di aceto nitrile (sweep) per spingere la miscela di reazione fuori del reattore, nel flaconcino di raccolta, tramite la valvola di distribuzione DV (fig.30).

Il volume di "solvente sweep" è settato per superare il volume complessivo del microreattore e di tutti i tubi utilizzati fino alla vial di raccolta (collection vial). La fase di sweep garantisce la totale assenza dei reattivi all'interno del sistema una volta terminato il processo di sintesi. La miscela di reazione, attraverso la valvola di distribuzione, viene infine indirizzata alla vial di raccolta o al waste.

Il software automaticamente calcola il flusso dello sweep ed il volume di precursore trasferito in base alle condizioni scelte dall'operatore. Il flusso dello sweep determina il tempo di residenza dei reattivi all'interno del microreattore e quindi il tempo in cui la miscela di reazione trascorre nella zona riscaldata.

Il sistema comprende infine tre radio detector che possono essere posizionati a seconda delle esigenze dell'operatore e tre trasduttori di pressione integrati, per le tre pompe impiegati (P1-P2-P3).

Con questo sistema è possibile eseguire 5-15 reazioni per ora, in modo consecutivo, impiegando solo pochi minuti per stabilizzare la temperatura quando necessario.

La radioattività della miscela raccolta viene infine analizzata mediante radio-TLC o radio-HPLC.

4. INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

Gli acidi biliari (BA) per lungo tempo sono stati studiati essenzialmente per la loro capacità di solubilizzare colesterolo, acidi grassi, e vitamine liposolubili, facilitandone la digestione ed il trasporto. Recenti studi comunque hanno evidenziato una loro più ampia azione e attualmente sono studiate per la loro azione di molecole di segnalazione e capacità di esercitare una vasta gamma di effetti endocrini. Questa ridefinizione della funzione degli acidi biliari è strettamente associata alla scoperta nel 1999 del farnesoid X recettore (FXR), uno specifico recettore nucleare dei BA e nel 2002 del recettore TGR5 (conosciuto anche come M-BAR, GP-BAR1 o BG37) recettore specifico metabotropico dei BA.

I recenti progressi sullo studio dei percorsi di segnalazione innescati dall'attivazione dei recettori TGR5 e FXR giustificano il loro riconoscimento come plausibili target per lo studio del trattamento dei disordini dell'omeostasi del glucosio e dei lipidi. Gli FXR-agonisti reprimono la sintesi degli acidi biliari endogeni e riducono i livelli plasmatici di trigliceridi, glucosio e colesterolo, mentre i ligandi del recettore TGR5 riducono i livelli di glicemia e aumentano la spesa energetica. Il duplice sviluppo di agonisti per i recettori FXR e TGR5 potrebbe quindi fornire nuove opportunità per il trattamento dei disturbi connessi con l'alterazione dei livelli fisiologici lipidici e glucidici (dislipidemie, diabete sindrome metabolica).

Recentemente è stata focalizzata l'attenzione sui percorsi di segnalazione attivati dalla stimolazione del recettore TGR5, un recettore di membrana accoppiato con le proteine G, la cui attivazione determina un vasto numero di effetti fisiologici (fig.31).

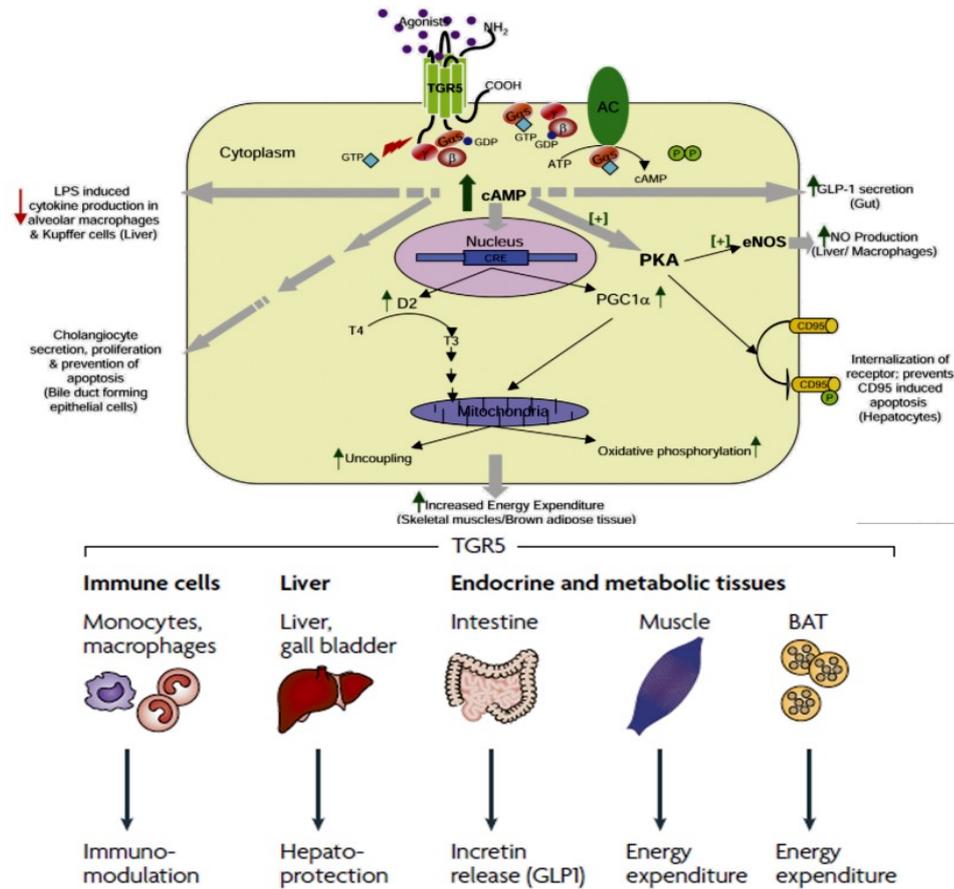


Figura 31 percorsi di segnalazione attivati dalla stimolazione del recettore TGR5 e attività fisiologiche correlate

Nei tessuti maggiormente coinvolti nel metabolismo dei substrati energetici (tessuto adiposo bruno e tessuto muscolare), l'attivazione del recettore TGR5 induce l'aumento dei livelli di cAMP che porta all'attivazione del gene che codifica per l'enzima D2 (iodotironina deiodinasi di tipo 2). Questo enzima, oltre a modulare il processo di attivazione e inattivazione dell'ormone tiroideo, svolge un ruolo vitale nel controllo dell'omeostasi energetica e nel processo di termogenesi adattativa del tessuto adiposo bruno.

Nei macrofagi, monociti e nelle cellule del Kupffer (macrofagi specializzati localizzati nel fegato), l'attivazione del recettore TGR5 inibisce il rilascio di citochine (ILs Interleuchine e TNF- α Tumor Necrosis Factor) determinando immuno-modulazione.

L'attivazione del TGR5 nel fegato, induce l'aumento dell'attività eNOS con conseguente aumento dei livelli di NO con effetto epatoprotettivo mentre

l'attivazione delle cellule enteroendocrine (cellule L) nell'intestino tenue e nel colon da parte degli acidi biliari, mediata dal recettore TGR5, provoca il rilascio di GLP-1 (Glucagon-like peptide 1). Tale effetto non è indotto dalla stimolazione del recettore FXR.

Il GLP1 stimola il rapido rilascio di insulina a livello delle cellule β del pancreas e induce la trascrizione del gene stesso dell'insulina, mentre a livello delle cellule α del pancreas riduce la secrezione di glucagone (antagonista dell'insulina) determinando in tale maniera, il controllo dei livelli glicemici rallentando la motilità e dunque lo svuotamento gastrico, contribuendo a ridurre la sazietà.

In base alle considerazioni esposte sopra, il recettore di membrana TGR5 emerge dunque come un interessante target per lo studio ed il trattamento dei disordini metabolici. In particolare, l'agonismo selettivo sul recettore TGR5 consente di evitare l'impatto negativo degli agonisti FXR sulla biosintesi dell'HDL, una lipoproteina ad alta densità che ha la funzione di rimuovere il colesterolo in eccesso dai tessuti periferici e trasportarlo al fegato. La stimolazione del recettore FXR determina infatti una diminuzione dell'HDL e rappresenta quindi un fattore di predisposizione all'arteriosclerosi.

Scopo di questa tesi è stato quello di sintetizzare idonei precursori per ottenere analoghi di ligandi selettivi del recettore TGR5, già noti in letteratura, aventi struttura steroidea e caratterizzati dalla presenza di un atomo di fluoro. È possibile che la sostituzione, una volta messo a punto il processo di sintesi, dell'atomo di fluoro di queste molecole con l'isotopo radioattivo ^{18}F possa condurre a radio traccianti da utilizzare per approfondire le attuali conoscenze circa la presenza del recettore TGR5 nell'organismo, in determinati stati fisiologici o patologici.

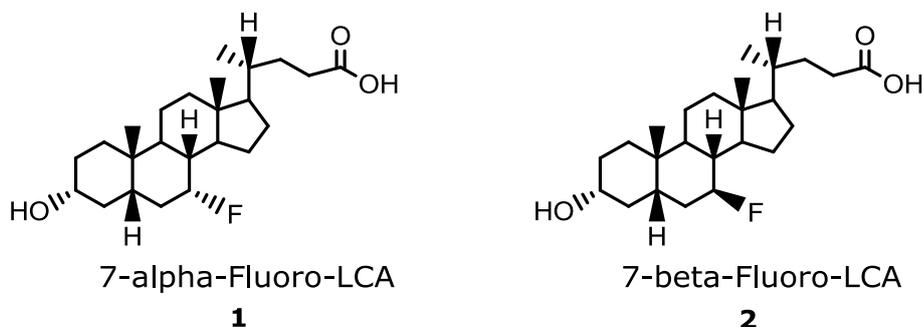
La scelta del fluoro è legata al fatto che l'isotopo ^{18}F può essere considerato il radioisotopo di elezione nella Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e che questa metodica di molecular imaging permette lo studio farmacologico in vivo ed in maniera non invasiva della farmacocinetica di molecole radiomarcate dotate di specifiche attività fisiologiche.

Una approfondita ricerca bibliografica sui ligandi selettivi dei recettori TGR5 ha permesso di identificare un numero ristretto di molecole idonee e di

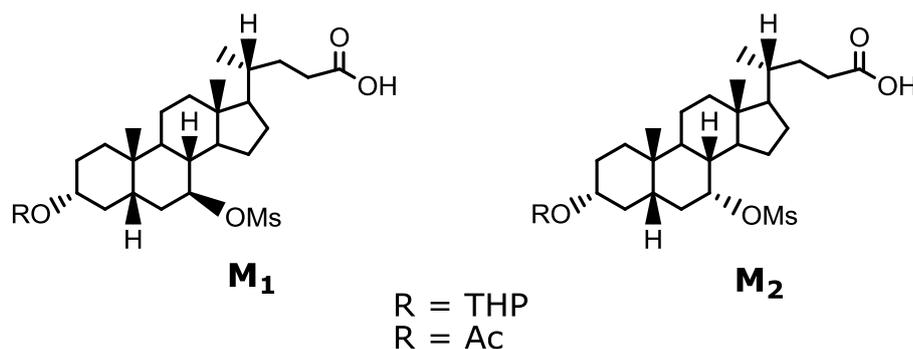
selezionare i derivati fluorurati **1** (7- α F-LCA) e **2** (7- β F-LCA) dell'acido litocolico, ligando fisiologico di tale recettore, quali buoni candidati per la progettazione dei corrispondenti radiocomposti. I composti selezionati risultano inoltre possedere una buona affinità e selettività verso il recettore TGR5 [10] e la loro scelta è legata anche all'ipotesi che la loro struttura steroidea, analoga a quella dei ligandi endogeni del recettore TGR5, potrebbe dimostrare un profilo ADME simile a quello dei ligandi endogeni.

È stato quindi necessario identificare un idoneo percorso sintetico che tenesse conto della necessità, imposta dal futuro utilizzo in reazioni di marcatura, che l'atomo di fluoro venisse inserito nella fase finale della via sintetica attraverso la fluorurazione di opportuni precursori. Questa condizione deriva dal fatto che l'isotopo ^{18}F è utilizzabile esclusivamente in forma anionica e limita pertanto il suo impiego in reazioni di sostituzione nucleofila. Un'ulteriore vincolo alla realizzazione delle sintesi è posto dall'emivita fisica del radionuclide (tempo di dimezzamento di 109 min) che rende necessario impiegare reazioni veloci e possibilmente esenti da laboriose procedure di purificazione che confliggerebbero sia con i limiti di tempo che con gli aspetti legati alla radioprotezione.

È stata pertanto progettata la sintesi dei mesilati **M1** e **M2**, come opportuni precursori dei ^{18}F -derivati corrispondenti di **1** e **2** in quanto il gruppo mesile risulta essere un buon gruppo uscente per la reazione di sostituzione nucleofila alifatica di tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ con $^{18}\text{F}^-$, ampiamente utilizzata in radiochimica e caratterizzata spesso da buone rese. È da sottolineare che tale reazione comporta inversione di configurazione e può essere accompagnata da reazioni collaterali di eliminazione $\text{E}_{2\text{c}}$ se è condotta su carboni secondari.

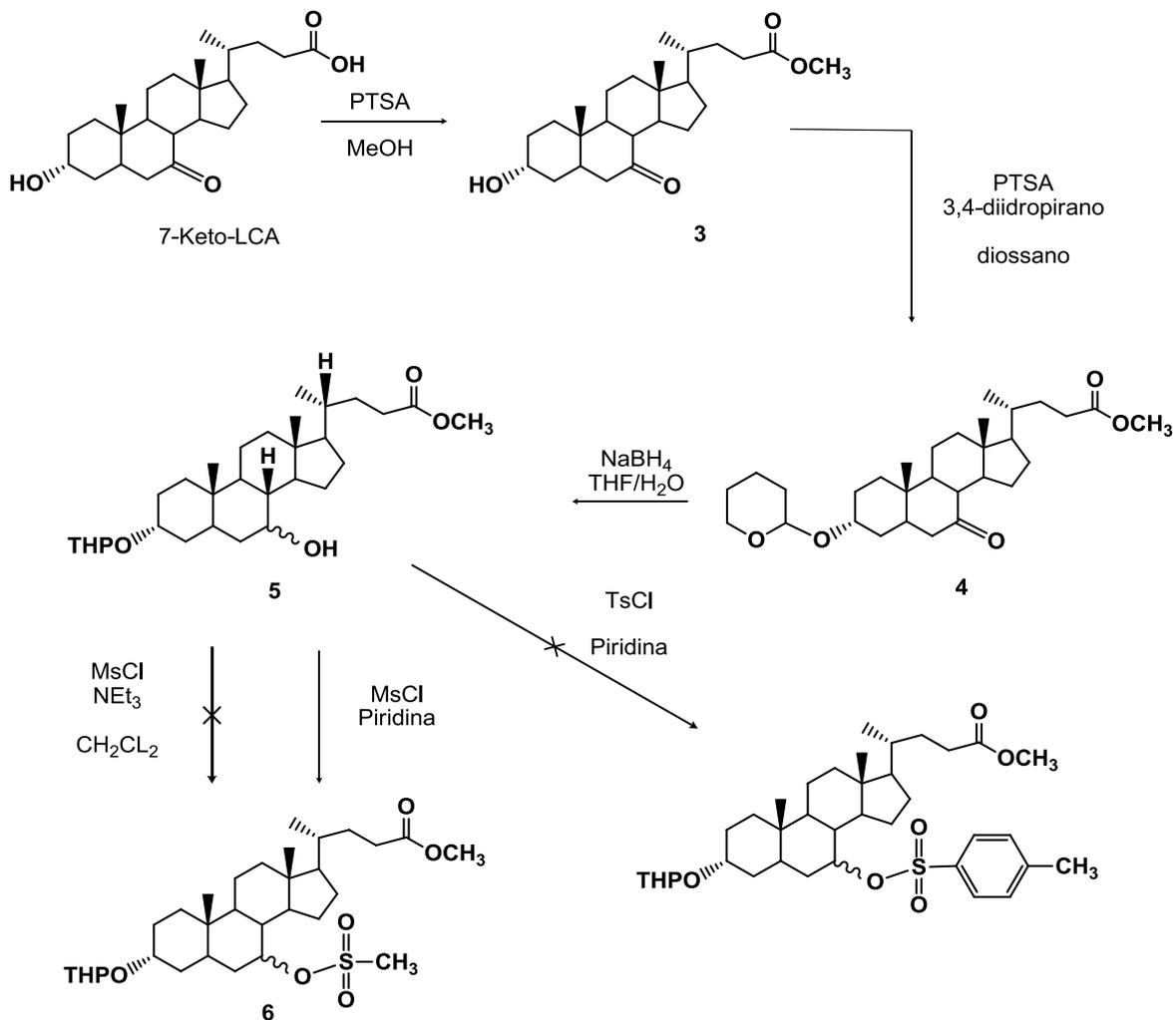


Compd	TGR5		FXR	
	EC50	Efficacy	EC50	Efficacy
7 α -F-LCA (1)	0,25	99	>100	0 (100 μ M)
7 β -F-LCA (2)	2,29	92	-	-

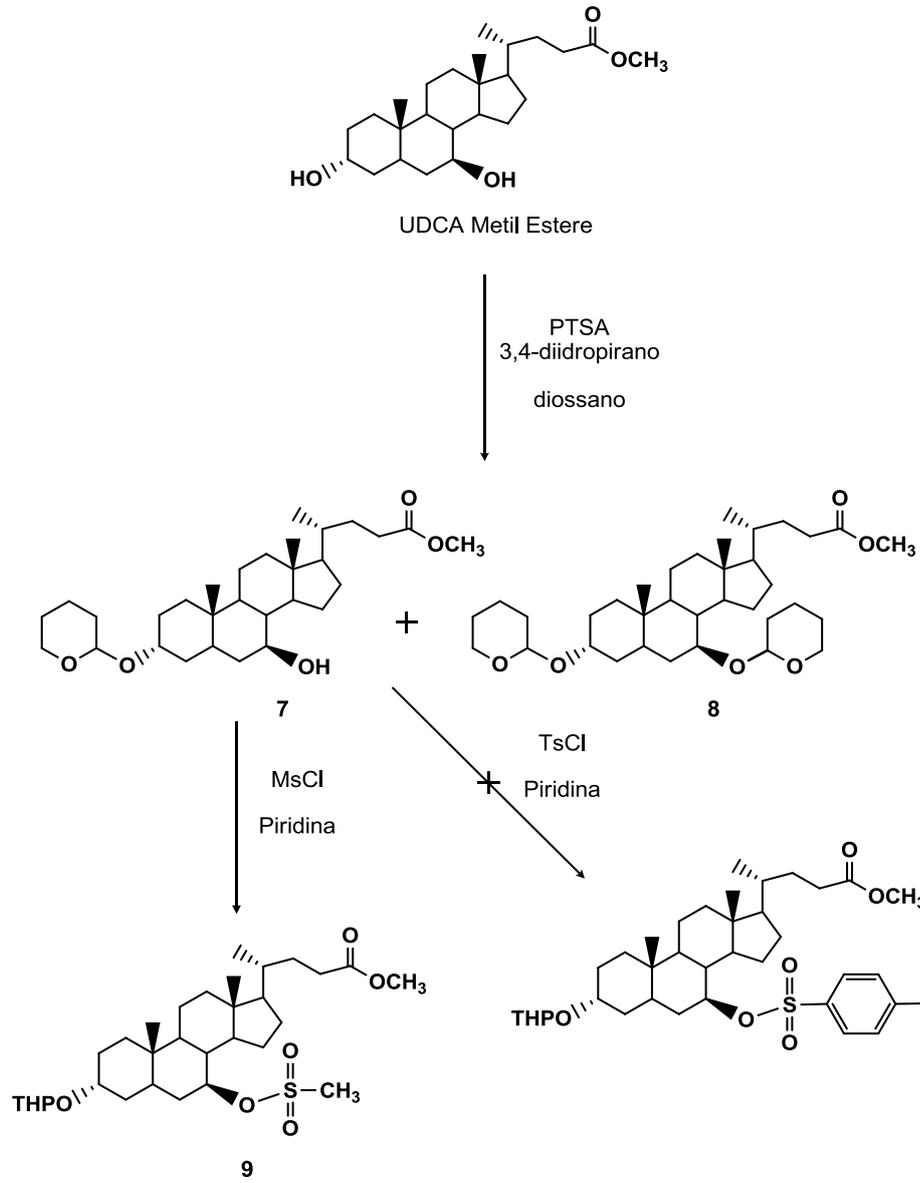


La preparazione dei derivati mesilati **M1** e **M2** è stata condotta seguendo gli schemi di sintesi 1-3, concepiti per ottenere i composti sia in miscela isomerica che nella forma isomerica pura a partire rispettivamente dall'acido 7-chetolitocolico (7-cheto LCA), dall'estere metilico dell'acido ursodeossicolico (UDCA Metil Estere) e dall'acido chenodeossicolico (CDCA).

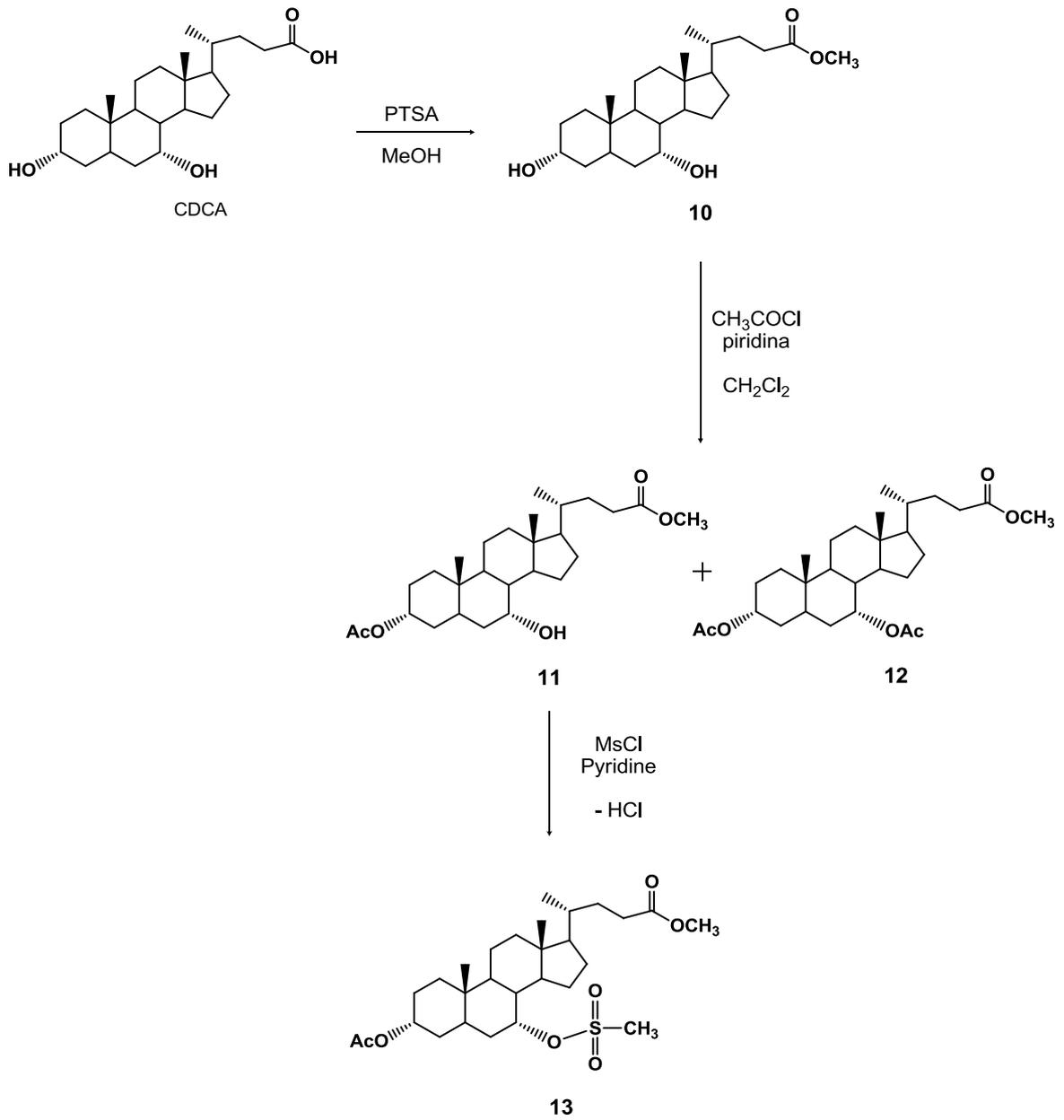
Schema di Sintesi 1



Schema di Sintesi 2



Schema di Sintesi 3



La via di sintesi progettata per ottenere i derivati mesilati in miscela isomerica è descritta nello schema 1 a partire dall'acido 7-cheto-LCA che è stato convertito, con rese quantitative, nell'estere corrispondente **3** per reazione con metanolo in presenza di acido p-toluensolfonico (PTSA) a temperatura ambiente per 12 ore. Il prodotto **3** è stato identificato attraverso lo studio dello spettro di risonanza magnetica protonica ($^1\text{H-NMR}$), che mostra un segnale caratteristico del gruppo metossilico a $\delta=3,67$.

Si è quindi proceduto con la protezione del gruppo ossidrilico legato al C_3 con il 3,4-diidropirano, in base alle più recenti pubblicazioni [23] riguardanti la sintesi di vari derivati degli acidi biliari.

Per trattamento dell'estere **3** con il 3,4-diidropirano in diossano, in presenza di PTSA a temperatura ambiente per 2 ore è stato quindi ottenuto il 3-piranil derivato **4**, che è stato purificato per flash cromatografia (n-esano/AcOEt 4:1 v/v) con resa complessiva del 45%

I segnali dello spettro $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 4,65-4,80 (m, 1H, OCHO), 3,80-3,98 (m, 1H, C_3H), 3,46-3,60 (m, 2H, OCH_2) ed i segnali del $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 96,63 (O-C-O), 62,38 ($\text{C}_{\text{piranile}}$) indicano la presenza del gruppo piranile sul C_3 del composto **4**

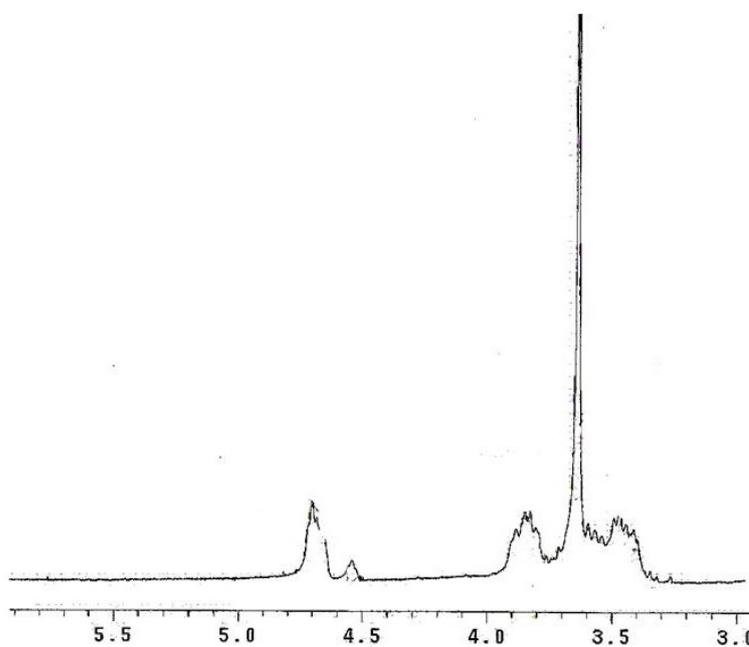


Figura 32 segnali caratteristici dello spettro $^1\text{H NMR}$ relativi al composto **4**

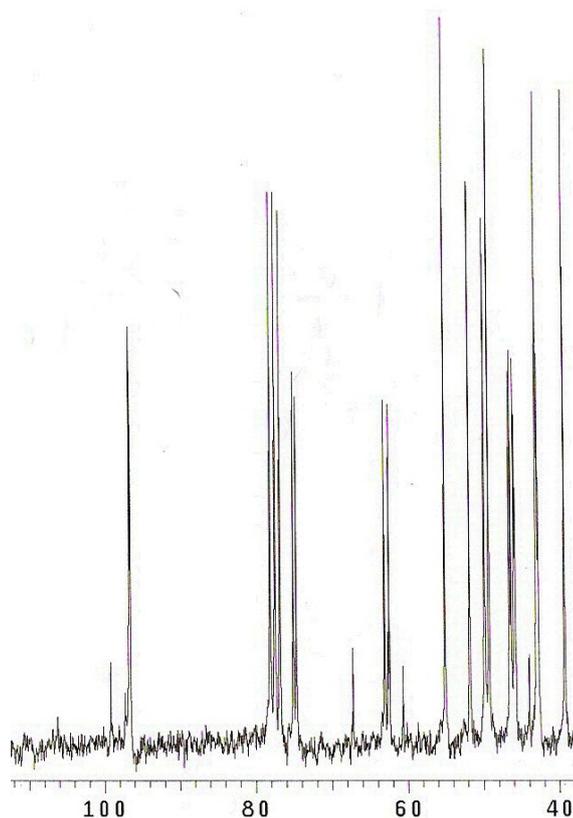


Figura 33 segnali caratteristici dello spettro ¹³C NMR relativi al composto **4**

Il composto **4** è stato quindi sottoposto a riduzione, per trattamento con NaBH₄ in THF/H₂O 4/1 v/v per 6 ore a temperatura ambiente. È stata così ottenuta la miscela **5** dei due isomeri 7α e 7β idrossi-derivati, purificata mediante flash cromatografia (etere di petrolio/AcOEt 4/1 v/v) con resa del 35%.

L'identità dei prodotti è stata confermata dai segnali presenti nello spettro ¹H-NMR, in particolare il multipletto a δ 3,80-4,00 (che integra per 2H) è attribuito al protone legato al C₇ ed al protone legato al C₃; inoltre nello spettro ¹³C NMR è presente il segnale relativo al C₇ - idrossile a δ 68,82.

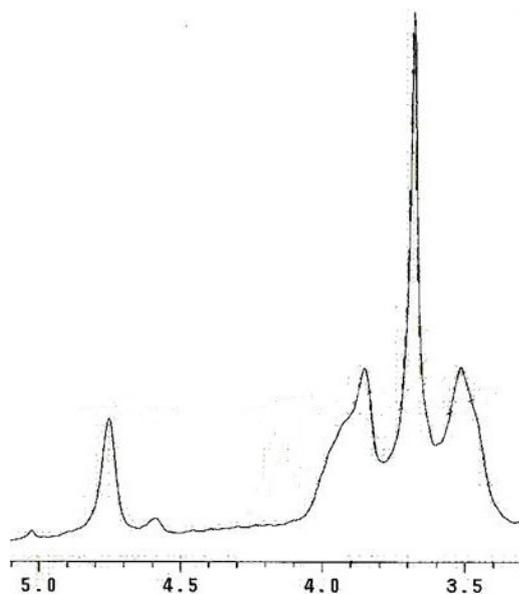


Figura 34 picchi caratteristici dello spettro ^1H NMR relativi al composto **5**

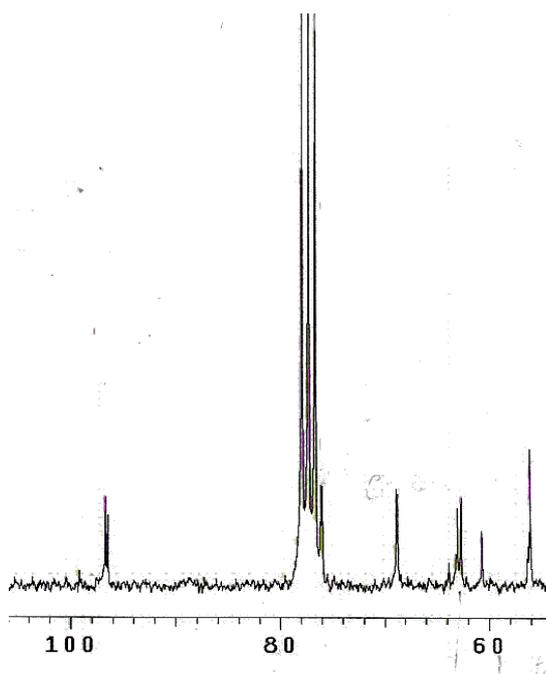


Figura 35 segnali caratteristici dello spettro ^{13}C NMR relativi al composto **5**

La miscela isomerica **5** è stata sottoposta a reazione di mesilazione con coloruro di mesile (MsCl) in diclorometano e trietilammina (NET_3), raffreddando a 0°C durante l'aggiunta del reattivo e lasciando la miscela di reazione a temperatura ambiente sotto agitazione per 12 ore. Questa

procedura ha però condotto ad una miscela di prodotti che è risultata non identificabile.

La stessa reazione condotta con MsCl in piridina in analoghe condizioni di temperatura ed agitazione, ha invece fornito il mesilato desiderato **6**, purificato per flash cromatografia (n-esano/AcOEt 4/1 v/v) con resa del 10%. L'avvenuta reazione è stata confermata dalla presenza, nello spettro ^1H NMR, di un segnale intenso a 3 ppm relativo ai tre protoni del metile legato al gruppo solfonico.

L'analisi successiva mediante HPLC ha tuttavia dimostrato uno scarso grado di purezza del composto ottenuto **6**, non rilevato dallo spettro ^1H -NMR, che ha sconsigliato l'utilizzo di questo composto nei successivi test di radiomarcatura.

È stato quindi condotto un tentativo di introdurre il gruppo tosilico (TsO) al posto del Ms e quindi la miscela isomerica **5** è stata pertanto fatta reagire con cloruro di p-toluensolfonile in piridina, nelle stesse condizioni sopra riportate. Anche in questo caso la reazione non ha dato esito positivo, ma ha consentito il solo recupero di parte del prodotto di partenza.

La via di sintesi progettata per ottenere il derivato 7β -mesilato è descritta nello schema 2 a partire dall'estere metilico dell'acido ursodeossicolico (UDCA Metil estere).

L'estere è stato trattato con 3,4-diidropirano in diossano, in presenza di PTSA a temperatura ambiente. Per ottimizzare le rese del derivato monosostituito sul C_3 , sono state condotte diverse reazioni variando sia il tempo di reazione che il rapporto tra il reattivo ed il substrato. Infatti, in accordo con i dati della letteratura che riportano la maggior reattività del C_3 rispetto al C_7 , dalla reazione col 3-4-diidropirano si ottengono sia il prodotto desiderato monosostituito **7**, che il prodotto disostituito **8**. Le condizioni che hanno consentito di minimizzare la formazione del prodotto distostituito sono state ottenute utilizzando un rapporto tra il substrato ed il reattivo di 1:3 e un tempo di reazione pari ad 1 ora. Dalla purificazione del grezzo di reazione mediante flash cromatografia (n-esano/AcOEt 4:1 v/v), sono stati isolati sia composto disostituito che il prodotto desiderato **7**, in rapporto di circa 1:9.

L'identità del prodotto finale è stata confermata dai dati dello spettro $^1\text{H-NMR}$ che evidenziano la presenza del gruppo piranile.

Il composto **7** è stato sottoposto a reazione con cloruro di mesile (MsCl) in piridina, nelle condizioni precedentemente descritte, per ottenere il derivato mesilato **9**. Anche in questo caso le rese ottenute sono risultate basse < 10%. L'analisi HPLC del prodotto **9** ha tuttavia mostrato un basso grado di purezza, nonostante nello spettro $^1\text{H-NMR}$ non ve ne fosse evidenza. È stato comunque deciso di condurre un esperimento preliminare di radiomarcatura impiegando una tecnica microfluidica ad elevata efficienza (vedi paragrafo 5.3).

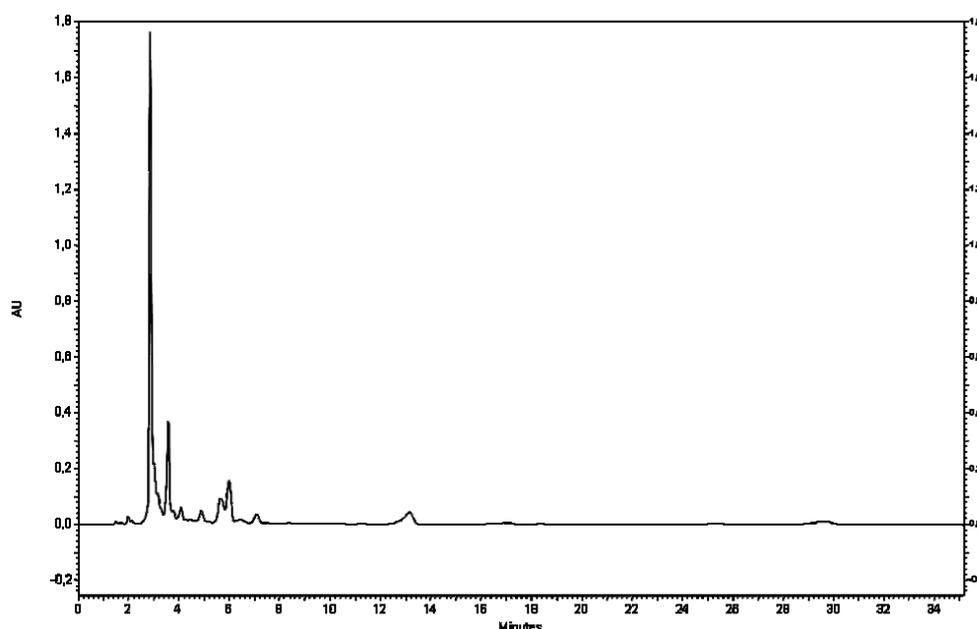


Figura 36 cromatogramma HPLC del composto **9**
 Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
 80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

È stato ipotizzato che le impurezze presenti nei mesilati ottenuti dalle vie di sintesi 1 e 2, fossero da imputare alla natura del gruppo protettore 3-4-diidropirano.

Per questo motivo si è pensato di utilizzare come gruppo protettore dell'idrossile legato al C₃, un gruppo acetilico.

È stato pertanto progettato uno schema di sintesi per ottenere il derivato 3 α -acetil-7 α -mesil dell'estere metilico dell'acido chenodeossicolico a partire dall'acido chenodeossicolico (CDCA).

Come riportato nello schema 3, il CDCA è stato trasformato nel corrispondente metil estere **10**, per trattamento con metanolo in presenza di PTSA. In questo caso le rese risultano quantitative ed il prodotto risulta sufficientemente puro per HPLC (vedi paragrafo 5.2). Il metil estere è stato quindi fatto reagire con cloruro di acetile in diclorometano e piridina per 4 ore.

Il grezzo di reazione è stato purificato per flash cromatografia ottenendo il mono acetil derivato **11** con rese del 74% e con un buon grado purezza (vedi paragrafo 5.2). Dal processo di purificazione è stato isolato anche il diacetil derivato **12** con rese inferiori al 10%. Dal confronto degli $^1\text{H-NMR}$ relativi ai composti **11** e **12** si osserva, nel diacetile, la scomparsa del segnale attribuito all'idrogeno in posizione 7β (a 3,88 ppm) e lo sdoppiamento del segnale relativo agli idrogeni dell'acetile (a 2,03 ppm), che nell' $^1\text{H-NMR}$ del composto **12** integra per 6 protoni (fig.37-38).

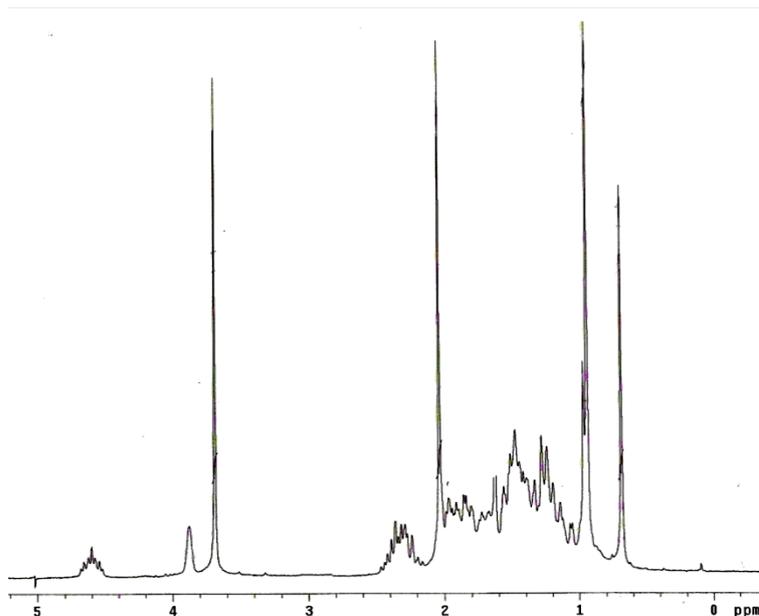


Figura 37 segnali caratteristici dello spettro $^1\text{H-NMR}$ relativi al composto **11**

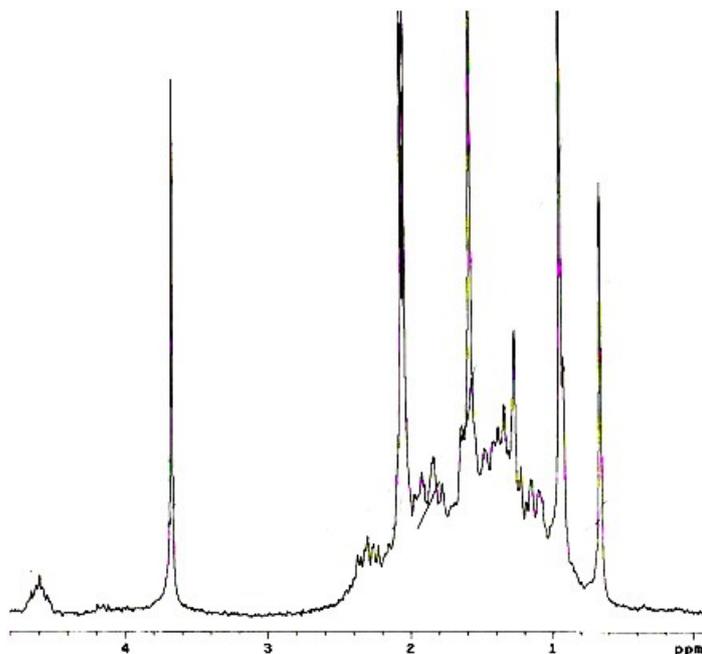


Figura 38 segnali caratteristici dello spettro ^1H NMR relativi al composto **12**

Il prodotto **11** è stato quindi sottoposto a mesilazione con MsCl raffreddando la reazione durante l'aggiunta del reattivo e lasciando successivamente la miscela di reazione a temperatura ambiente sotto agitazione per 12 ore. Il grezzo di reazione è stato purificato per flash cromatografia fornendo il derivato mesilato **13**.

Da un'analisi HPLC il composto **13** è risultato tuttavia particolarmente impuro (paragrafo 5.2 fig.45). Il grezzo di reazione, se triturato invece più volte con etere isopropilico, conduce al mesilato **13** che ad un'analisi HPLC mostra un grado di purezza notevolmente maggiore (paragrafo 5.2 fig.46). Questo risultato ci ha fatto ipotizzare che la procedura di purificazione su gel di silice induca la degradazione del mesilato. I prodotti ottenuti da entrambe le procedure di purificazione, presentano tuttavia lo stesso spettro di risonanza magnetica protonica ^1H -NMR caratterizzato dalla presenza di un intenso picco a 3 ppm relativo ai tre protoni del gruppo metilico legato al gruppo solfonico.

Il mesilato **13** ottenuto dalla triturazione con etere isopropilico è stato quindi sottoposto a reazione di radiomarcatura con tecnica microfluidica (vedi paragrafo 5.3).

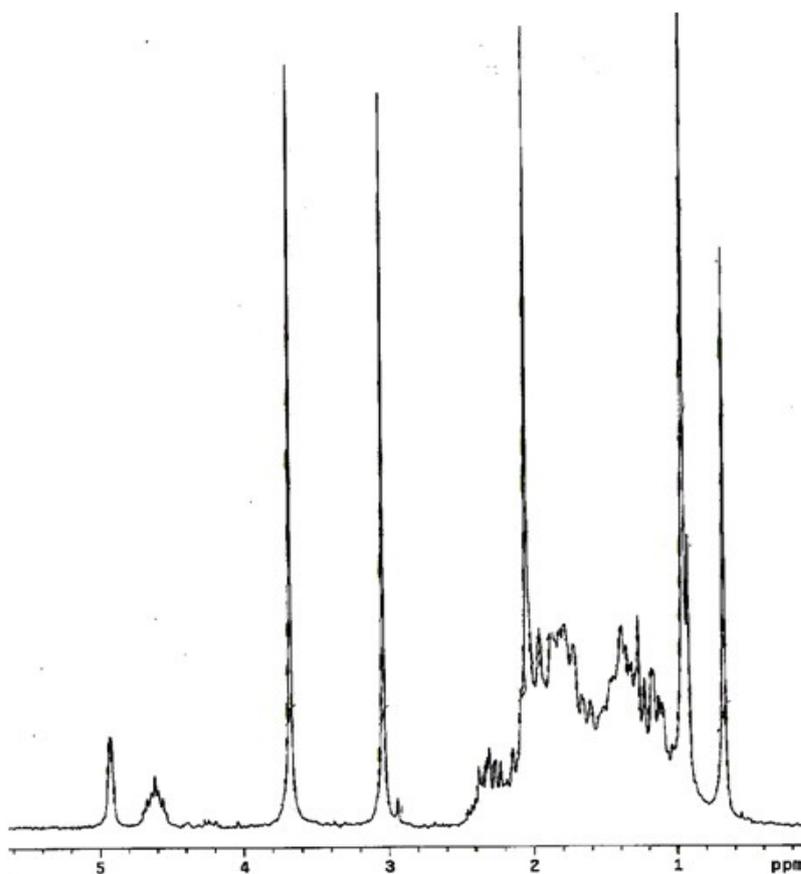


Figura 39 segnali caratteristici dello spettro ^1H NMR relativi al composto **13**

Un'aliquota del mesilato **13** è stata utilizzata per ottenere il derivato fluorurato non radioattivo **2** da utilizzare come riferimento analitico per lo studio del processo di incorporazione del ^{18}F . Infatti il processo di marcatura con ^{18}F , per la sua singolarità sintetica di utilizzare una concentrazione molto bassa e per la possibilità di produrre miscele anche complesse, richiede un riferimento analitico facilitando la successiva identificazione del prodotto radioattivo.

Il precursore **13** è stato quindi fatto reagire con tetrabuttilammonio fluoruro (TBAF) in aceto nitrile (CH_3CN) a refluxo per 12 ore. La miscela di reazione è stata quindi filtrata e lavata più volte con H_2O . La fase organica, una volta portata a secco, ha fornito un solido che è stato più volte triturato con etere isopropilico per ottenere un composto che attualmente è in fase di caratterizzazione. Ad una preliminare analisi HPLC (vedi capitolo 5) il composto ottenuto mostra un buon grado di purezza mentre dallo spettro ^1H

NMR si osserva la scomparsa sia del picco relativo al gruppo acetile (a 2,02 ppm) sia di quello relativo all'estere metilico (a 3,68 ppm). Inoltre lo spettro mostra in particolare, un segnale a 3.30 ppm che è in accordo con valori riportati in letteratura per la risonanza del protone legato ad un C-F.

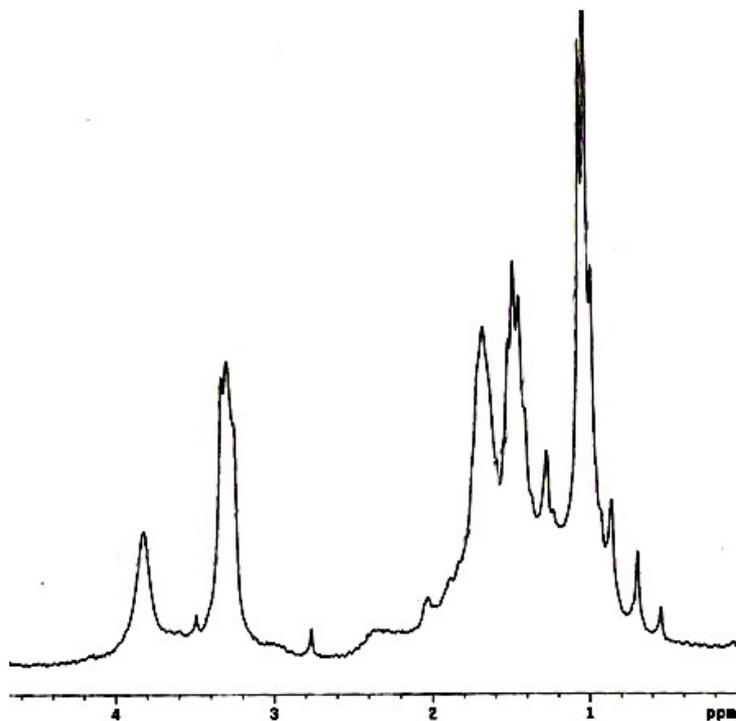


Figura 40 segnali caratteristici dello spettro ^1H NMR relativi al presunto composto **2**

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Materiali e Metodi

La struttura di tutti i composti è stata verificata per mezzo della spettrometria ^1H -NMR e per alcuni intermedi, mediante spettrometria ^{13}C -NMR e di massa.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare protonica sono stati eseguiti con uno spettrometro Varian Gemini 200 operante a 200 MHz e riferiti al segnale residuo del solvente. I chemical shift δ sono espressi in ppm e le costanti di accoppiamento J sono espresse in Hz.

Gli spettri di massa (impianto elettrico, EI:100 eV) sono stati registrati con uno spettrometro Thermo Quest Finningan (TRACE GCQ Plus).

L'evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante.

Le TLC analitiche sono state eseguite usando lastre di gel di silice 60 F₂₅₄ (MERCK) fatte reagire con una soluzione di fosfomolibdato d'ammonio in EtOH 10%, per la visualizzazione degli spots.

Le cromatografie su colonna sono state eseguite utilizzando gel di silice 60 (0.040-0.063 mm) (MERCK).

La valutazione analitica per HPLC è stata eseguita utilizzando un sistema Thermo Finningan Spectra System SN4000 accoppiato ad una pompa P2000, un degasatore SCM1000 ed un detector UV UV2000. Sono state utilizzate le colonne Thermo Hipersil C₁₈ 250 x 4.6 e Synergi Hydro RP C₁₈ 150 x 4.6.

Il sistema per la sintesi microfluidica impiegato è il sistema NanoTek (Advion, USA, product code: 900-0003).

5.2 Valutazione Analitica per HPLC

La struttura policiclica satura dei derivati oggetto di studio, ha reso complessa la risoluzione cromatografica TLC e l'analisi degli spettri NMR non è sempre risultata di lettura chiara e univoca. Per questo motivo è stata messa a punto una metodica HPLC-UV per poter definire il grado di purezza dei prodotti ottenuti a valle di adeguate procedure d'isolamento dai grezzi di reazione (flash-cromatografia o cristallizzazione).

Per la messa a punto del metodo analitico è stata usata una colonna Hypersil RP-C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm partic.) ed un rivelatore UV a $\lambda = 205$ nm e 280 nm. La scelta di tali valori di lunghezza d'onda è legata al fatto che i cromofori presenti (-COOH, -OH), per quanto con un coefficiente di estinzione molare (ϵ) basso, presentano un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda comprese tra $\lambda = 200$ -210 nm, mentre la lettura a $\lambda = 280$ nm potrebbe consentire di rilevare la presenza di eventuali prodotti di ossidazione provenienti dai vari processi sintetici.

Come fase mobile è stata inizialmente utilizzata una miscela di ACN - H₂O (60:40 v/v) ad un flusso di 1 ml/min.

In tali condizioni, il composto commerciale **CDCA** presenta due picchi (fig.41), di cui il primo attribuibile ad un eventuale prodotto di degradazione. Una variazione della composizione percentuale della miscela eluente in 80:20 ha permesso una migliore separazione cromatografica (fig.42).

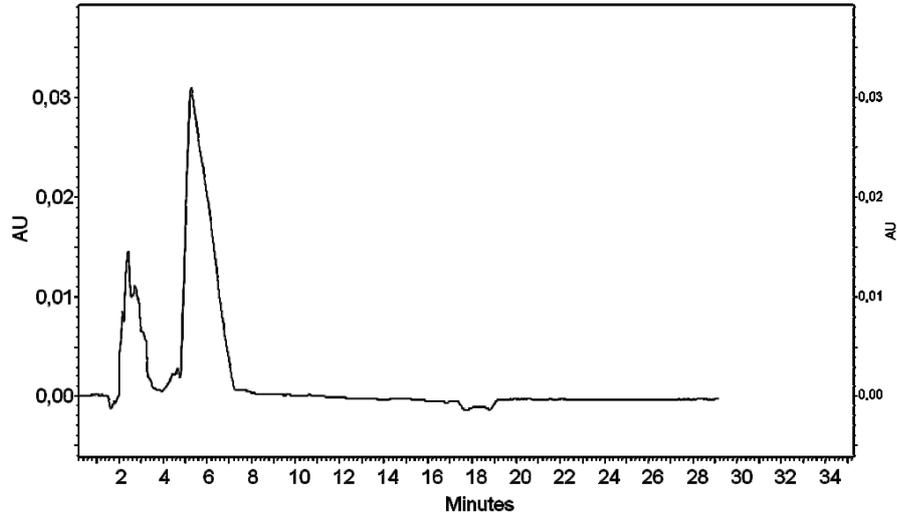


Figura 41 cromatogramma HPLC del composto **CDCA**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
60%ACN-40%H₂O Flow = 1ml/min

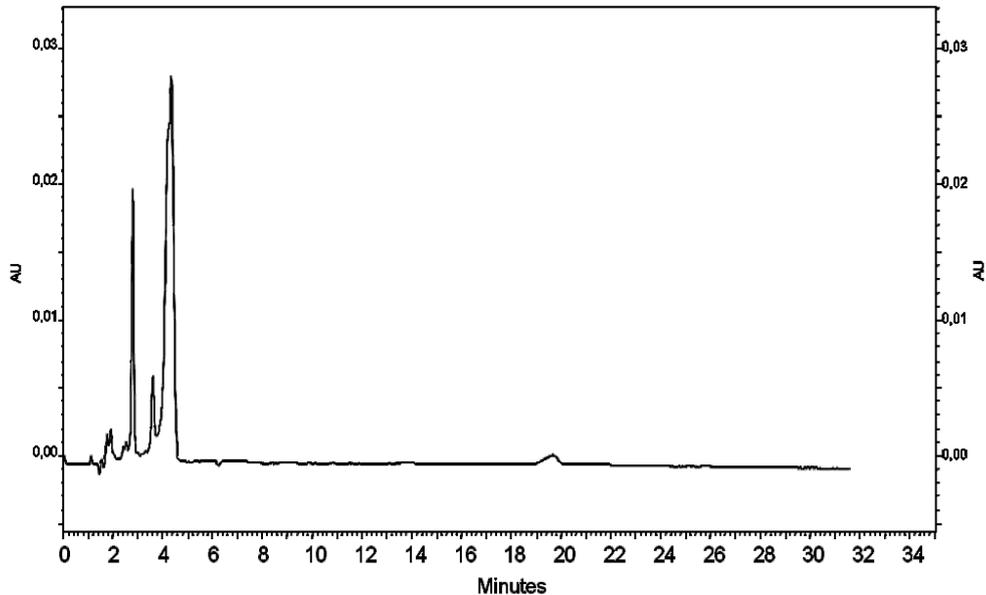


Figura 42 cromatogramma HPLC del composto **CDCA**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

L'analisi HPLC dell'estere **10** in queste condizioni, ha mostrato un picco principale a $R_t = 7.5$ min ed alcuni picchi a $R_t < 6$ min tra i quali uno è stato identificato come quello relativo al prodotto di partenza, presente comunque in quantità trascurabili (fig.43).

Andando a supporre che i valori di ϵ siano confrontabili e che le aree dei picchi riflettano i rapporti tra le quantità è possibile ipotizzare che le

impurezze presenti incidano per meno del 10% e quindi l'estere **10** può essere considerato come sufficientemente puro.

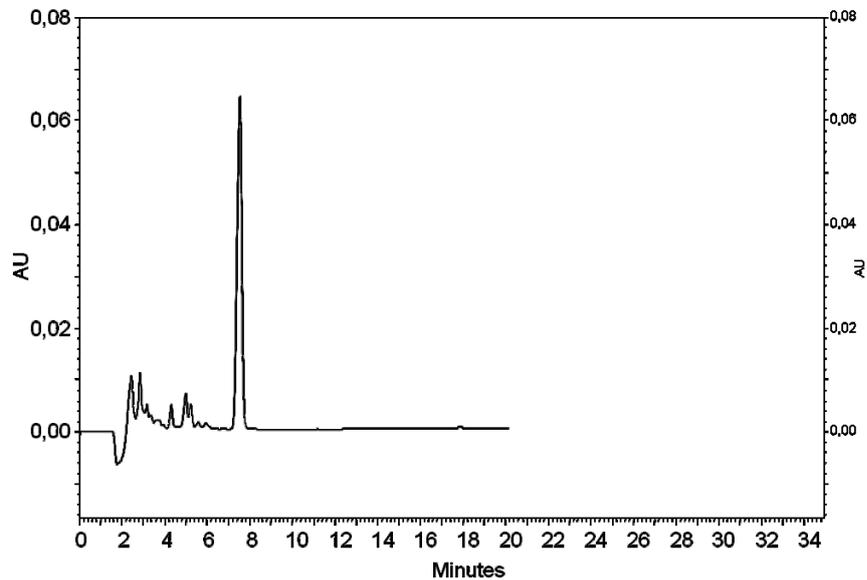


Figura 43 cromatogramma HPLC del composto **10**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

Anche il monoacetil derivato **11**, analizzato dopo la purificazione, è risultato all'analisi HPLC sufficientemente puro (fig.44). Infatti, nel cromatogramma è presente un picco a $R_t = 12$ min che ragionevolmente è attribuibile al derivato **11**, in relazione alle caratteristiche strutturali, che ne fanno prevedere una maggiore ritenzione da parte della fase stazionaria rispetto al precursore sintetico.

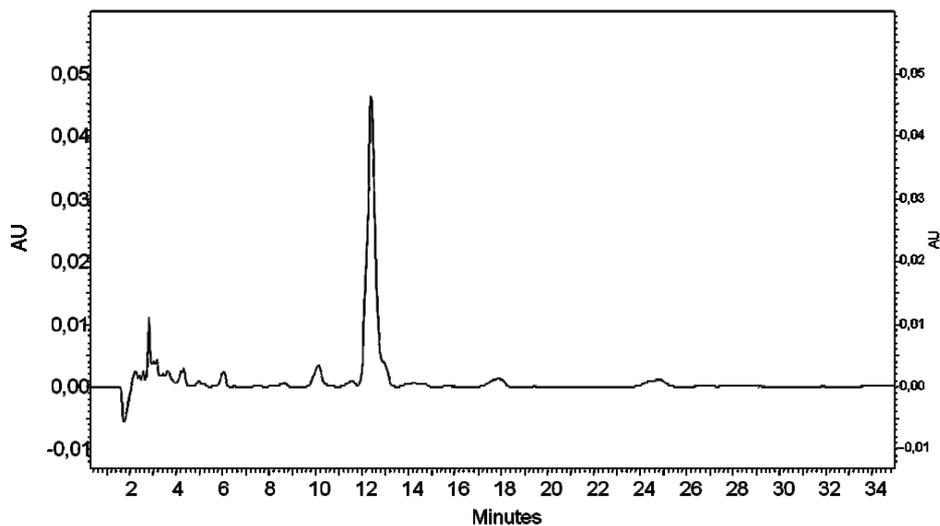


Figura 44 cromatogramma HPLC del composto **11**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

Per quanto riguarda il mesilato **13**, l'analisi HPLC ha dato indicazioni molto interessanti. Infatti, il composto ottenuto, a seguito della purificazione per flash-cromatografia, presenta una molteplicità di picchi non rilevabili per TLC o per ¹H-NMR) (fig.45), a differenza del prodotto ottenuto attraverso successive triturazioni con etere isopropilico che presenta invece un grado di purezza notevolmente maggiore (fig.46).

Dai risultati ottenuti, risulta avvalorata l'ipotesi che la procedura di purificazione su gel di silice sia responsabile della degradazione del mesilato **13**.

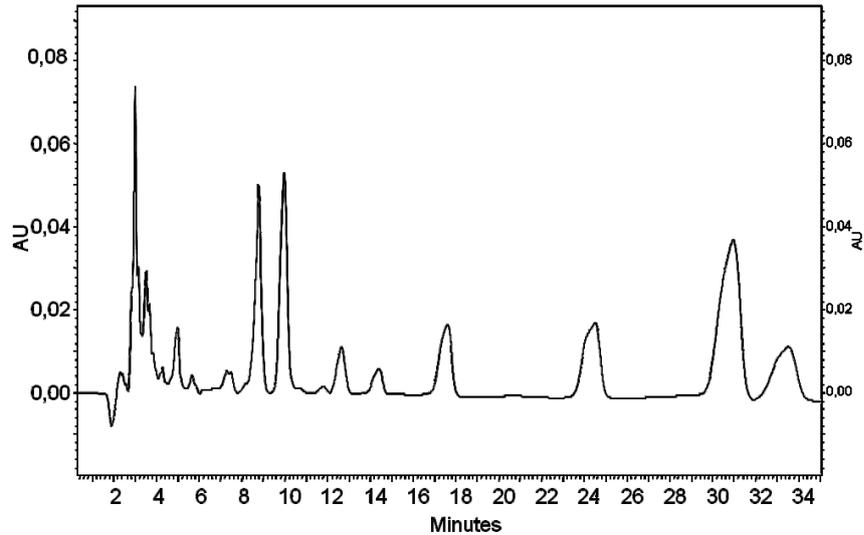


Figura 45 cromatogramma HPLC del composto **13**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

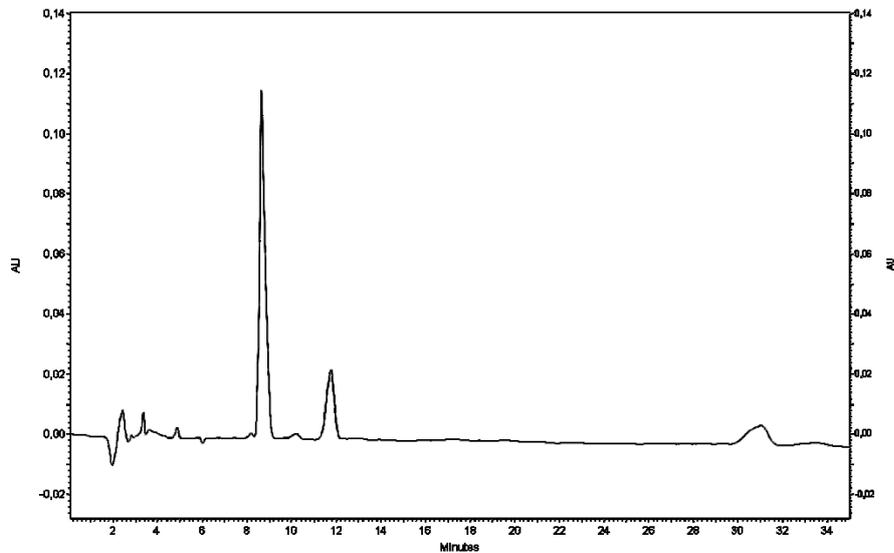


Figura 46 cromatogramma HPLC del composto **13**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

Infine il cromatogramma relativo all'ipotetico composto **2** ottenuto, ha evidenziato la presenza di un picco significativo a Rt 5,8 min. (fig.47). Tale picco non risulta presente nei cromatogrammi relativi agli intermedi precedentemente analizzati e tale segnale non risulta pertanto identificabile come appartenente ai vari intermedi.

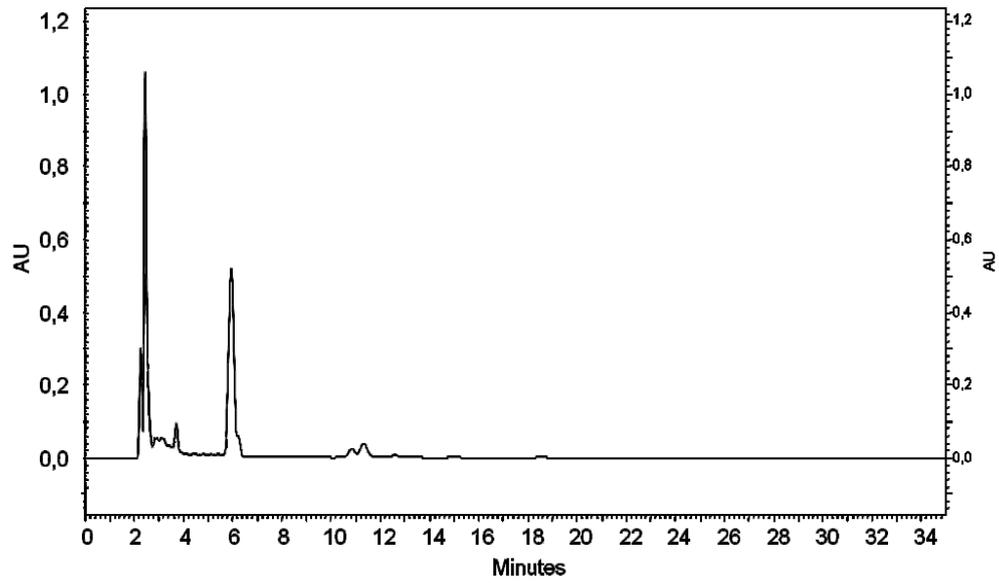


Figura 47 cromatogramma HPLC dell'ipotetico composto **2**
Colonna Thermo Hypersil C₁₈ 250X46
80%ACN-20%H₂O Flow = 1ml/min

5.3 Prove di Radiomarcatura

Le prove di marcatura con ^{18}F sono state condotte presso l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa utilizzando un'apparecchiatura Nano Tek (Advion) che utilizza microreattori a flusso. La scelta della tecnica impiegata, basata su tecnologie di microfluidica è legata alla possibilità di poter condurre un alto numero di reazioni variando sequenzialmente le condizioni di reazione (temperatura, concentrazione relativa dei reagenti, tempo di reazione) in maniera controllata e riproducibile. I test sono stati condotti utilizzando la routine "Automatic Discovery" (paragrafo 3.1.2), che permette di far interagire piccoli boli (da 10 a 100 μl) delle soluzioni dei due reagenti all'ingresso di un micro reattore. Quest'ultimo è costituito da un tubo di silice fusa (2 m x 0,1 mm \varnothing) strettamente avvolto a spirale in una matrice solida che ne permette l'inserimento in una sede riscaldata. I test sono solitamente preceduti da reazioni preliminari di priming per garantire che il sistema trasferisca nel micro reattore boli di reagenti a concentrazione costante.

Test successivi che differiscano per la temperatura fornita al micro reattore richiedono un tempo di condizionamento di 5 minuti che assicuri una distribuzione di calore omogenea a tutto il reattore. Nel caso in cui si vada a variare il solamente il flusso dei reagenti, le reazioni possono essere condotte consecutivamente.

I due reagenti sono costituiti da una soluzione contenente il substrato da marcare (precursore mesilato) e l'altra contenente il reattivo fluorurante (^{18}F -fluoruro di potassio anidro complessato con il K2.2.2.).

Sono state effettuate diverse prove di marcatura variando la temperatura (da 90 a 190°C) fornita al micro reattore, il tempo di residenza (tempo che la miscela di reazione trascorre nella zona riscaldata), il rapporto dei flussi dei due reagenti (variazione della quantità assoluta di precursore utilizzata in ogni test).

La miscela ottenuta dal processo di reazione è stata sottoposta ad analisi radio-TLC o radio-HPLC per determinare la resa di incorporazione, ovvero la quantità di ^{18}F -fluoruro incorporato nel composto organico rispetto al ^{18}F -fluoruro non reagito (espressa come percentuale della radioattività totale disponibile).

5.3.1 Radiomarcatura del 3-piraniil-7mesil UDCA Me Estere (9)

Entry	uL of complex	uL of precursor	flow ¹⁸ F complex (uL/min)	total reaction flow (uL/min)	residency time in 15,6uL reactor (sec)	T (°C)	unreacted ¹⁸ F-fluoride (%)
1	10,0	10,0	20,0	40,0	23,4	90	100
2	20,0	20,0	15,0	30,0	31,2	90	98
3	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	110	97
4	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	110	97
5	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	130	90
6	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	130	94
7	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	150	86
8	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	150	86
9	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	170	80
10	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	170	81
11	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	90	92
12	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	90	90
13	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	110	91
14	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	130	81
15	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	150	75
16	10,0	10,0	15,0	30,0	31,2	170	74
17	10,0	20,0	15,0	45,0	20,8	150	84
18	10,0	50,0	15,0	90,0	10,4	150	76
19	35,0	350,0	15,0	165,0	5,7	150	71

Nella tabella sono riportate le condizioni di reazione impiegate nei test di radio marcatura. Inizialmente le reazioni sono state condotte a temperature diverse in modo da poter valutare l'effetto del riscaldamento ed eventualmente individuare la migliore temperatura di processo. Sono state condotte anche tre prove variando la quantità assoluta di precursore utilizzato (entry 15, 17, 18). Solitamente vengono effettuati test variando anche il tempo di residenza, ma le basse rese, ottenute nelle 19 prove di marcatura, hanno impedito di trarre informazioni utili dalla variazione di tale parametro.

È interessante sottolineare come la durata delle singole reazioni sia stata, per queste prove, al massimo poco superiore ai 30 sec. consentendo così lo svolgimento di un alto numero di marcature in tempi contenuti. Le piccole

quantità di soluzioni utilizzate, permettono l'utilizzo di dosi di radioattività per ogni test nel range tra 10 e 150 MBq.

La entry 19 è stata effettuata recuperando il precursore rimasto nel loop ad una concentrazione di 10 mg/ml (più diluita rispetto alle precedenti). Infatti al termine della reazione 18, erano rimasti 150 μ l di precursore (100 nella vial e 50 nel loop) alla concentrazione di 40 mg/ml (6 mg di precursore il 150 μ l); questi sono stati diluiti in 600 μ l (concentrazione di 10 mg/ml) di una soluzione ACN/H₂O 10%. Questo test è stato effettuato in quanto esiste una crescente conoscenza degli effetti benefici dell'aggiunta di piccole percentuali di acqua in reazioni di radiofluorurazione nell'ottenere processi con rese più alte e con minor quantità di sottoprodotti.

Dall'analisi radio TLC risulta che il fluoruro si è consumato in parte, ma sono presenti più di un prodotto radiomarcato. Ciò significa che il precursore utilizzato non è puro o che il processo di radio marcatura genera anche sottoprodotti radioattivi. Come riportato nel profilo radio-TLC (fig.48), quantità variabili fra il 5 e il 20% della radioattività sono distribuite tra almeno 3 specie marcate principali, la cui resa singola risulta al massimo del 7%.

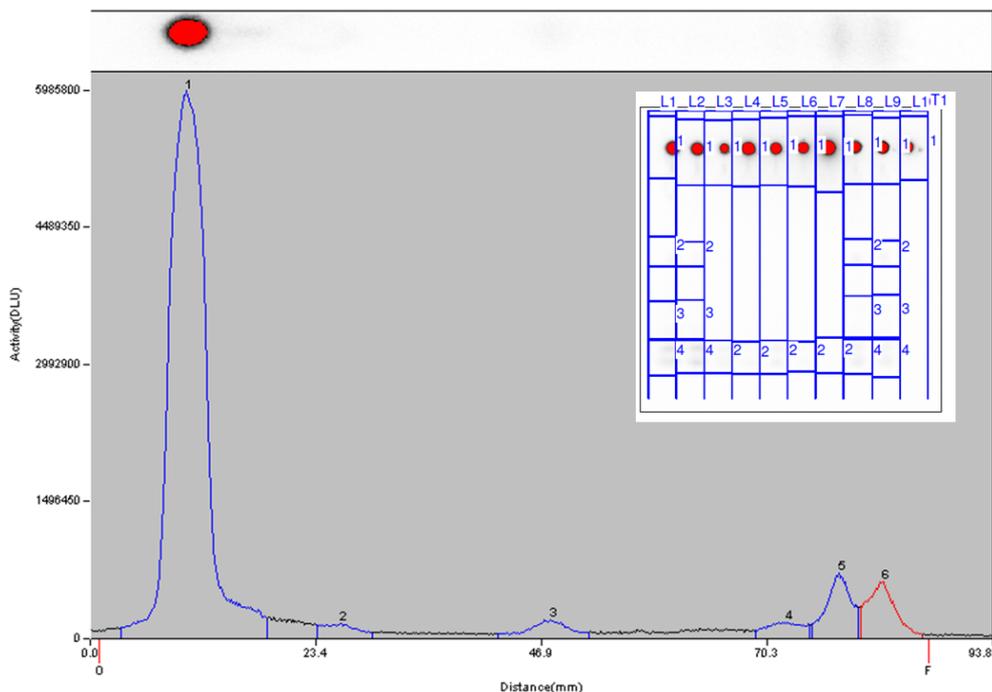


Figura 48 profilo radio-TLC della prova di marcatura del composto 9

5.3.2 Radiomarcatura del 3-acetil-7mesil CDCA Me Estere (13)

Entry	uL of complex	uL of precursor	flow ¹⁸ F complex (uL/min)	total reaction flow (uL/min)	residency time in 15,6uL reactor (sec)	T (°C)	Unreacted ¹⁸ F-fluoride (%)*
1	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	90	-
2	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	110	1
3	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	130	1
4	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	150	-
5	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	150	0,1
6	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	170	1
7	15,0	15,0	20,0	40,0	23,4	190	2
8	10,0	50,0	10,0	60,0	15,6	170	0,1
9	20,0	20,0	50,0	100,0	9,4	130	0,5
10	20,0	20,0	5,0	10,0	93,6	170	1,4

* I valori relative alla percentuale di ¹⁸F-fluoruro non reagito sono riferiti all'unico picco radioattivo osservato (a R_f = 16,4 min), valore che non concorda con i risultati ottenuti attraverso l'analisi HPLC del composto fluorurato freddo **2** (vedi capitolo 5)

Nella tabella sono riportate le condizioni di reazione impiegate nei test di radio marcatura. Inizialmente le reazioni sono state condotte a temperature diverse in modo da poter individuare la temperatura di processo più appropriata e successivamente la quantità assoluta di precursore. Nelle reazioni 9 e 10 è stato variato il tempo di residenza in modo da confrontare due reazioni con tempi di reazione tra loro molto differenti (da 10 a 95 sec.). Il maggiore grado di purezza del precursore **13** rispetto a quello impiegato nelle precedenti prove (precursore **9**), ha consentito di poter studiare i prodotti di radiomarcatura mediante analisi HPLC utilizzando un rilevatore UV a $\lambda = 210,3$ nm, un rilevatore a indice di rifrazione che misura la variazione dell'indice di rifrazione dovuta alla presenza di soluti nella fase mobile ed un radio detector. Si utilizzano pertanto strumenti con diversa funzione e sensibilità che consentono di ricavare importanti informazioni analitiche dei composti ottenuti dal processo di marcatura.

L'analisi radio-HPLC ha mostrato un picco di intensità molto bassa, ottenuto in modo riproducibile in tutte le reazioni ($R_f = 16,48$ min), che ad una percentuale massima di incorporazione dell'1-2%.

L'analisi radio-TLC non si è rivelata invece sufficientemente sensibile per rilevare la presenza di una così bassa quantità di prodotto organico fluorurato.

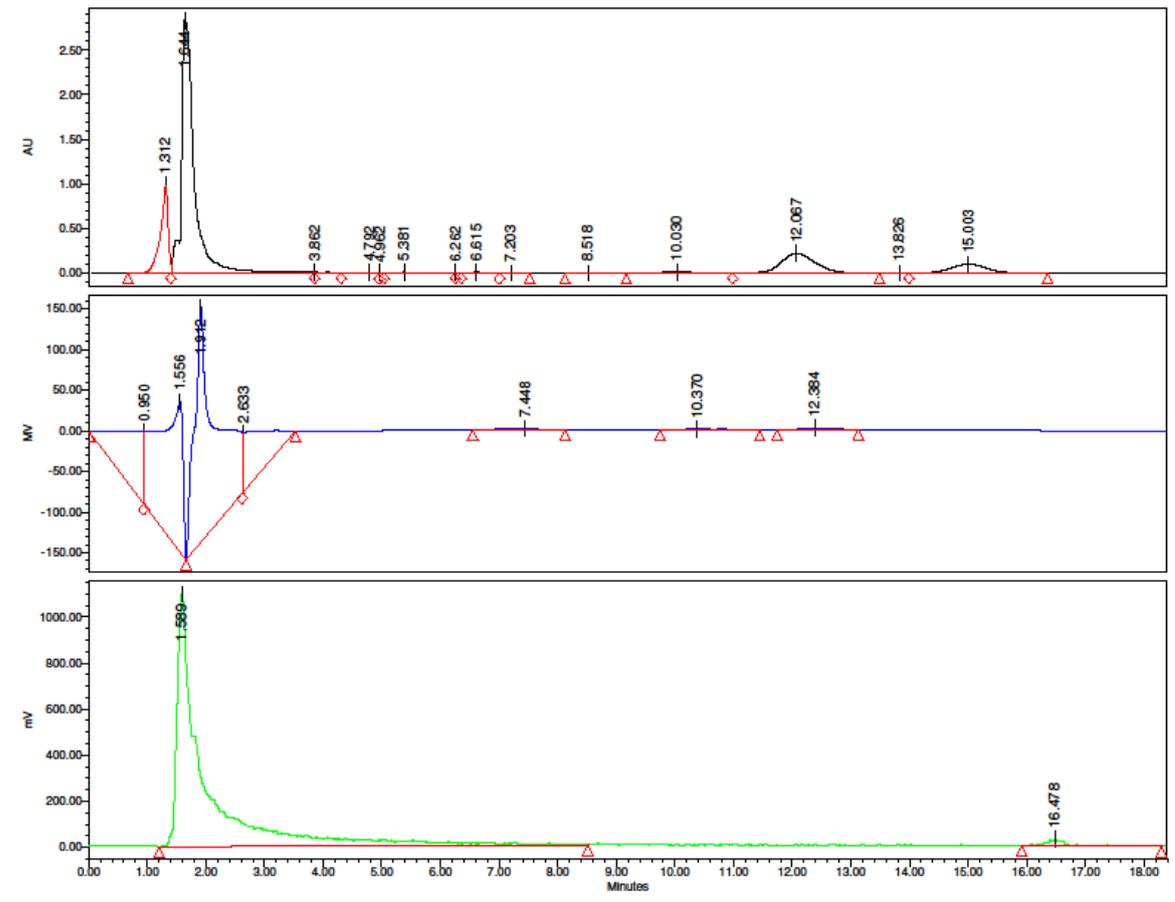


Figura 49 analisi cromatografica della prova di marcatura condotta sul precursore mesilato 13

È importante notare come dopo la reazione di marcatura, il cromatogramma HPLC continui a mostrare il segnale a $R_f = 7,22$ min, compatibile con il picco a $R_f = 8,22$ min ottenuto dall'analisi HPLC del precursore mesilato **13** (fig.49) suggerendo che le reazioni di radiomarcatura condotte in differenti condizioni, non inducono alla degradazione del precursore verificatasi invece durante le prove effettuate sul precursore **9** precedentemente descritte (fig.48).

Il comportamento all'interno del microreattore del derivato mesilato **13** è risultato infatti completamente diverso ed ha condotto alla formazione di un unico prodotto organico radiomarcato non identificabile.

Questo differente andamento osservato potrebbe essere dovuto al basso grado di purezza del mesilato **13**, in discordanza però con l'analisi $^1\text{H-NMR}$ e HPLC, oppure alla bassa reattività del precursore, tale da comportare un grado di incorporazione così basso anche variando le condizioni di reazione.

5.4 Schema 1

Estere metilico dell'acido 7-cheto litocolico (**3**):

Una soluzione di 2,03 g (5.2 mmoli) dell'acido 7-cheto litocolico e 98,9 g (0,52 mmol) di PTSA in 138 ml di metanolo viene posta sotto agitazione per 12 h a temperatura ambiente.

Dopo evaporazione del solvente la miscela di reazione è stata ripresa con AcOEt e lavata con acqua (3X20ml), con una soluzione acquosa al 5% p/v di NaHCO₃ (3X20ml) per neutralizzare l'eventuale presenza di acido non reagito, e quindi ancora con H₂O (2X20ml), essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta.

Il residuo oleoso ottenuto (**3**) 2,096 g (5,18 mmol;), è risultato puro per TLC (miscela eluente 2AcOEt/1n-esano) e utilizzato nella reazione successiva senza purificazione.

Resa della reazione: 99,6%

¹H NMR: CDCl₃ δ 3,65 (s, 3H, OCH₃); 0.91-0.95 (d, 9H, 19CH₃ +21 CH₃); 0,65 (d, 3H, 18CH₃)

¹³C NMR: CDCl₃ δ 212,31 (C₇=O); 174,82 (C₂₃=O); 71,01 (C₃-OH); 51,77 (OCH₃)

Estere metilico dell'acido 3-(tetraiodo-2H-pirano)-7-cheto litocolico (4):

Ad una soluzione di 3,02 g (7,46 mmol) del metil estere **3** e 0,143g di PTSA (0.75 mmol) in diossano (65 ml) vengono aggiunti goccia a goccia 10,12 ml di 3,4-diidro-pirano (111,9 mmol) (densità 0,926 g/ml), la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione 2 ore a temperatura ambiente monitorando la reazione su TLC (n-esano/AcOEt 4:1)

Dopo l'evaporazione del solvente, il residuo è stato ripreso con AcOEt e lavato con acqua (3X20ml), successivamente con una soluzione acquosa al 5% p/v di NaHCO₃ (3X20ml) per neutralizzare l'eventuale presenza di acido non reagito e poi ancora con H₂O (2X20ml), essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di n-esano/AcOEt 4:1 v/v.

Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 1,65g (3,36 mmol) di **(4)**

Resa della reazione: 45%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,65-4,80 (m, 1H, OCHO); 3,80-3,98 (m, 1H, C₃H); 3,65 (s, 3H, COOCH₃); 3,46-3,60 (m, 2H, OCH₂); 0,91-0,95 (d, 9H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,65 (d, 3H, 18CH₃)

¹³C NMR: CDCl₃ δ 211,95 (C₇=O); 174,74 (C₂₃=O); 96,63 (O-C-O); 74,72 (C₃), δ 62,38 (C_{piranile})

Estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7-idrossi litocolico, miscela di isomeri α e β (5):

A 0,23g (0,47mmol) del composto **4** disciolti in 50 ml di una soluzione di tetraidrofurano/acqua (4/1, v/v) sono stati aggiunti 0.053g (1,41 mmol) di sodio boroidruro (NaBH₄). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per sei ore a temperatura ambiente. Dopo evaporazione del solvente, il residuo è stato disciolto in AcOEt e lavato con H₂O (3X10ml), con una soluzione acquosa al 5% p/v di NaHCO₃ (3X10ml) e successivamente con H₂O (2X10ml). La fase organica essiccata con Na₂SO₄ anidro è stata evaporata a pressione ridotta per ottenere un residuo solido bianco-giallastro che è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela n-esano/AcOEt 4:1 v/v.

Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 0,065g (0,16 mmol) di 3-(tetrahydro-2H-pyran)-7-idrossi-LCA (α e β isomeri) (**5**)

Resa della reazione: 35%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,73 (m, 1H, OCH(CH₂)O); 3,80-4,00 (m, 2H, 3-CH + 7-CHOH); 3,67 (s, 3H, COOCH₃); 3,46-3,60 (m, 2H, OCH₂); 0.88-0.90 (d, 9H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,64 (d, 3H, 18CH₃)

¹³C NMR: CDCl₃ δ 174,89 (C₂₃=O); 96,68 (O-C_{piranile}-O); 75,96 (C₃ + C₇); 62,65 (C_{piranile})

Estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7-mesil litocolico, miscela di isomeri α e β isomeri (6):

Ad una soluzione di **5** (0,20g, 0,45mmol) in 5 ml di piridina raffreddata a 0°C, vengono aggiunti goccia a goccia 0,35 ml di mesil cloruro (4,5mmol) La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. La miscela di reazione è stata quindi trattata con acqua e ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂ La fase organica ripetutamente lavata con acqua è stata essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta. Il residuo oleoso bruno-giallastro ottenuto è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela n-esano/AcOEt 4:1 v/v.

Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 0,013g ($2,3 \times 10^{-2}$ mmol) di estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7-mesil litocolico (α e β isomeri) (**6**)

Resa della reazione: 5,1%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,72 (m, 1H, OCH(CH₂)O); 3,80-4,00 (m, 2H, 3-CH + 7-CHOH); 3,67 (s, 3H, COOCH₃); 3,46-3,60 (m, 4H, 2 x OCH₂); 3,05 (s, 3H, SO₂CH₃); 0,92 (d, 9H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,65 (d, 3H, 18CH₃)

5.5 Schema 2

Estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7 β -idrossi ursodeossicolico (**7**):

Ad una soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente di UDCA Metil Estere 0,50g (1,23mmol) e PTSA 23,4mg (0,123 mmol) in diossano (15 ml) viene aggiunto goccia a goccia il 3,4-diidro-2H-pirano 0,34ml (3,69 mmol) in 6 ml di diossano, monitorando la reazione con una TLC (n-esano/AcOEt 4:1). La miscela è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 1 ora.

Dopo l'evaporazione del solvente, il residuo viene ripreso con AcOEt e lavato con acqua (3X20ml), con una soluzione acquosa al 5% p/v di NaHCO₃ (3X20ml) per neutralizzare l'eventuale presenza di acido non reagito, poi ancora con H₂O (2X20ml), essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporato a pressione ridotta.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di n-esano/AcOEt 4:1 v/v.

Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 0,3g (0,61 mmol) di 3-(tetraidro-2H-pirano)-7 β -idrossi ursodeossicolico metil estere (**8**):

Resa della reazione: 49,6%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,73 (m, 1H, OCH(CH₂)O); 3,85-4,00 (m, 2H, 3-CH + 7-CHOH); 3,67 (s, 3H, COOCH₃); 3,45-3,60 (m, 4H, 2 x OCH₂); 0,86-0,89 (d, 9H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,66 (d, 3H, 18CH₃)

¹³C NMR: CDCl₃ δ 174,85 (C₂₃=O); 97,16 (O-C_{piranile}-O); 76,67 (C₃ + C₇); 63,05 (C_{piranile})

Estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7 β -mesil ursodeossicolico (9):

A 0,150g (0,61 mmol) di **7** in 4,6 ml di piridina raffreddata a 0°C, vengono aggiunti goccia a goccia 0,20 ml di mesil cloruro (2,6 mmol). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. La miscela di reazione è stata quindi trattata con acqua e ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica ripetutamente lavata con acqua è stata essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta. Il residuo oleoso bruno-giallastro ottenuto è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela n-esano/AcOEt 4:1 v/v.

Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 0,029g (5,2x10⁻² mmol) di estere metilico dell'acido 3-(tetraidro-2H-pirano)-7 β -mesil litocolico (**9**)

Resa della reazione: 8,5%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,72 (m, 1H, OCH(CH₂)O); 3,80-4,00 (m, 1H, 3-CH); 3,67 (s, 3H, COOCH₃); 3,46-3,60 (m, 4H, 2 x OCH₂); 2,99 (s, 3H, SO₂CH₃); 0,92 (d, 6H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,62 (d, 3H, 18CH₃)

5.6 Schema 3

Estere metilico dell'acido chenodeossicolico (**10**):

Una soluzione di 1,000g (2,55 mmoli) dell'acido chenodeossicolico e 48,7 mg (0,26 mmol) di PTSA in 68 ml di metanolo viene posta sotto agitazione per 12 h a temperatura ambiente.

Dopo evaporazione del solvente la miscela di reazione è stata ripresa con AcOEt e lavata con acqua (3X20ml), con una soluzione acquosa al 5% p/v di NaHCO₃ (3X20ml) per neutralizzare l'eventuale presenza di acido non reagito, e quindi ancora con H₂O (2X20ml), essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta.

Il residuo ottenuto (**10**) 0,992g (2,44 mmol;), è risultato puro per TLC (miscela eluente 2AcOEt/1n-esano) e utilizzato nella reazione successiva senza purificazione.

Resa della reazione: 95,7%

¹H NMR: CDCl₃ δ 3,85 (s, 1H, 7CH); 3,66 (s, 3H, OCH₃); 3,45 (m, 1H, 3CH); 0,91-0,95 (d, 6H, 19CH₃ + 21 CH₃); 0,66 (d, 3H, 18CH₃)

Estere metilico dell'acido 3 β -Acetil chenodeossicolico (11):

1,10 g (2,71 mmol) di **(10)** vengono disciolti in 5,5 ml di diclorometano. Alla soluzione raffreddata e sotto agitazione, vengono addizionati 220 μ l di piridina e 220 μ l di cloruro di acetile (CH₃COOCl). La reazione viene lasciata per 4 ore a temperatura ambiente e successivamente lavata con H₂O. La fase organica viene quindi essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione viene disciolto in diclorometano e purificato mediante flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela n-esano/AcOEt 4/1 v/v. Dal processo di purificazione sono stati ottenuti 0.94 g (2.01 mmol) del derivato monoacetilato **(10)**.

Resa della reazione: 74%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,50-4,70 (m, 1H, 3CH); 3,83 (s, 1H, 7CH); 3,64 (s, 3H, COOCH₃); 2,03 (s, 3H, OAc); 0.94 (d, 6H, 19CH₃ +21 CH₃); 0,68 (d, 3H, 18CH₃)

Estere metilico dell'acido 3 β -Acetil-7 β -mesil chenodeossicolico (13):

500 mg (1,1 mmol) del composto purificato (**11**) vengono disciolti in 6ml di piridina.

Alla soluzione sotto agitazione viene addizionato il MsCl (0,54ml, 7 mmol) goccia a goccia. La reazione viene monitorata nelle prime ore e tenuta per 12 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi trattata con acqua e ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica viene ripetutamente lavata con acqua, una soluzione di HCl dil. e una soluzione di bicarbonato al 5%; essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione viene ridisciolti in toluene e purificato mediante cromatografia flash su gel di silice utilizzando come eluente una miscela n-esano/AcOEt 3/1 v/v. A causa del basso grado di purezza del composto ottenuto, in sostituzione alla cromatografia flash, il composto grezzo è stato, in seguito alla fase di lavaggio, più volte triturato con etere isopropilico ottenendo un solido bianco di purezza accettabile.

Resa della reazione: 31,8%

¹H NMR: CDCl₃ δ 4,45-4,75 (m, 1H, 3CH); 3,83 (s, 1H, 7CH); 3,68 (s, 3H, COOCH₃); 3,04 (s, 3H, SO₂CH₃); (2,04 (s, 3H, OAc); 0,95 (d, 6H, 19CH₃ +21 CH₃); 0,67 (d, 3H, 18CH₃)

6. CONCLUSIONI

A conclusione di questo studio è fondamentale sottolineare come l'approccio impiegato nella realizzazione dei percorsi sintetici progettati, abbia posto in risalto il pesante effetto dei vincoli sterici sulla reattività delle posizioni oggetto di trasformazione chimica, determinati dalla struttura steroidea e più in generale dalle peculiarità chimiche di questa classe di composti.

In particolare, una realtà basata sulla prospettiva di sfruttare la classica reattività nucleofila (assistita da agenti criptanti) del ^{18}F -fluoruro con substrati mesilati o tosilati, si è dimostrata particolarmente complessa e di difficile realizzazione, nonostante l'impiego di tecniche di marcatura avanzate quali quelle basate su approcci di microfluidica.

In conclusione, questa tesi ha permesso di:

1. Identificare le strategie di sintesi perseguibili in vista della loro estensione alla preparazione di radiotraccianti contenenti ^{18}F .
2. Porre in risalto le problematiche sperimentali relative a specifici substrati.
3. Definire i parametri analitici per lo studio dei prodotti in esame.
4. Avviare i test di radiomarcatura mediante approcci di microfluidica.

BIBLIOGRAFIA:

- [1]. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137–174, 2003.
- [2]. Maruyama, T.; Miyamoto, Y.; Nakamura, T.; Tamai, Y.; Okada, H.; Sugiyama, E.; Nakamura, T.; Itadani, H.; Tanaka, K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 298, 714–719.
- [3]. Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M. A G protein coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 9435–9440
- [4]. Wang, H. B.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR BAR. *Mol. Cell* 1999, 3, 543-553
- [5]. Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999, 284, 1362–1365
- [6]. Stefano Fiorucci; Andrea Mencarelli; Giuseppe Palladino; Sabrina Cipriani. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X receptor in lipid and glucose disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.30 No.11
- [7]. Philippe Lefebvre, Bertrand Cariou, Fleur Lien, Folkert Kuipers, And Bart Staels. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol Rev* 89: 147–191, 2009

- [8]. Mayuko Nakahara; Hiroshi Fujii; Patrick R. Maloney; Makoto Shimizu; Ryuichiro Sato. Bile Acids Enhance Low Density Lipoprotein Receptor Gene Expression via a MAPK Cascade-mediated Stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 2002, 37229-37234
- [9]. Giovanni Rizzo; Daniela Passeri; Francesca De Franco; Gianmario Ciaccioli; Loredana Donadio; Giorgia Rizzo; Stefano Orlandi; Bahman Sadeghpour; Xiaoxin X. Wang; Tao Jiang; Moshe Levi; Mark Pruzanski; Luciano Adorini. Functional characterization of the semi-synthetic bile acid derivative INT-767, a dual FXR and TGR5 agonist. *Molecular Pharmacology Fast Forward*. Published on July 14, 2010 as doi:10.1124/mol.110.064501
- [10]. Hiroyuki Sato; Antonio Macchiarulo; Charles Thomas; Antimo Gioiello; Mizuho Une; Alan F. Hofmann; Régis Saladin; Kristina Schoonjans; Roberto Pellicciari; Johan Auwerx. Novel Potent and Selective Bile Acid Derivatives as TGR5 Agonists: Biological Screening, Structure-Activity Relationships, and Molecular Modeling Studies. *J. Med. Chem.* 2008, 51,1831–1841
- [11]. Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ, and Willson TM (2002) 6 α -Ethyl chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* 45, 3569–3572
- [12]. Roberto Pellicciari; Antimo Gioiello; Antonio Macchiarulo; Charles Thomas; Emiliano Rosatelli; Benedetto Natalini; Roccaldo Sardella; Mark Pruzanski; Aldo Roda; Elisabetta Pastorini; Kristina Schoonjans; Johan Auwerx. Discovery of 6 α Ethyl-23(S)-methylcholic Acid (S EMCA, INT 777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabesity. *J. Med. Chem.*, 2009, 52 (24), 7958–7961

- [13]. Cedric Genet; Axelle Strehle; Celine Schmidt; Geoffrey Boudjelal; Annelise Lobstein; Kristina Schoonjans; Michel Souchet; Johan Auwerx; Regis Saladin; Alain Wagner. Structure–Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 53, No. 1
- [14]. Cedric Genet; Axelle Strehle; Celine Schmidt; Geoffrey Boudjelal; Annelise Lobstein; Kristina Schoonjans; Michel Souchet; Johan Auwerx; Regis Saladin; Alain Wagner. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 178–190
- [15]. Brian W. Budzika; Karen A. Evans; David D. Wisnoskia; Jian Jina; Ralph A. Rivero; George R. Szewczyk; Channa Jayawickremec; David L. Moncolc; Hongshi Yud. Synthesis and structure–activity Relationships of a series of 3-aryl 4-isoxazolecarboxamides as a new class of TGR5 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 1363-1367
- [16]. Mark R. Herberta; Dana L. Siegela; Lena Staszewskib; Charmagne Cayanab; Urmi Banerjeec; Sangeeta Dhamijac; Jennifer Andersonc; Amy Fand; Li Wangd; Peter Rixd; Andrew K. Shiaub; Tadimetri S. Raod; Stewart A. Noblea; Richard A. Heymanb; Eric Bischoffc; Mausumee Guhac; Ayman Kabakibib; Anthony B. Pinkerton. Synthesis and SAR of 2-aryl-3-aminomethylquinolines as agonists of the bile acid receptor TGR5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 5718–5721
- [17]. Ulrich Abel; Thomas Schlüter; Andreas Schulz; Eva Hambruch; Christoph Steeneck; Martin Hornberger; Thomas Hoffmann; Sanja Perović-Ottstadt; Olaf Kinzel; Michael Burnet; Ulrich Deuschle; Claus Kremoser. Synthesis and pharmacological validation of a novel series

Of non-steroidal FXR agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 4911–4917

- [18]. Guanghui Deng; Weihua Li; Jianhua Shen; Hualiang Jiang; Kaixian Chen; Hong Liu. Pyrazolidine-3,5-dione derivatives as potent non steroidal agonists of farnesoid X receptor: Virtual screening, synthesis, and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (2008) 5497–5502
- [19]. Miller P.W.; Long N.J.; de Mello A.J.; Vilar R.; Passchier J.; Gee A. Rapid formation of amides via carbonylative coupling reactions using a microfluidic device. *Chem. Commun.* 5 (2006), 546-548
- [20]. Wootton R.C.R; Fortt R.; de Mello A.J. A microfabricated nanoreactor For safe, continuous generation and use of singlet oxygen. *Org Proc Res Dev.* 6, 2002, 187-189
- [21]. Lu S.Y.; Pike V.W. In *PET Chemistry-The driving force in Molecular Imaging* (Eds: P.A. Schubiger, L. Lehmann, M. Friebe), Springer Verlag, Heidelberg. 2007, 271-287
- [22]. Lucignani G. Pivotal role of nanotechnologies and biotechnologies for molecular imaging and therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33, 2006, 849-851
- [23]. Roberto Pellicciari; Hiroyuki Sato; Antimo Gioiello; Gabriele Costantino; Antonio Macchiarulo; Bahman M. Sadeghpour; Gianluca Giorgi; Kristina Schoonjans; Johan Auwerx. Nongenomic Actions of Bile Acids. Synthesis and Preliminary Characterization of 23- and 6,23 Alkyl-Substituted Bile Acid Derivatives as Selective Modulators for the G-Protein Coupled Receptor TGR5. *J. Med Chem.* 2007,50, 4265-4268