



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Química

COMPOSTOS DE RENI I TECNECI PEL DESENVOLUPAMENT DE RADIOFÀRMACS DE SEGONA GENERACIÓ

TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat en Química

Joan Lecina Vicente

2012

Dirigida per:

Joan Suades Ortuño

Memòria presentada per aspirar al Grau
de Doctor per Joan Lecina Vicente

Joan Lecina Vicente

Vist i plau

Dr. Joan Suades Ortuño

Bellaterra, 26 de Setembre del 2012

Part dels resultats d'aquesta tesi han estat descrits en les següents publicacions:

- “New Bioconjugated Rhenium Carbonyls by Transmetalation Reaction with Zinc Derivatives” Lecina, J.; Carrer, A.; Alvarez-Larena, A.; Mazzi, U.; Melendez-Alafort, L.; Suades, J. *Organometallics* **2012**, 31, 5884. (*Número especial dedicate a la química organometal·lica en medicina*).
- “Preparation of transition metal isonipecotic acid dithiocarbamate conjugates and analogs as radiopharmaceuticals useful as therapeutic and/or diagnostic agents” Suades, J.; Lecina, J.; Carrer, A.; Mazzi, U. *Eur. Pat. Appl.* **2012**, EP 2426107 A1 20120307.
- “Transition metal-conjugated radiopharmaceuticals that can be used as therapeutic and/or diagnostic agents” Suades, J.; Lecina, J.; Carrer, A.; Mazzi, U. *PCT Int. Appl.* **2012**, WO 2012017103 A1 20120209.

I han estat exposats:

Títol: Bioconjugated Re and Tc-99 carbonyls by transmetallation with Zn(II) compounds.

Congrés: Terachem 2010.

Lloc i data: Bressanone, Italy. September 2010.

Tipus de contribució: Poster.

Títol: New rhenium complexes with Ciprofloxacin.

Congrés: Terachem 2010.

Lloc i data: Bressanone, Italy. September 2010.

Tipus de contribució: Poster.

Títol: Rhenium Carbonyl Compounds With Metallothionein For Radiopharmaceutical Applications

Congrés: ISABC 2011

Lloc i data: Barcelona, Spain. December 2011.

Tipus de contribució: Poster.

Títol: Transmetalation Reaction between Zn (II) and Tc-99m as a Tool to Prepare New Radiopharmaceuticals

Congrés: ISABC 2011

Lloc i data: Barcelona, Spain. December 2011.

Tipus de contribució: Poster.

Índex



ÍNDEX

Llistat d'acrònims	vii
Índex de Fórmules	ix
I. Introducció a la Radiofarmàcia	
1. Introducció	3
1.1. La Medicina Nuclear.....	3
1.2. Els Radiofàrmacs	4
1.2.1. Radiofàrmacs de diagnosi	5
1.2.2. Radiofàrmacs terapèutics	7
1.3. El Tecneci-99m	8
1.3.1. Preparació i classificació dels radiofàrmacs de Tecneci.....	9
1.3.2. Agent quelant bifuncional " <i>BiFunctional Chelating Agent (BFCA)</i> "	10
1.3.3. Reni "fred"	12
II. Complexos de Reni i Ciprofloxacina	
1. Introducció i objectius	17
1.1. Introducció	17
1.1.1. Radiofàrmacs de diagnosi d'infeccions	17
1.1.2. Radiofàrmac ^{99m} Tc-Ciprofloxacina (Infecton).....	18
1.1.2.1. Assaigs clínics.....	20
1.1.3. Capacitat coordinant de la Ciprofloxacina	21
1.2. Objectius	23
2. Resultats i discussió	24
2.1. Estudi de l'estructura del radiofàrmac ^{99m} Tc-Ciprofloxacina (Infecton)	24

2.2. Síntesi i caracterització del complex de reni homòleg al radiofàrmac	
Infecton	26
2.2.1. Síntesi directa.....	27
2.2.2. Síntesi del complex via precursors de Re (V)	27
2.2.2.1. Síntesi del complex Re (V) amb Ciprofloxacina via $[\text{ReO}_2(\text{py})_4]^+$ (Via A)	28
2.2.2.2. Síntesi del complex de Re (V) amb Ciprofloxacina via $[\text{ReOCl}_4]^-$ (Via B)	35
2.3. Síntesi i caracterització de dous nous complexos de reni tricarbonil amb Ciprofloxacina.....	37
2.3.1. Síntesi del complex <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cpf})(\text{H}_2\text{O})]$	38
2.3.2. Síntesi del complex <i>fac</i> - $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{DTC-Cpf})(\text{PPh}_3)$	41
2.3.2.1. Síntesi del ditiocarbamat de Ciprofloxacina (DTC-Cpf).....	41
2.4. Estudi de les propietats antibacterianes dels complexos de reni	43
2.4.1. Determinació dels diàmetres d'inhibició en el creixement bacterià.....	44
2.4.2. Estudi de la interacció dels complexos amb ADN-Girasa (Topoisomerasa II) 45	
3. Conclusions.....	49

III. Síntesi de Radiofàrmacs de 2a generació d'elevada activitat específica

1. Introducció i objectius	55
1.1. Introducció	55
1.1.1. Radiofàrmacs de segona generació	55
1.1.2. Disseny de la nova metodologia de preparació de radiofàrmacs	57
1.1.2.1. Reacció de transmetal·lació	58
1.1.2.2. Àcid Isonipecòtic	59
1.1.3. El fragment <i>fac</i> - $\{^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\}$	61
1.1.3.1. Lligands monodentats	62
1.1.3.2. Lligands bidentats	62
1.1.3.3. Lligands tridentats	63

1.2. Objectius	64
2. Resultats i discussió	65
2.1. Síntesi i caracterització dels complexos de zinc (II)	66
2.1.1. Síntesi i caracterització del complex de zinc (II) ditiocarbamat de l'àcid Isonipecòtic, 3	66
2.1.2. Síntesi i caracterització del complex de zinc (II) ditiocarbamat de l'àcid Isonipecòtic amb el fragment Succinimidil èster	70
2.1.3. Reacció d'acoblament peptídic a través del grup Succinimidil Èster	73
2.1.3.1. Síntesi i caracterització de complexos de zinc amb els fragments 1-(2-metoxifenil)piperazina i D-(+)-glucosamina via acoblament peptídic.....	75
2.2. Síntesi i caracterització dels complexos de reni carbonil via transmetal·lació de complexos de Zn	82
2.2.1. Síntesi i caracterització dels complexos de Re carbonil amb les amides model.....	82
2.2.2. Síntesi i caracterització del complex de reni carbonil amb el complex de zinc bioconjugat amb el fragment 1-(2-metoxifenil)piperazina, 11	86
2.2.3. Síntesi i caracterització del complex de reni carbonil amb la biomolècula D-(+)-glucosamina, 12	88
2.3. Síntesi i caracterització dels complexos de tecneci-99m via transmetal·lació de complexos de zinc	90
2.3.1. Síntesi i caracterització dels complexos de tecneci-99m carbonil bioconjugats amb les amines model.....	90
2.3.2. Estabilitat enfront la dilució del complex 13	94
2.3.3. Estabilitat del compost 13 en cisteïna	95
2.3.4. Unió a proteïna sèrica.....	96
3. Conclusions	98

IV. Estudi de la interacció de les Metal·lotioneïnes de mamífer amb els fragments *fac*-{M(CO)₃} (M=Re, Tc)

1. Introducció i objectius	103
1.1. Introducció	103
1.1.1. Metal·loproteïnes	103
1.1.2. Metal·lotioneïnes	104
1.1.2.1. Producció de les MTs.....	105
1.1.2.2. MTs de mamífer	106
1.1.2.3. Classificació	108
1.2. Objectius	109
2. Resultats i discussió	109
2.1. Estudi de la interacció de les metal·lotioneïnes de mamífer amb el fragment organometàl·lic <i>fac</i> -{Re(CO) ₃ }	110
2.1.1. Estudi preliminar per espectroscòpies de dicroisme circular i ultraviolat visible	110
2.1.2. Estudi per espectrometria de masses.....	112
2.2. Estudi de la interacció de les isoformes de MT de mamífer amb el fragment organometàl·lic de tecneci tricarbonil.....	116
3. Conclusions.....	120

V. Experimental Section

1. General procedures.....	125
1.1. Spectroscopy	125
1.2. Spectrometry.....	126
1.3. Elemental analysis	126
1.4. Chromatography	127
2. Rhenium and Ciprofloxacincomplexes.....	127
2.1. Synthesis and characterization of [ReO(Cpf) ₂]Cl, 1	127
2.2. Synthesis and characterization of <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (Cpf(H ₂ O))], 2	128

2.3. Synthesis and characterization of DTC-Cpf.....	129
2.4. Bacteriològica Studies	130
2.4.1. Antimicrobial susceptibility test	130
2.4.2. DNA Gyrase Cleavage Assay	130
3. Synthesis of high specific second generation radiopharmaceutical	131
3.1. Synthesis and characterization of complex 3	131
3.2. Synthesis and characterization of complex 4	132
3.3. Synthesis and characterization of complex 5	132
3.4. Synthesis and characterization of complex 6	133
3.5. Synthesis and characterization of complex 7	134
3.6. Synthesis and characterization of complex 8	134
3.7. Synthesis and characterization of complex 9	135
3.8. Synthesis and characterization of complex 10	136
3.9. Synthesis and characterization of complex 11	136
3.10. Synthesis and characterization of complex 12	137
3.11. Synthesis and characterization of complexes 13-14	138
4. Study of the interaction between Mammalian MT and <i>fac</i> -{M(CO) ₃ }	
(M=Re, Tc)	139
4.1. Synthesis of [Re(H ₂ O)(CO) ₃]ClO ₄	140
4.2. Rhenium and Technetium binding experiments.....	140
VI. Bibliografia	143
VII. Recull d'espectres i dades cristal·logràfiques	153

LLISTA D'ACRÒNIMS

ATR: *Attenuated total reflectance*

BFCA: Agent quelant bifuncional

BM: Biomolècula

Bpt: Bipiràmide trigonal

Cpf: Anió Ciprofloxacina

CpfH: Ciprofloxacina

DC: Dicroisme circular

DCC: *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DIPEA: Diisopropiletilamina

DMSO: Dimetilsulfòxid

DMF: Dimetilformamida

DOTATOC: àcid 1,4,7,10-Tetraazacyclododecà-1,4,7,10-tetraacetic-Octreotide

DTC: Ditiocarbamat

DTC-Cpf: Ditiocarbamat de Ciprofloxacina

EM: Espectrometria de masses

FDG: Fluorodesoxiglucosa

ICP-OES: Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

IR: Infraroig

HMPAO: Hexametilpropilenaminaoxima

HPLC-EM: Cromatografia líquida d'alta resolució amb espectròmetre de masses

HRMS: Espectre de masses en alta resolució

SPECT: *Single Photon Emission Tomography*

TC: *Tomography Computerized*

TFA: Àcid trifluoroacètic

Llista d'acrònims

MAG: Mercaptoacetilglicilglicilglicina

MTs: Metal·lotioneïnes

Pbq: piràmide de base quadrada

PET: *Positron Emission Tomography*

Py: Piridina

RHPLC: Cromatografia líquida d'alta pressió amb radiodetecció

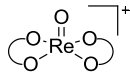
RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

SC: *Supercoiled*

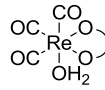
NHS: *N*-Hidroxisuccinimida

TSTU: *N,N,N,N*-Tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uronil tetrafluoroborat

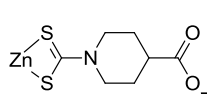
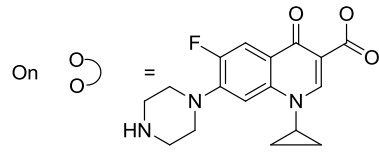
ÍNDIX DE FÓRMULES



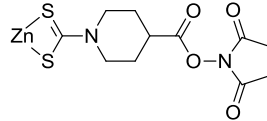
1



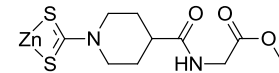
2



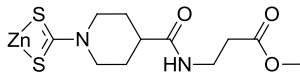
3



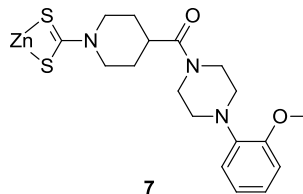
4



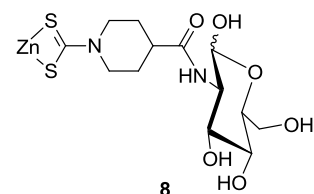
5



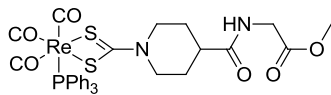
6



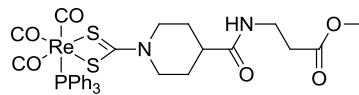
7



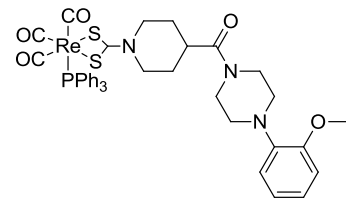
8



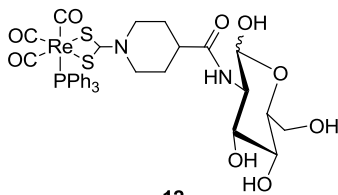
9



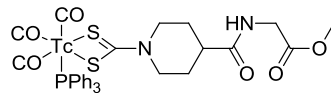
10



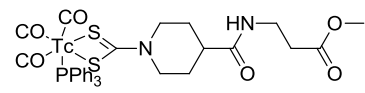
11



12



13



14

Capítol I

Introducció a la Radiofarmàcia



1. INTRODUCCIÓ

1.1. La Medicina Nuclear

*“Specialty which embraces all applications of radioactive materials in diagnosis or treatment or in medical research, with the exception of the use of sealed radiation sources in radiotherapy”.*¹

Nascuda a mitjans del segle XX, ha experimentat un gran creixement en els darrers 50 anys. Un dels primers isòtops utilitzats fou el iode-133,² el qual va ser aplicat eficientment l'any 1946 en el tractament del càncer de tiroide. Aquest fet es considera com el veritable inici de la medicina nuclear.³ Posteriorment, durant la dècada dels anys 50 es realitzaren experiments per assajar i mesurar les respostes fisiològiques a diferents agents radioactius i el 1957 es va construir la primera gamma-càmera,⁴ la qual permetia prendre imatges de la distribució del radioisòtop a l'interior del cos del pacient.

Anys més tard, la forta demanda de mètodes més acurats per a la diagnosi o el tractament de malalties va comportar la producció i l'ús de nous isòtops radioactius, entre els quals cal destacar el tecneci-99m, que avui dia és emprat en més del 80% dels diagnòstics realitzats en medicina nuclear d'imatge.⁵ Aquests tipus de diagnòstics, els

¹ World Health Organization. The medical uses of ionizing radiation and isotopes. Technical Report Series 492. Geneva: WHO, 1972.

² Querido, A.; Kassenaar, A. A. H.; Lameyer, L. D. F. *Acta Endocrinologica* **1953**, 12, 335.

³ Heeg, M.J.; Jurisson, S.S. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 1.

⁴ Reichert, D.E.; Anderson, D.E.; Welch, M.J. *Chemistry & Industry* **1998**, 730.

⁵ Jurisson, S.; Berning, D.; Jia, W.; Ma, D. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1137.

quals permeten la detecció d'alteracions cel·lulars fins i tot molt abans que la malaltia mostri els símptomes,⁶ comprenen patologies molt diverses com són: òssia, cardiològica, oncològica, endocrina, neurològica, entre d'altres. En els diagnòstics per medicina nuclear d'imatge, les imatges es poden obtenir tant per l'aplicació d'una radiació externa (raig X, Figura 1.B), com per l'administració al pacient d'un **radiofàrmac** (Figura 1.A) i mesurant la radiació emesa des de l'interior del cos del pacient.



Figura 1. Diagnòstic de **Feocromocitoma**⁷ (Tumor en la medulla suprarenal); (A) Imatge SPECT utilitzant el radiofàrmac experimental ^{99m}Tc-metaiodobencilguanidina (^{99m}Tc-MIBG); (B) Tomografia Computeritzada (TC); (C) Imatge fusionada SPECT/TC.

1.2. Els Radiofàrmacs

*“Radiopharmaceuticals are unique medicinal formulations containing radioisotopes which are used in major clinical areas for diagnosis and/or therapy”.*⁸

Els radiofàrmacs són introduïts al pacient per via oral o endovenosa, es distribueixen pel cos mitjançant el torrent sanguini i s'acumulen en l'òrgan o àrea d'interès (Figura 2).

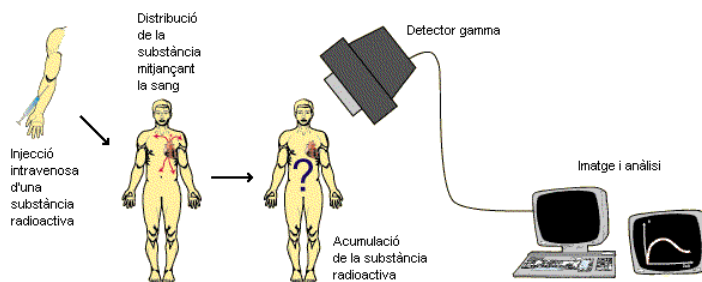


Figura 2. Procés esquemàtic de diagnòstic per a tècniques d'imatge en Medicina Nuclear.⁹

⁶ Mariani, G.; Bruselli, L.; Kuwert, T.; Kim, E. E.; Flotats, F.; Israel, O.; Dondi, M.; Watanabe, N. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2010**, 10, 1959.

⁷ Buck, A. K.; Nekolla, S.; Ziegler, S.; Beer, A.; Krause, B. J.; Herrmann, K.; Scheidhauer, K.; Wester, H.; Rummeny, E. J.; Schwaiger, M.; Drzezga, A. *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 1305.

⁸ World Health Organization. *The International Pharmacopoeia. November 2008, 4th edition.*

El tipus de radiació que emeten els radionúclids determina l'ús d'aquests com a radiofàrmacs de diagnosi o terapèutics (Figura 3). En els radiofàrmacs de diagnosi són emprats els radionúclids amb emissió gamma, ja que aquest tipus de radiació té un gran poder de penetració i és capaç de sortir del cos del pacient i ser detectada per una gamma-càmera. D'altra banda, els radionúclids amb emissió alfa o beta són els escollits per a la preparació de radiofàrmacs terapèutics. Com que la radiació alfa i/o beta tenen un poder de penetració molt més baix (alfa menor que beta) aquesta és capaç d'interaccionar només amb els teixits que es trobin propers al radionúclid.

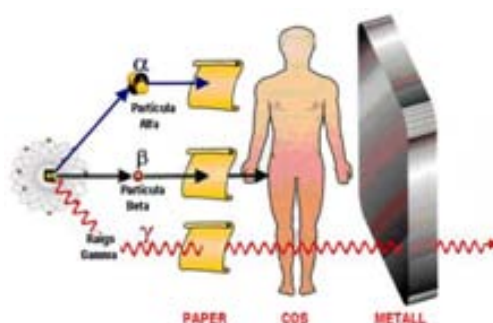


Figura 3. Poder de penetració en la matèria de les radiacions alfa, beta i gamma.¹⁰ La radiació alfa és la menys penetrant i no pot travessar un full de paper mentre que la radiació gamma, amb un gran poder de penetració, és capaç de traspasar metalls.

1.2.1. Radiofàrmacs de diagnosi

Els radiofàrmacs de diagnosi s'utilitzen en l'estudi del funcionament i morfologia de teixits i òrgans. La radiació que emet constantment el radionúclid és detectada mitjançant una gamma-càmera situada al voltant del pacient. Aquesta càmera amplifica i transfereix el senyal a un ordinador que el converteix en una representació *in vivo* de la distribució del radiocompost a l'interior del pacient. Aquesta constant monitorització permet localitzar anomalies morfològiques puntuals, estudiar l'evolució d'una malaltia o avaluar l'eficàcia d'una teràpia (Figura 4).

⁹ Paul Scherrer Institut <http://www.psi.ch> [consultada: Maig de 2012]

¹⁰ Rossin, R. Tesis Doctoral, 2003, Univesità di Padova.

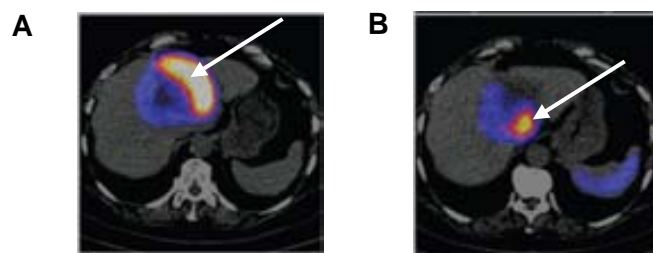
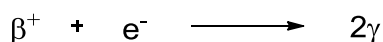


Figura 4. Imatge fusionada SPECT/TC amb el radiofàrmac ^{111}In -DOTATOC d'un pacient amb un tumor al sistema neuroendocrí (àrea colorejada) (A) abans i (B) després del tractament amb el radiofàrmac terapèutic ^{90}Y -DOTATOC.¹¹

Existeixen actualment dues tècniques d'emissió per al procés d'obtenció de les imatges: la tècnica SPECT (*Single-Photon Emission Computed Tomography*) i la PET (*Positron Emission Tomography*). En la tècnica SPECT la radiació emesa pel radionúclid és del tipus gamma (γ) mentre que en la tècnica PET el radionúclid emet positrons (β^+), els quals per la reacció anomenada d'anihilació (Esquema 1), acaben produint radiació gamma.



Esquema 1. Reacció d'anihilació d'un positró (β^+) amb la seva antipartícula (e^-).

Les tècniques SPECT i PET s'utilitzen avui dia en medicina de forma complementaria a les tècniques de transmissió (raig X, ultrasons, IRM...) però a diferència d'aquestes últimes, les tècniques d'emissió a més a més d'aportar informació morfològica de teixits i òrgans, també permeten estudiar funcions biològiques i del metabolisme. Això obre la porta a diagnosticar nombroses causes de dolor amb una alta precisió donant la possibilitat d'aplicar un tractament ràpid. Sovint arriben a eliminar la necessitat d'altres procediments de diagnòstic addicionals i més invasius.

Dos clars exemples de radionúclids molt emprats en diagnosi a dia d'avui són: (a) el radionúclid **fluor-18**¹² emissor de positrons i àmpliament utilitzat en forma de fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG). Aquest compost (Figura 5.A) consisteix en una molècula de glucosa, on el hidroxil del carboni 2 ha estat substituït per un àtom de fluor-18; i (b) el

¹¹ Chinnadurai, P.; Berg, S.; Nicolas, G.; Walter, M.; Rasch, H.; Mueller-Brand, J.; Kneifel, S. *The Open Nucl. Med. J.* **2010**, 2, 1.

¹² Lasne, M.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barre, L.; Roeda, D.; Dolle, F.; Crouzel, C. *Topics in Current Chemistry, 222 Contrast Agents II*, Krause, W., (Eds), Springer Verlag, **2002**, 201.

tecneci-99m¹³ que per les seves propietats és el radionúclid més emprat en la tècnica SPECT i dóna lloc a un gran ventall de radiofàrmacs (Figura 5.B).

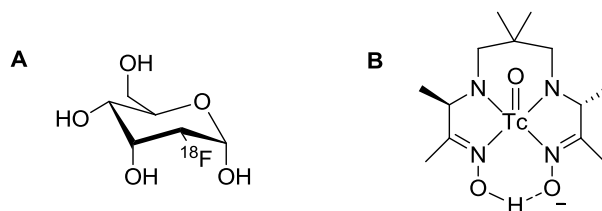


Figura 5. (A) Estructura del radiofàrmac fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-FDG) per a la detecció de tumors. (B) Estructura del radiofàrmac ^{99m}Tc-hexametilpropilenaminaoxima (^{99m}Tc-HMPAO, Ceretec®) per imatges de cervell.

1.2.2. Radiofàrmacs terapèutics

Tot i què els radiofàrmacs terapèutics tenen actualment poc pes dins la medicina nuclear, les expectatives de creixement són molt grans pel gran potencial d'aplicació en el tractament de neoplàsies. L'emissió de radiació poc penetrant (alfa o beta) d'alguns radionúclids provoca la formació d'espècies radicalàries que poden interaccionar amb el ADN de les cèl·lules properes i induir l'apoptosi per evitar la seva proliferació. Aquests procediments podrien substituir els actuals tipus de tractaments oncològics com la radioteràpia, on l'ús d'una alta dosi de radiació externa i no localitzada provoca un dany major en els teixits sans propers a la zona afectada (Figura 6).

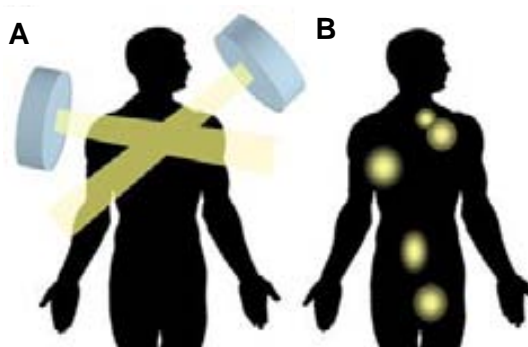


Figura 6. Representació esquemàtica dels tractaments oncològics amb (A) radioteràpia i (B) radiofàrmacs terapèutics.

¹³ Dilworth, J. R.; Parrott, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 43.

1.3. El Tecneci-99m

L'element Tecneci, del grec *technetos*, que significa artificial, va ser descobert l'any 1937 per Perrier i Segrè i va ser el primer element preparat artificialment. Com s'ha comentat anteriorment, el tecneci en els seus "escassos" 70 anys de vida s'ha convertit en el radionúclid més emprat en les tècniques de diagnosi nuclear per imatge. Aquest fet és conseqüència d'un conjunt de propietats d'aquest element que el fan idoni per a la radiofarmàcia. La radiació emesa és de tipus gamma amb una energia de 142 keV, molt propera al valor òptim per a la seva detecció en una gamma-càmera (uns 150 keV). D'altra banda, el seu període de semidesintegració és aproximadament 6 hores, temps suficientment llarg per a la preparació del radiofàrmac i l'obtenció de les imatges i alhora prou curt per evitar una llarga exposició dels pacients a la radiació.

Un factor clau en l'ús del tecneci-99m és la seva excel·lent disponibilitat. El $[^{99m}\text{TcO}_4^-]$, a partir del qual es sintetitzen tots els radiofàrmacs de tecneci, s'obté a partir del $[^{99}\text{MoO}_4^{2-}]$ amb un **generador $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$** . Aquest generador, desenvolupat als anys 60 en el *Brookhaven National Laboratory*, permet obtenir el tecneci-99m de manera fàcil i econòmica.

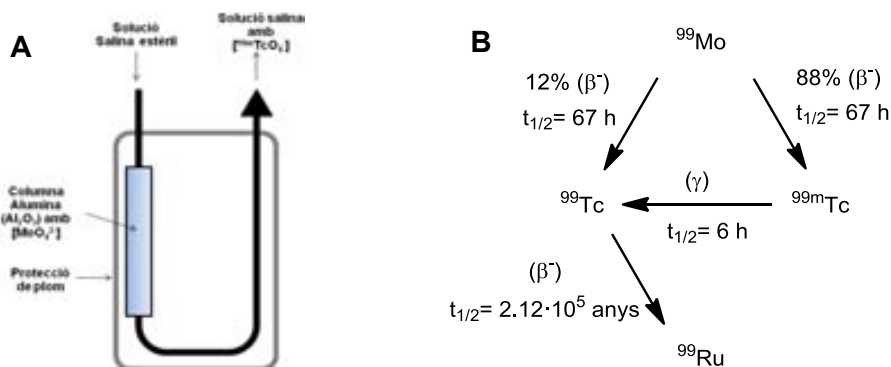


Figura 7. (A) Esquema d'un generador de tecneci. (B) Reaccions que tenen lloc en el generador de tecneci.

El generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Figura 7.A) consisteix en una columna d'intercanvi iònic d'alúmina en la qual està retintut l'anió molibdat ($[^{99}\text{MoO}_4^{2-}]$). El molibdè-99, emissor de partícules beta (β^-) amb un període de semidesintegració de 67 hores, decau constantment a tecneci (Figura 7.B) i condueix a la formació de l'espècia $[\text{TcO}_4^-]$. La disminució de la càrrega del oxoanió redueix l'afinitat del anió pertecnecat amb la columna d'alúmina fent possible la seva elució mitjançant una solució salina estèril (0.9% NaCl). Després de l'elució del $[^{99m}\text{TcO}_4^-]$ aquest ja es troba en solució salina i estèril, a

punt per ser injectat en pacients.¹⁴ La simplicitat del disseny i del funcionament ha fet possible que avui dia la gran majoria dels grans hospitals disposin de generadors de tecneci-99m.

1.3.1. Preparació i classificació dels radiofàrmacs de tecneci

El tecneci, situat en mig del bloc d de la taula periòdica, presenta una gran varietat d'estats d'oxidació (des de Tc^{-1} a Tc^{VII}), diferents geometries i una elevada capacitat d'enllaç amb diferents tipus de lligands (durs i tous).¹⁵ Aquest fet va permetre, com en els fàrmacs tradicionals, modular les característiques dels compostos de tecneci dotant-los de diferents propietats físiques (mida, lipofilicitat, càrrega,...) segons l'estat d'oxidació i els lligands que els envolten, variant d'aquesta manera la seva farmacocinètica (absorció, distribució, metabolisme i excreció). Aquests primers tipus de radiofàrmacs, els quals han estat la base dels radiofàrmacs de tecneci durant els darrers 30 anys, s'anomenen **radiofàrmacs essencials**¹³ i són emprats per obtenir imatges d'òrgans tals com el cor, el fetge, els ronyons, el cervell, etc.

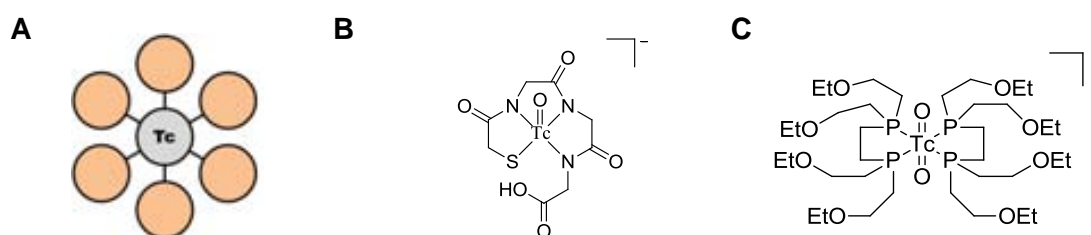


Figura 8. (A) Representació esquemàtica d'un radiofàrmac de tecneci essencial. L'estructura consisteix en una molècula petita constituïda per un àtom de tecneci envoltat d'un o més lligands. (B) Radiofàrmac ^{99m}Tc -(MAG)₃ per imatges de ronyó.¹⁶ (C) Radiofàrmac ^{99m}Tc -tetrafosmin (Myoview) per imatges de cor.¹⁷

No obstant, la gran demanda d'agents més específics ha fet que els darrers anys la recerca en aquest àmbit estigui dirigida essencialment al desenvolupament d'un nou tipus de radiofàrmac de tecneci, els **radiofàrmacs de segona generació** o diana-específics.

¹⁴ Undaraiya, S.; Dizdarevic, S.; Miles, K.; Quin J.; Williams, A.; Wheatley, T.; Zammit, C. *Endocr. Pract.* **2009**, 15, 458.

¹⁵ Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.

¹⁶ Nosco, D. L.; Beatty-Nosco, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 91.

¹⁷ Duatti, A.; Liu, S.; Pasqualini, R. *Current Radiopharmaceuticals* **2009**, 2, 268.

Aquests nous tipus de compostos contenen en la seva estructura una biomolècula unida apropiadament al radionúclid de tecneci. Aquesta biomolècula interacciona únicament amb cèl·lules que presentin el seu receptor diana^{18,19} fet que comporta l'acumulació del radiofàrmac només en els òrgans o teixits que el continguin.

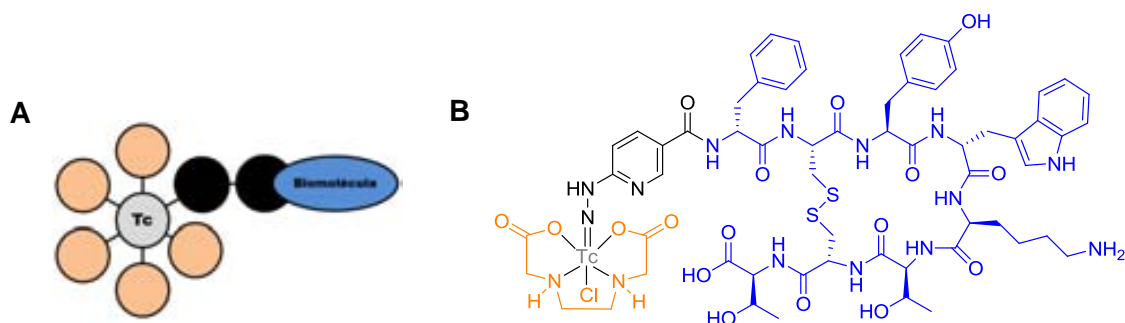


Figura 9. (A) Representació esquemàtica d'un radiofàrmac de tecneci de segona generació. (B) Radiofàrmac en fase experimental ^{99m}Tc/HYCNIC/EDDA/Octreotide²⁰ per detecció de tumors del sistema endocrí o neurològic.

El principal objectiu en la síntesi d'aquest nous radiofàrmacs, és la unió del radionúclid de tecneci a la biomolècula sense que aquesta perdi la capacitat d'unió amb el seu receptor. És per això que, quan s'ha de dissenyar un nou radiofàrmac de segona generació, cal tenir en compte no només variables com la mida, la càrrega o la lipofilitat del complex sinó, molt especialment, la posició del radionúclid en l'estructura i la distància d'aquest als punts d'unió de la biomolècula amb el receptor diana. Gran part de la investigació que es porta a terme avui dia està enfocada en la cerca de noves molècules que permetin la unió selectiva d'una biomolècula amb el radionúclid. Aquests fragments s'anomenen agents quelants bifuncionals "*BiFunctional Chelating Agent*" (BFCA).

1.3.2. Agent quelant bifuncional "*BiFunctional Chelating Agent*" (BFCA)²¹

Els BFCA són molècules relativament petites que contenen en la seva estructura dues parts ben diferenciades: (a) un fragment quelant capaç de coordinar el ió metàl·lic; i

¹⁸ Britton, K. E. *Eur. J. Nucl. Med.* **1990**, 16, 373.

¹⁹ Hessewood S.; Leung E. *Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, 21, 348.

²⁰ Van de Wiele, C.; Signore, A.; Dierckx, R. *Am. J. Resp. Med.* **2002**, 1, 177.

²¹ Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. B.; Tei, L. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3019.

(b) un grup funcional reactiu a través del qual es poden unir diferents biomolècules. En el disseny del BFCA cal tenir present no només l'estat d'oxidació del metall, sinó també el tipus de coordinació amb el centre metàl·lic i la càrrega final del complex. A més a més, la unió del metall amb el fragment quelant ha de ser forta per tal d'evitar l'alliberament *in vivo* del radionúclid, ja sigui per l'atac d'un altre lligand o per la re-oxidació del metall.

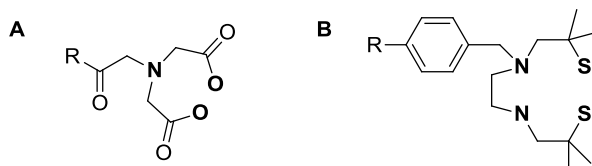
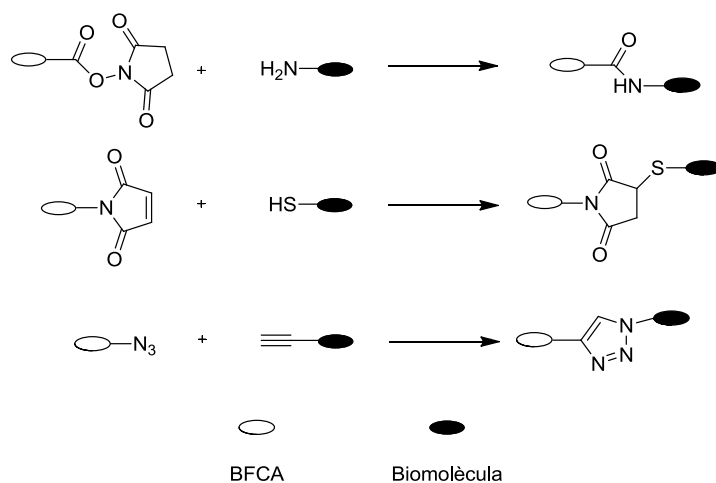


Figura 10. Exemples de BFCAs emprats en radiofarmàcia. En negraita estan marcats els àtoms implicats en la coordinació del metall (A) Tridentat (B) Tetridentat. El grup R representa el lloc de unió amb la biomolècula.

D'altra banda, la conjugació del BFCA amb la biomolècula d'interès és porta a terme a través d'un grup altament reactiu. Aquesta reacció ha de ser el més selectiva possible (regioselectiva i quimioselectiva), evitant el màxim les reaccions secundàries que conduirien a la formació d'altres espècies no desitjades i l'alteració de l'estructura de la biomolècula.



Esquema 2. Exemples de reaccions de conjugació.

1.3.3. Reni “fred”

Les baixes concentracions, a causa de la radioactivitat del tecneci-99m emprades a l'hora de sintetitzar els radiofàrmacs (10^{-7} - 10^{-8} M), impedeixen l'ús de les tècniques de caracterització més comunes (RMN, raigs X, etc.) per estudiar aquests compostos. Per aquest motiu, s'han hagut de buscar alternatives per tal de poder caracteritzar els compostos obtinguts. Una d'elles consisteix en la substitució del isòtop de ^{99m}Tc per ^{99}Tc . Aquest és un radionúclid β emissor amb un llarg període de semidesintegració ($2.12 \cdot 10^5$ anys). Amb aquest isòtop es pot treballar a l'escala de mil·ligrams i això permet l'ús de les tècniques de caracterització abans esmentades. No obstant, el problema més important d'aquesta via és l'elevat període de semidesintegració del radionúclid de tecneci-99, el qual obliga a treballar amb grans mesures de seguretat. En cas de contaminació les conseqüències per la persona podrien ser molt greus ja que aquesta podria ser irradiada de per vida, si no existís un mecanisme d'eliminació del radionúclid. No obstant, gràcies a la millora de la sensibilitat de l'espectrometria de masses (EM), una alternativa recent és l'anàlisi de preparats radiofarmacèutics enriquits amb ^{99}Tc (augmentant la concentració fins aproximadament 10^{-6} M). A aquests valors de concentració, el nivell de radioactivitat d'aquest isòtop és significativament inferior als nivells ambientals de fons (100-1000 vegades).²² L'inconvenient d'aquesta última metodologia és que només dona informació del pes molecular de radiocompost i no permet una determinació estructural completa del radiofàrmac.

Una altra alternativa emprada, és la substitució del element de tecneci per reni. Aquesta metodologia s'anomena “química freda del reni”, ja que es tracte d'un element no radioactiu, és a dir “fred”. Aquest element es troba situat just a sota del tecneci en la taula periòdica i els seus radis atòmics són molt semblants ($\text{Tc} = 136$ pm, $\text{Re} = 137$ pm) a causa de la contracció lantànida. Així doncs, seguint aquesta metodologia és possible sintetitzar i caracteritzar els complexos de reni homòlegs als de tecneci i després mitjançant cromatografia líquida amb detecció radiomètrica comparar-ne els temps de retenció. Si es tracta de compostos isoestructurals els seus temps de retenció seran molt propers.

No obstant, les propietats químiques¹⁵ dels compostos de tecneci i reni presenten algunes diferències significatives que cal tenir presents. Les dues més rellevants són la major estabilitat dels estats d'oxidació alts del reni i la major inèrcia d'aquest element

²² Tisato, F.; Bolzati, C.; Porchia, M.; Refosco, F. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, 23, 309.

enfrent a les reaccions de substitució. És per aquest motiu, que sovint alguns del complexos de reni es preparen per rutes sintètiques diferents als de tecneci.

(A) *Estabilitat dels estats oxidació.*²³ Els compostos de reni amb estat d'oxidació VII són molt més estables. Aquesta és una de les principals característiques dels elements de la tercera sèrie de transició respecte de la segona, per tant, els complexos de reni en alguna de les seves formes reduïdes tenen més tendència a oxidar-se. Seguint aquest raonament, és possible afirmar que la reducció del ReO_4^- a qualsevol dels estats d'oxidació inferiors a VII, serà més difícil amb aquest element que amb el tecneci.

(B) *Reaccions de substitució de lligands en complexos de tecneci i reni.*²⁴ Els complexos de reni són cinèticament molt més inerts en front a reaccions de substitució que els seus anàlegs de tecneci. Aquesta també és una propietat que distingeix els elements de la segona sèrie de transició respecte de la tercera. Com també succeeix amb els complexos de pal·ladi i platí, els compostos de tecneci reaccionen amb velocitats de fins a tres o quatre ordres de magnitud més ràpides que els compostos homòlegs de reni.

²³ Alberto, R., Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, 1996, 275.

²⁴ Omori, T., Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, 1996, 275.

Capítol II

Complexos de reni i Ciprofloxacina



1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1. Introducció

1.1.1. Radiofàrmacs de diagnosi d'infeccions

Com ja s'ha comentat anteriorment, les tècniques d'imatge són àmpliament utilitzades per a la diagnosi de nombroses malalties. Un grup de radiofàrmacs que són especialment interessants són els destinats a la diagnosi d'infeccions. Entre ells destaquen a dia d'avui els radiocompostos de Gal·li-67²⁵ o el marcatge de leucòcits²⁶ amb el compost ^{99m}Tc-HMPAO (Figura 11). Com ja s'ha esmentat, el principal avantatge de les tècniques nuclears d'imatge en front d'altres tècniques més tradicionals és que no requereixen cirurgia atès que es tracten de tècniques no invasives.



Figura 11. Gammagrafia amb leucòcits marcats amb el compost ^{99m}Tc-HMPAO en un pacient amb infecció de pròtesis al genoll esquerra.

²⁵ Palestro, C. J.; Love, C.; Millier, T. *Cellular Microbiology* **2007**, 9, 2323.

²⁶ Palestro, C. J.; Love, C. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2007**, 50, 15.

Els radiofàrmacs de diagnosi d'infeccions tenen la finalitat d'acumular-se en zones que presentin una infecció. Un dels radiofàrmacs més emprats consisteix en leucòcits marcats amb tecneci. Els leucòcits són els encarregats de la resposta immunitària del cos i una de les seves finalitats és combatre contra els agents infecciosos. El procediment de marcatge consisteix en extreure sang als pacients, aïllar els leucòcits i marcar-los amb el compost $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$, un complex apolar amb capacitat per travessar la membrana cel·lular dels glòbuls blancs. Posteriorment, els leucòcits marcats són administrats de nou, si el pacient presenta una infecció aquests s'acumularan en el teixit infectat i, per tant, mitjançant la radiació que emet el tecneci serà possible la localització de la infecció. Malgrat els bons resultats obtinguts amb aquesta metodologia, aquest radiofàrmac presenta dos inconvenients que cal tenir present: (a) es tracte d'un radiofàrmac exclusiu per a cada pacient, ja que els leucòcits han de ser els propis del malalt per evitar una resposta autoimmune; i (b) la manipulació de sang en la preparació del radiofàrmac suposa un elevat risc de contagi per part del propi pacient o del personal mèdic (contaminació bacteriològica, vírica, etc.).

Per aquests motius, la cerca de nous radiofàrmacs de diagnosi d'infeccions no específics per cada pacient ha estat un tema d'interès en els darrers anys. En aquest sentit, per tal d'obtenir nous radiocompostos per la diagnòstics d'infeccions per imatge s'han dut a terme estudis de marcatge amb ^{99m}Tc de diferents tipus de biomolècules, com són els pèptids quimiotàctics (*Ubiquidin*)²⁷ o antibiòtics (fluoroquinolones).

1.1.2. Radiofàrmac ^{99m}Tc -Ciprofloxacina (Infecton)²⁸

Des de fa uns anys un nou radiofàrmac, ^{99m}Tc -Ciprofloxacina, ha estat desenvolupat per a la diagnosi d'infeccions. Aquests nou radiofàrmac combina els avantatges del marcatge amb ^{99m}Tc amb l'ampli espectre d'acció de l'antibiòtic Ciprofloxacina. Es tracte d'un radiofàrmac de segona generació que no conté cap BFCA per unir el radionúclid a la biomolècula sinó que el tecneci es troba enllaçat directament a l'antibiòtic.

La Ciprofloxacina^{29,30} (Figura 12) és un antibiòtic d'ampli espectre del grup de les fluoroquinolones actiu contra les bacteries Grampositives i Gramnegatives. El seu

²⁷ Welling M. M.; Paulusma-Annema, A.; Balter, H. S.; Pauwels, E. K. J.; Nibbering, P. H. *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, 27, 292.

²⁸ Yapar, Z.; Kibar, M.; Yapar, F.; Togrul, E.; Kayaselçuk, U.; Sarpel, Y. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28, 822.

mecanisme d'acció consisteix en la inhibició de l'ADN-Girasa del bacteri (topoisomerasa de tipus II), la qual actua reduint la tensió molecular causada pel superenrotllament del ADN. L'antibiòtic a l'impedir la relaxació de la doble cadena d'ADN, atura la replicació i conseqüentment provoca la mort del bacteri. Del mecanisme d'actuació de l'antibiòtic se'n parlarà amb més detall en l'apartat 2.4.2. d'aquest capítol. El radiofàrmac ^{99m}Tc -Ciprofloxacina està pensat com un agent específic per a la detecció d'infeccions ja que l'antibiòtic actuarà com a vector i s'acumularà dins dels bacteris.

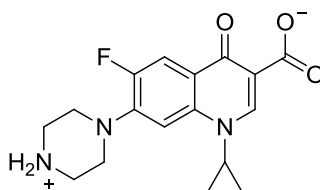


Figura 12. Estructura química de la Ciprofloxacina.

Estudis preliminars van mostrar una gran especificitat d'aquest radiofàrmac per localitzar infeccions bacterianes^{31,32} i certs avantatges en la diagnosi d'infeccions³³ respecte dels mètodes convencionals (leucòcits marcats,³⁴ ^{67}Ga). A més a més, com ja s'ha comentat anteriorment, des del punt de vista de la pràctica clínica, l'ús d'aquest radiofàrmac marcat seria molt més segur pel pacient i pel propi personal sanitari. En comparació amb el mètode emprat actualment de marcatge de leucòcits (Figura 13), el nou radiofàrmac preparat en un vial per simple reducció de l'anió TcO_4^- amb clorur d'estany i Ciprofloxacina, evitaria els riscos associats a la manipulació de sang (contaminació bacteriològica, vírica, etc.), D'altra banda, requeriria de temps de preparació més curts i permetria que un sol preparat del radiofàrmac es pogués fer servir per a varis pacients.

²⁹ Bolon, M. K. *Medical Clinics of North America* **2011**, 95, 793.

³⁰ Pranger, A. D.; Alffenaar, J. W. C.; Aarnoutse, R. E. *Current Pharmaceutical Design* **2011**, 17, 2900.

³¹ Britton K. E.; Vinjamuri S, Hall A. V.; Solanki K.; Bomanji J.; Das S. *Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, 24, 553.

³² Hall A. V.; Solanki K. K.; Vinjamuri S.; Britton K. E.; Das S. S. *J. Clin. Pathol.* **1998**, 51, 215.

³³ Schauwecker, D. S.; Park, H.M.; Mock, B. H.; Burt, R. W.; Kernick, C. B.; Ruoff, A. C.; Sinn, H.J.; Wellman, N. *J. Nucl. Med.* **1984**, 25, 849.

³⁴ Vinjamuri, S.; Hall A. V.; Solanki, K. K.; Bomanji, J.; Siraj, O.; O'Shaughnessy, E.; Das, S. S.; Britton, K. E. *Lancet* **1996**, 347, 233.

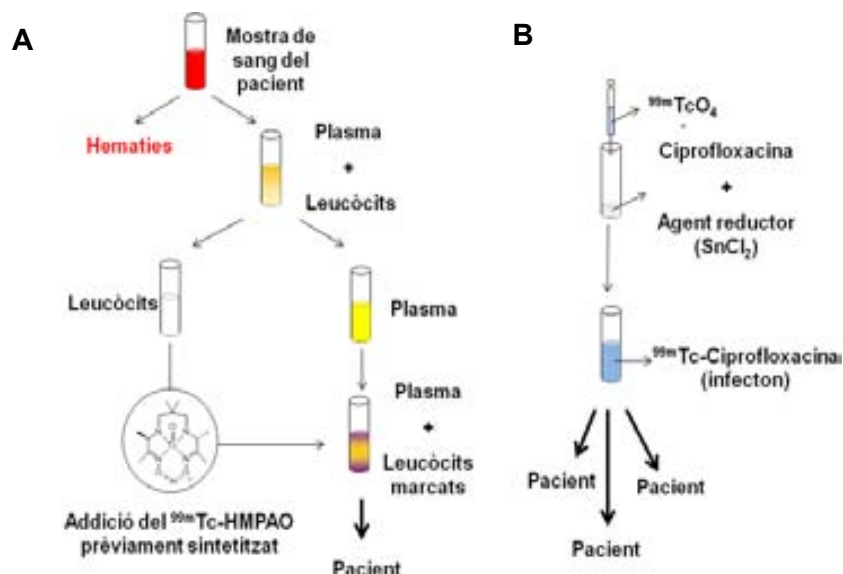


Figura 13. Esquema comparatiu entre (A) preparació de leucòcits marcats amb tecneci-99m.²⁶ (B) preparació del radiofàrmac ^{99m}Tc-Infector.³⁵

1.1.2.1. Assaigs clínic

En la bibliografia hi ha recollits una sèrie d'assaigs clínics amb el nou radiofàrmac i la seva comparació amb altres compostos emprats a dia d'avui en diagnosi d'infeccions. Les expectatives del nou radiocompost són força altes, tot i que encara no es tenen proves suficients per afirmar que el nou radiofàrmac sigui capaç de diferenciar entre un procés inflamatori o una infecció.³⁶ Aquest últim punt és clau ja que ha estat motiu de polèmica per part dels diferents grups de recerca que hi treballen. Tot i això, els diferents assaigs clínics publicats en nombroses revistes, i les fortes expectatives posades en el nou radiocompost, van fer que l'any 2005 la "Agencia Española del Medicamento" concedís per primer cop l'autorització per realitzar un assaig clínic³⁷ amb un radiofàrmac experimental. Aquest assaig es va portar a terme mitjançant una col·laboració entre la unitat de Radiofarmàcia i el departament de Malalties infeccioses de l'Hospital Clínic, i el departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona UAB. L'assaig portat

³⁵ Sonmezoglu, K.; Sonmezoglu, M.; Halac, M.; Akgün, I.; Türkmen, C.; Önsel, C.; Kanmaz, B.; Solanki, K.; Britton, K. E.; Uslu, I. *J. Nucl. Med.* **2001**, 42, 567.

³⁶ Sarda, L.; Cremieux, A.-C.; Lebellec, Y.; Meulemans, A.; Lebtahi, R.; Hayem, G.; Genin, R.; Delahaye, N.; Hutten, D.; Le Guludec, D. *J. Nucl. Med.* **2003**, 44, 920.

³⁷ Fuster, D.; Soriano, A.; Garcia, S.; Piera, C.; Suades, J.; Rodríguez, D.; Martínez, J. C.; Mensa, J.; Campos, F.; Pons, F. *Nucl. Med. Comm.* **2010**, 32, 44.

a terme a l'Hospital Clínic, tot i que no va servir per determinar clarament que el nou radiocompost podia diferenciar una inflamació d'una infecció, va evidenciar novament les possibilitats del nou radiocompost (Figura 14).

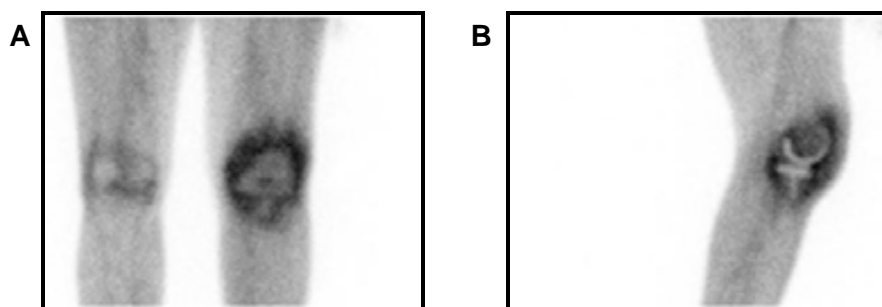


Figura 14. Gammagrafies (A) frontal i (B) lateral d'un pacient amb infecció al genoll després de subministra-li el radiofàrmac ^{99m}Tc -Ciprofloxacina.

Arribats aquest punt, cal destacar que tot i que hi ha un gran nombre d'estudis mèdics a la bibliografia amb el ^{99m}Tc -Ciprofloxacina, no es té cap informació de l'estructura del complex de tecneci amb l'antibiòtic. Aquest fet fa difícil entendre el mecanisme d'acció del radiocompost i determinar per què, en alguns casos, no distingeix una simple inflamació d'un procés infectiu (Fals positiu).

1.1.3. Capacitat coordinant de la Ciprofloxacina

Com s'ha mostrat anteriorment (Figura 13), en la preparació del radiofàrmac s'utilitza SnCl_2 com agent reductor del TcO_4^- per donar lloc a un complex de tecneci amb un estat d'oxidació més baix. Un cop el radionúclid de tecneci (VII) ha estat reduït, la Ciprofloxacina es coordina formant un complex metàl·lic. Cal dir, que aquesta metodologia és la més comuna en la síntesi de radiofàrmacs de tecneci tant de primera com de segona generació ja que amb aquest procediment s'aconsegueix marcar amb molta eficàcia un gran nombre de molècules. No obstant, l'ús d'aquesta metodologia no va associat al coneixement de les característiques del compost com són: (a) estat d'oxidació del tecneci; i (b) lloc d'unió entre el radionúclid i la biomolècula. Aquest últim punt, en el cas concret de la Ciprofloxacina, és fa particularment difícil degut a l'elevat nombre d'àtoms coordinats que posseeix. En la bibliografia es troben nombrosos casos

de quinolones³⁸ i fluoroquinolones,^{39,40} entre les quals trobem la Ciprofloxacina, formant complexos metàl·lics diferents amb varis elements de la taula periòdica, com per exemple Cu,⁴¹ Ni,⁴² etc. La gran varietat de compostos metàl·lics descrits en la bibliografia demostra la seva gran capacitat coordinant. A continuació s'enumeren els tipus de coordinació més comuns per aquesta família de compostos:

(A) Formació de complexos O,O-donadors: Les quinolones contenen en la seva estructura un grup carboxílic i un grup cetona en les posicions 3 i 4 respectivament de l'anell de quinolona, això els permet enllaçar un metall⁴³ i formar anells de sis baules (Figura 15.A). Aquest tipus de coordinació sol ser la més habitual. No obstant això, el grup carboxilat⁴⁴ també és capaç de complexar metalls i formar compostos estables (Figura 15.B).

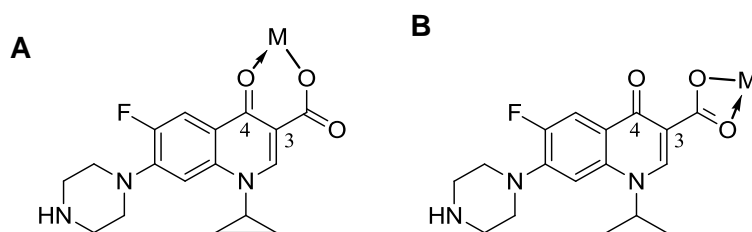


Figura 15. Representació esquemàtica del tipus de coordinació O-donador de la molècula de Ciprofloxacina.

(B) Formació de complexos N-donadors i N,N-donadors:⁴⁵ Algunes quinolones, entre elles la Ciprofloxacina, tenen en la posició 7 de l'anell de quinolona un grup funcional que conté heteroàtoms amb capacitat coordinant (anell de piperazina). El grup amina és capaç de formar enllaços simples amb alguns metalls de la taula periòdica (Figura 16.A) i, fins i tot, hi ha exemples on els dos grups amina participen en la complexació del metall (Figura 16.B).⁴⁶

³⁸ Edelson, J.; Davison, C.; Benziger, D. P. *Drug Metabolism Review* **1977**, 6, 105.

³⁹ Drlica, K. *Annals of Medicine (Helsinki)* **2000**, 32, 585.

⁴⁰ Owens, R. C. Jr.; Ambrose, P. G. *Medical Clinics of North America* **2000**, 84, 1447.

⁴¹ Drevensek, P.; Zupancic, T.; Pihlar, B.; Jerala, R.; Kolitsch, U.; Plaper, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 432.

⁴² Yu, L.-C.; Chen, Z.-F.; Liang, H.; Zhou, C.-S.; Fun, H.-K. *J. Coord. Chem.* **2006**, 15, 953.

⁴³ Turel, I.; Bukovec, N. *Polyhedron* **1996**, 15, 269.

⁴⁴ Dong-Rong Xiao.; En-Bo Wang.; Hai-Yan An, *Cristal Growth and Design* **2007**, 7, 506.

⁴⁵ Baenziger, N. C. *Act. Cryst.* **1986**, 42, 1505.

⁴⁶ Mendoza, L. M.; De Almelda, M. V.; De Abreu, H. A.; Duarte, H. A.; Grazul, R. M.; Soares, A. P. *Inorg. Chim. Act.* **2009**, 362, 2060.

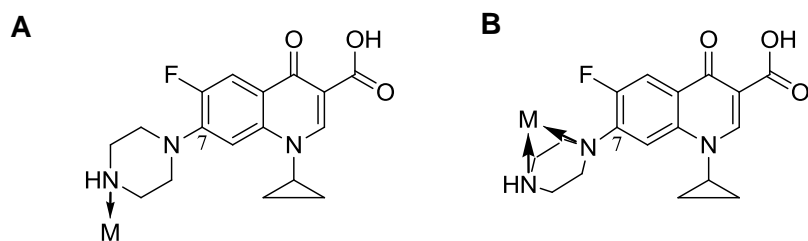


Figura 16. Representació esquemàtica del tipus de coordinació N-donador de la molècula de Ciprofloxacina.

(C) Formació de complexos O,O,N-donadors:⁴⁷ Per últim, en la bibliografia també es troba algun cas on dues molècules de Ciprofloxacina coordinin un mateix metall a través de dos grups funcionals diferents (Figura 17), donant lloc a complexos amb coordinació de tipus mixta.

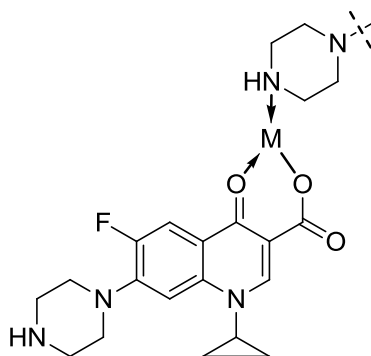


Figura 17. Representació esquemàtica del tipus de coordinació O,N-donador de dues molècules de Ciprofloxacina en un mateix centre metàl·lic.

1.2. Objectius

Els principals objectius plantejats en aquest capítol són:

(A) Determinar l'estructura del radiofàrmac Infecton

Per assolir aquest objectiu es prepararà el radiofàrmac de tecneci amb Ciprofloxacina emprant les mateixes condicions de síntesi (agent reductor, lligand d'intercanvi, etc.) i es determinarà per EM tant l'estat d'oxidació del radionúclid com la relació estequiomètrica entre el tecneci i l'antibiòtic. Seguidament, tenint en compte els

⁴⁷ Yu, L.; Lai, L.; Liu, S.; Xia, Y. *J. Coord. Chem.* **2009**, 62, 2261.

resultats obtinguts, s'intentarà aconseguir la síntesi d'un complex de reni homòleg al de tecneci i es determinarà el tipus de coordinació del metall amb l'antibiòtic.

(B) Sintetitzar i caracteritzar dos nous complexos de reni amb Ciprofloxacina

Amb finalitats comparatives es proposarà la síntesi de dos nous complexos de reni amb característiques diferenciades del sintetitzat anteriorment. Aquests dos compostos seran carbonils de reni, ja que és una família de compostos molt estudiats actualment en química radiofarmacèutica (aquests aspectes seran comentats àmpliament en el capítol III) i ens poden facilitar l'anclatge del metall en dues posicions diferents de la molècula de Ciprofloxacina.

(C) Estudi de les propietats antibacterianes dels complexos sintetitzats

Un cop caracteritzats tots els compostos de reni, s'estudiarà les propietats antibacterianes dels complexos i es provarà de determinarà la relació existent entre l'eficàcia de l'antibiòtic i el tipus de fragment metàl·lic o posició del metall en l'estructura. Per a duu a terme aquest propòsit, es realitzaran dos estudis comparatius entre els diferents complexos i la Ciprofloxacina lliure. Aquest estudis consistiran en (a) exposar una seria de microorganismes a cada producte i avaluar-ne la capacitat antibacteriana; i (b) estudiar el mecanisme d'actuació de cadascun del complexos metàl·lics enfront l'ADN-Girasa de bacteri.

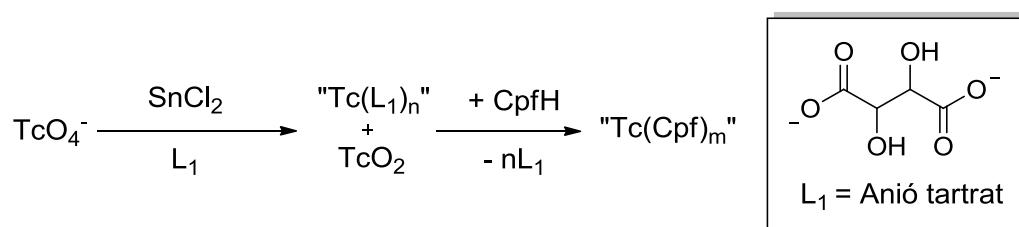
2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.1. Estudi de l'estructura del radiofàrmac ^{99m}Tc -Ciprofloxacina (Infecton)

En la cerca de l'estructura del radiofàrmac, el primer dels experiments va consistir en l'anàlisi mitjançant EM d'una solució que contenia el radiofàrmac preparat amb el isòtop tecneci-99. Això ens permet conèixer el pes molecular del radiofàrmac i així poder deduir tant l'estequiometria com l'estat d'oxidació del nucli metàl·lic. Com ja s'ha comentat amb anterioritat, l'ús de mostres enriquides amb el isòtop beta emissor ^{99}Tc

permet treballar a uns nivells de concentració prou elevats per poder emprar la tècnica de espectrometria de masses.

Les condicions de síntesi (Esquema 3) utilitzades per l'obtenció del radiocomplex foren les mateixes que es varen emprar en l'assaig clínic, portat a terme a l'Hospital Clínic, amb aquest radiofàrmac.⁴⁸ Aquestes condicions inclouen l'anió tartrat (L_1) utilitzat com a lligand d'intercanvi, el qual minimitza la quantitat d'òxid de tecneci col·loïdal (TcO_2) que es sol generar durant la reducció del tecneci (VII). Aquesta metodologia⁴⁹ és força emprada en la preparació de radiofàrmacs de tecneci ja que quan el tecneci (VII) és reduït en aigua, si no és ràpidament complexat per un lligand, com que l'espècie reduïda no és estable, acaba donant òxid de tecneci col·loïdal el qual roman en solució.



Esquema 3. Representació esquemàtica de la síntesi del radiofàrmac ^{99m}Tc -Ciprofloxacina.

Un cop sintetitzat el radiocompost la solució resultant es va analitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció per espectrometria de masses (HPLC-EM). Ajustades les condicions de cromatografia i d'ionització de la mostra es va poder observar majoritàriament el pic 775 m/z (Figura 18), el qual correspon a un oxocomplex de tecneci (V) amb dues molècules de Ciprofloxacina coordinades en forma aniònica generant una espècie amb estequiometria $[^{99}TcO(Cpf)_2]^+$.

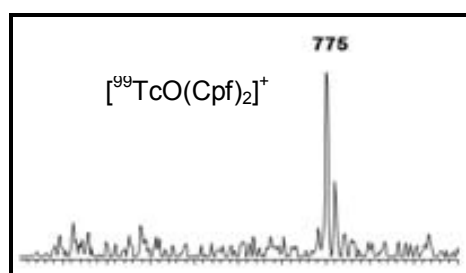
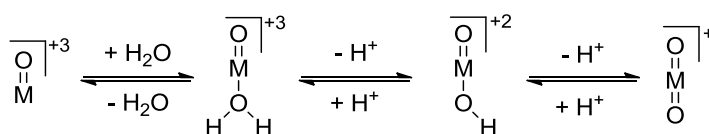


Figura 18. Espectre de masses de la solució del radiofàrmac Infecton.

⁴⁸ Rodríguez-Puig, D.; Piera, C.; Fuster, D.; Soriano, A.; Sierra, J.; Rubi, S.; Suades, J. *J. Label Compd Radiopharm.* **2006**, 49, 1171.

⁴⁹ Imre, J. *J. Radioanalytical and Nucl. Chem.* **1984**, 87, 291.

Els fragments $\{\text{TcO}^{3+}\}$ o $\{\text{TcO}_2^+\}$ són els més habituals en els radiofàrmacs de tecneci-99m emprats avui dia en Medicina Nuclear. La raó de la formació d'aquestes oxoespècies és la necessitat de neutralització de l'elevada càrrega formal del tecneci (V) generat mitjançant la reducció amb SnCl_2 . Les dues oxoespècies es poden intercanviar mitjançant la protonació o desprotonació d'un dels àtoms d'oxigen units al metall (Esquema 4). La formació d'una o l'altra oxoespècie ve determinada per la càrrega dels altres lligands coordinats. Quan els lligands són neutres el fragment metàl·lic conté habitualment dos grups oxo $\{\text{TcO}_2^+\}$, per contra, quan els lligands són aniónics no cal la presència d'un segon lligand O^{2-} i per tant el fragment més comú és el $\{\text{TcO}^{3+}\}$.⁵⁰



Esquema 4. Equilibris àcid-base entre les formes oxo i bisoxo.

És important comentar que el lligand oxo (O^{2-}) té un fort caràcter trans labilitzador, fet que ocasiona la formació d'espècies pentacoordiades⁵¹ i repercuteix en la reactivitat del complex. Així doncs, tenint en compte l'estequiometria del complex trobat per HPLC-EM, i basant-nos en els precedents bibliogràfics, podem proposar que el radiofàrmac es tracti d'un oxocomplex de tecneci amb dues Ciprofloxacines coordinades i molt probablement amb estequiometria de piràmide de base quadrada. Aquest tipus de geometria sol ser molt comuna en els oxocomplexos de tecneci (V).⁵²

2.2. Síntesi i caracterització del complex de reni homòleg al radiofàrmac Infecton

Un cop conegut l'estat d'oxidació i el nombre de Ciprofloxacines unides al radionúclid es va procedir a intentar la síntesi d'un complex de reni, amb la mateixa estequiometria que la del radiofàrmac, per tal de conèixer el tipus de coordinació de l'antibiòtic amb el metall. És important destacar que en la literatura no hi ha cap

⁵⁰ Deutsch, E.; Libson, K.; Jurisson, S.; Lindoy, L. F. *Progr. Inorg. Chem.* **1983**, 30, 75.

⁵¹ Bondoli, G.; Mazzi, U.; Roncari, E.; Deutsch, E. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 44, 191.

⁵² Johannsen, B.; Spies, H. *Topics in Current Chemistry*, 176 *Technetium and Rhenium*, Dunitz, J. D.; Hafner, K.; Ito, S.; Lehn, J.-M.; Raymond, K. N.; Rees, C. W.; Thiem, J.; Vögtle, F., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.

precedent de complexos de reni amb Ciprofloxacina. És més, fins i tot està publicat en un estudi de complexos de tecneci amb Ciprofloxacina que el seus van intentar preparar el complexos amb reni i no ho van aconseguir.⁵³

2.2.1. Síntesi directa

El primer mètode de síntesi assajat va ser la reducció directa amb clorur d'estany (II) del anió perrenat en presència de Ciprofloxacina. Aquesta reacció, és anàloga al mètode emprat en la preparació del radiofàrmac ^{99m}Tc-Ciprofloxacina. Cal destacar que, per a la síntesi del complex de reni, es va desestimar l'ús d'àcid tartàric com a lligand d'intercanvi. La possible competència d'aquesta espècie amb la Ciprofloxacina podria donar com a resultat mesclades de complexos de reni amb tartrat i Ciprofloxacina, ja que, com s'ha comentat en l'apartat 1.3.3. de la introducció del capítol I, els complexos de reni són cinèticament més inert que els de tecneci.



Esquema 5. Síntesi del complex de reni amb Ciprofloxacina mitjançant una reducció de complex [ReO₄].

Es van duu a terme diverses proves i el resultat sempre va ser la formació d'un sòlid negre, probablement un òxid estable de reni, conjuntament amb un sòlid blanc que podria ser Ciprofloxacina. La baixa velocitat de les reaccions de substitució amb el reni respecte al tecneci pot ser la causa de què amb el reni no s'obtingui el complex. Probablement la velocitat de reacció de formació del complex és molt més lenta que el procés redox i per aquest motiu s'obté un òxid de reni.

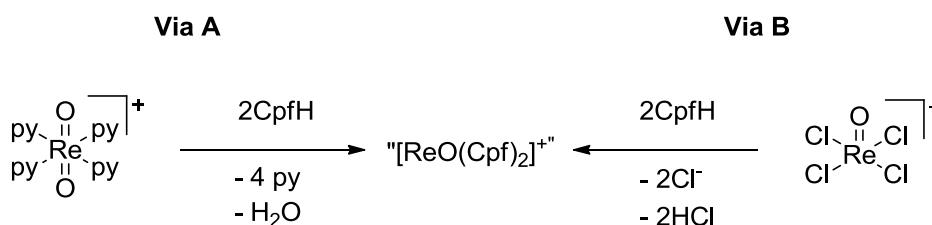
2.2.2. Síntesi del complex via precursors de Re (V)

Com que en la síntesi del complex per reducció directa no s'obtenia el compost desitjat, es va decidir canviar d'estratègia. Com ja s'ha comentat en l'apartat de la introducció, les diferents propietats químiques dels dos metalls comporten que la síntesi de complexos homòlegs de reni i tecneci sovint s'hagin de duu a terme per vies diferents.

⁵³ Oh, S. J.; Ryu, J.; Shin, J. W.; Yoob, E. J.; Ha, H.; Cheon, J. H.; Leel, H. K. *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, 57, 193.

Per aquest motiu, es va decidir partir d'un compost on el metall ja tenia l'estat d'oxidació que té el tecneci en el radiofàrmac i només calia substituir-ne els lligands. Per aquesta raó es va provar la síntesi a partir de complexos de reni (V) làbils.

Dos dels complexos de reni (V) més àmpliament utilitzats com a precursors són el $[\text{ReO}_2(\text{py})_4]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ⁵⁴ i el $[\text{NBu}_4][\text{ReOCl}_4]$.⁵⁵ Aquests compostos a més a més dels lligands oxo, contenen lligands làbils fàcilment bescanviabls per la Ciprofloxacina. Així doncs, per a la síntesi del complex de reni (V) homòleg al radiofàrmac, es varen plantejar dues rutes sintètiques (Esquema 6). L'obtenció d'un complex monooxo a partir d'un bisoxo (Via A) és fàcilment explicable tenint en compte els equilibris àcid-base abans comentats (Esquema 4). En aquest cas els protons provindrien de la Ciprofloxacina, que al desprotonar-se podria coordinar al metall en la seva forma aniónica.



Esquema 6. Representació esquemàtica de les dues vies de síntesi del complex de reni (V) Ciprofloxacina.

2.2.2.1. Síntesi del complex Re (V) amb Ciprofloxacina via $[\text{ReO}_2(\text{py})_4]^+$ (Via A)

Abans de realitzar la síntesi del complex, es va canviar el contranió clorur del precursor de reni (V). Es va escollir l'hexafluorofosfat, un anió més voluminós, a fi d'afavorir la precipitació de la hipotètica espècie catiónica $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]^+$. La síntesi del precursor $[\text{ReO}_2(\text{py})_4]\text{PF}_6$ ⁵⁶ es va realitzar d'acord amb la bibliografia descrita.

En un primer assaig, es va intentar obtenir el complex mitjançant una síntesi hidrotèrmica (Esquema 7). Es va optar per aquest mètode perquè en la bibliografia han estat publicats diferents treballs^{57,58} on emprant aquesta metodologia s'obtenen excel·lents resultats en la preparació de complexos metàl·lics amb Ciprofloxacina. El mètode consisteix en fer reaccionar el metall i el lligand en solució aquosa, en un vial de

⁵⁴ Rose, D. J.; Maresca, K. P.; Kettler, P. B.; Chang, Y. D.; Soghomomian, V.; Chen, Q.; Abrams, M. J.; Larsen, S. K.; Zubieta, J. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 3548.

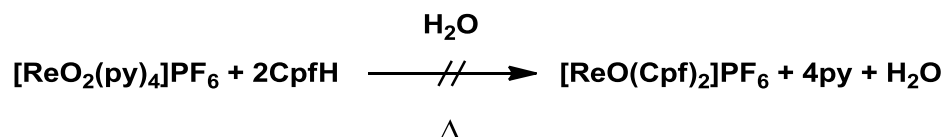
⁵⁵ Dilworth, J. R. *Inorg. Chem.* **1997**, 31, 257.

⁵⁶ Gray, H. B.; Brewer, J. C.; *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 3334.

⁵⁷ Wang, E.-B.; Su, Z.-M.; Xiao, D.-R.; An, H.-Y.; Li, Y.-G.; Gao, L.; Sun, C.-Y.; Xu, L. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6673.

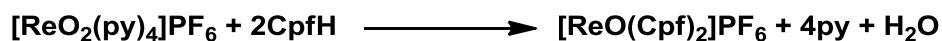
⁵⁸ Drevensek, P.; Ulrih, N. P.; Majerle, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1705.

pyrex a l'estufa a temperatures de l'ordre de 130 °C. De la pressió i la temperatura assolida en el vial en resulta la formació dels complexos. Els cristalls es formen al cap d'uns dies deixant la solució a temperatura ambient.



Esquema 7. Síntesi hidrotèrmica del complex de reni homòleg al radiofàrmac.

Després de diferents assaigs modificant variables com el temps de reacció, la concentració de reactius i la temperatura, es va decidir abandonar aquest mètode ja que el sòlid que s'obtenia era sempre l'antibiòtic sense reaccionar. Una possible justificació d'aquest resultat podria ser que la velocitat de formació del complex sigui lenta i el precursor de reni (V) descompongui abans de complexar-se. Cal destacar que en la bibliografia consultada sobre reaccions hidrotèrmiques amb Ciprofloxacina, el reactiu metàl·lic sempre es presentava en forma de sal hidratada de metalls en estats d'oxidació estables. Aquest resultat va portar a assajar la reacció en condicions més suaus per minimitzar les reaccions de descomposició. El nou procediment va consistir en realitzar un reflux d'una mescla de reacció que contingués el precursor i la Ciprofloxacina (Esquema 8).



Esquema 8. Preparació del complex de reni homòleg al radiofàrmac.

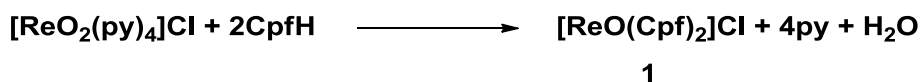
Es van variar algunes de les condicions de reacció; el dissolvent, el temps de reacció (Taula 1).

Taula 1. Resultats de la reacció obtinguts en diferents condicions de dissolvent i temps, pel precursor amb el contraanió hexafluorofosfat. Les lletres expressen les quantitats de Ciprofloxacina que queda sense reaccionar. (A) Ciprofloxacina minoritària, color intens de la solució. (B) Quantitats apreciables de Ciprofloxacina, solució colorejada. (C) Ciprofloxacina majoritària, solució feblement colorejada.

	Acetona	Metanol	Etanol
2 hores	C	A	A
4 hores	C	A	B
24 hores	--	B	--

En les proves realitzades amb acetona com a solvent, tot i observar un lleuger canvi en la coloració de la solució, el precipitat obtingut era novament l'antibiòtic. Per contra, els experiments realitzats amb metanol i etanol donaven com a resultat un fort enfosquiment de la mescla de reacció, més intens en el cas del metanol. Per minimitzar la quantitat de Ciprofloxacina present en el producte, es varen realitzar algunes proves afegint només un equivalent de Ciprofloxacina. En aquestes condicions també es produïa un lleuger enfosquiment de la reacció i, tot i que la Ciprofloxacina es trobava en defecte en la mescla de reacció, encara es podia observar la presència de l'antibiòtic lliure en el producte. Atès que el metanol era el solvent que portava a uns millors resultats, es va estudiar la influència del temps de reacció realitzant un reflux de 24 hores. Amb aquestes condicions però, es va observar una major presència de Ciprofloxacina en el producte final. Aquest fet es podria explicar per la possible descomposició del complex.

És important comentar que els precipitats eren insolubles en un gran ventall de solvents i això en dificultava la seva caracterització. Per aquest motiu, es va decidir repetir les proves que havien donat millors resultats, però amb el contraanió clorur (Esquema 9), per tal d'obtenir productes més solubles i poder realitzar estudis de RMN (Taula 2).



Esquema 9. Preparació del complex de reni homòleg al radiofàrmac.

Taula 2. Resultats de la reacció obtinguts en diferents condicions de dissolvent i temps, pel precursor amb el contraanió clorur. (A) Ciprofloxacina minoritària, color intens de la solució. (B) Quantitats apreciables de Ciprofloxacina, solució colorejada.

	Metanol	Etanol
2 hores	A	B
4 hores	A	B

Com en el cas anterior les solucions resultants eren fosques i, emprant metanol com a dissolvent, es van obtenir bons resultats. En canvi, en el cas de la síntesi amb etanol com a solvent, la presència de Ciprofloxacina en el producte final va ser major respecte els experiments anteriors realitzats amb el precursor que contenia hexafluorofosfat com a contraanió.

La major solubilitat del producte amb el contraió clorur respecte el de hexafluorofosfat va permetre la seva caracterització. Tot i així, aquest lleuger increment no va ser suficient per poder obtenir espectres de ressonància de carboni-13 en solució ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN). En els nombrosos intents portats a terme mai es varen poder observar les senyals d'alguns dels carbonis quaternaris de l'antibiòtic. A més a més, durant l'enregistrament de l'espectre sempre s'observava una pèrdua del color de la solució i l'aparició de petits cristalls incoloros en el tub de ressonància. Aquests cristalls foren posteriorment identificats mitjançant espectroscòpia d'infraroig (IR) com Ciprofloxacina lliure. Una moderada estabilitat del complex en solució podria ser la causa de l'aparició de Ciprofloxacina lliure. La dissociació de diferents complexos metàl·lics en solució ja ha estat observada en diferents complexos metall-quinolona, donant com a resultat la molècula de quinolona lliure, acompanyada del ió metàl·lic corresponent en la seva forma hidratada més estable.⁵⁹ Per aquest motiu l'espectre de ressonància magnètica nuclear de carboni es va enregistrar en estat sòlid (^{13}C CP-MAS), aquest tipus d'espectres difereixen essencialment en l'augment de l'amplada de pic dels senyals dels carbonis en comparació als RMN en solució. Aquest augment és a conseqüència de l'anisotropia que presenta la mostra en estat sòlid.

L'espectre de masses en alta resolució (**HRMS**) d'aquest complex realitzat en metanol va mostrar un pic a $m/z = 863.1977$ que coincideix amb l'estequiometria d'un oxocomplex de reni amb dues molècules de Ciprofloxacina coordinades, $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]^+$, com en el cas del radiofàrmac. A més a més, la distribució isotòpica mostrada està d'acord amb la teòrica prevista per un complex de reni (Figura 19).

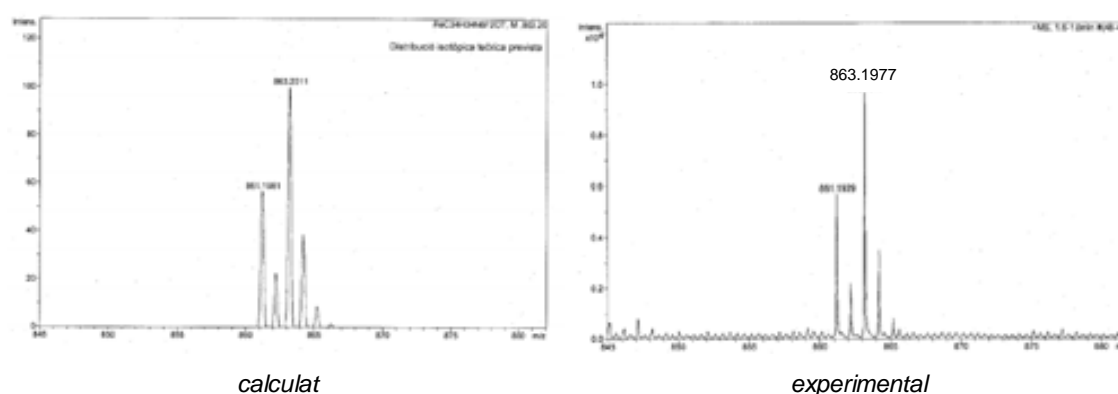


Figura 19. Espectre HRMS del complex $\text{ReO}(\text{Cpf})_2^+$.

⁵⁹ Drevensek, P.; Zupancic, T.; Pihlar, B.; Jerala, R.; Kolisch U.; Plaper, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 432.

La major solubilitat del complex amb el contraanió clorur va permetre enregistrar l'espectre de ressonància magnètica de protó ($^1\text{H-RMN}$) (Figura 20) en metanol- d_4 . En aquest espectre només s'observen els senyals de protó corresponents a la Ciprofloxacina. Aquests senyals es troben en tres zones clarament diferenciades. La zona a $\delta > 7$ correspon als tres protons aromàtics de l'antibiòtic, el senyal a δ 8.78 pertany al protó del anell de quinolona (H-2) i el seu desplaçament químic concorda amb el d'altres complexos amb Ciprofloxacina,⁶⁰ on la pèrdua de densitat electrònica de C-2 desplaça el senyal del protó a valors de δ més alts.

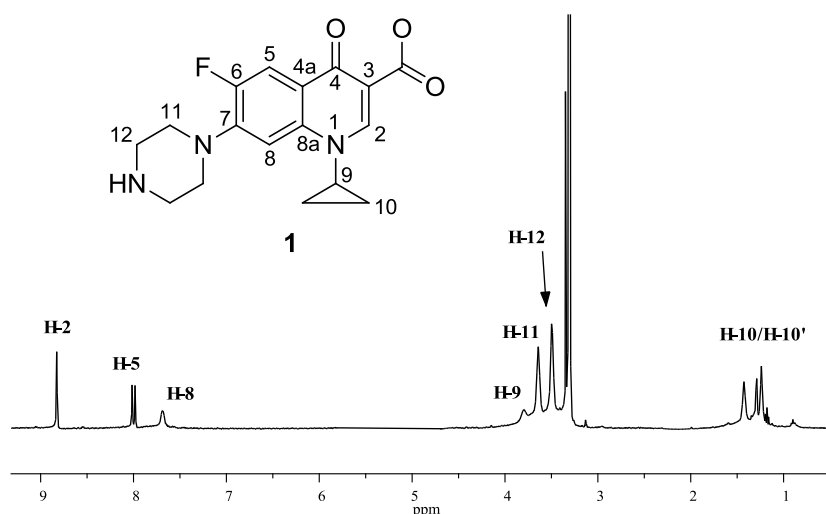


Figura 20. Espectre $^1\text{H-RMN}$ en metanol- d_4 del complex $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]^+$. Per a simplificar el dibuix només es representa la molècula de Ciprofloxacina tot i estar coordinada al metall reni.

D'acord amb la bibliografia, aquest fet comportaria que la coordinació entre el reni i la Ciprofloxacina fos pels grups carboxilat i cetona formant un anell de sis baules (Figura 21). Com ja s'ha comentat en l'apartat 1.1.3. de la introducció del present capítol, aquest tipus de coordinació és la més comuna en la Ciprofloxacina.

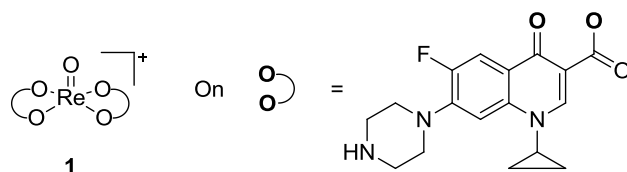


Figura 21. Estructura proposada pel complex de reni (V) amb Ciprofloxacina $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]^+$.

⁶⁰ Zieba, A.; Masnamkiewicz, A.; Silkowski, J. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, 42, 903.

L'espectre de ^{13}C CP-MAS del complex (Figura 22.B) presenta majoritàriament uns senyals molt semblants a l'antibiòtic lliure (Figura 22.A). A valors de $\delta < 60$, no existeixen grans diferències en la posició dels senyals entre els dos espectres. El canvi més notable s'observa en els senyals dels carbonis C-4 (δ 175) i el carboxilat (δ 165) els quals en el antibiòtic presenten el mateix desplaçament químic (δ 169). També el senyal del carboni C-3 pateix un fort desplaçament cap a δ menors. Aquest canvi, que pot atribuir-se novament a la presència del metall coordinat pel grup carboxilat i cetona de l'antibiòtic, estaria d'acord amb el que s'observa en l'espectre de protó comentat anteriorment. Cal destacar que aquest comportament en els senyals dels carbonis coincideix amb el complex $[\text{Al}(\text{CpfH})_3]\text{Cl}_3$,⁶¹ el qual està descrit el seu espectre de carboni-13 en estat sòlid.

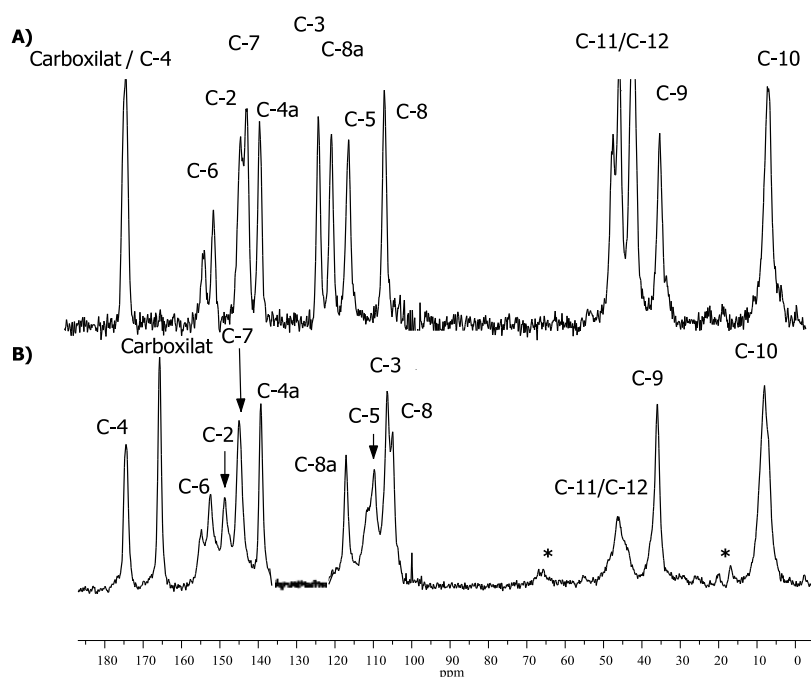


Figura 22. Espectres de ^{13}C CP-MAS de A) Ciprofloxacina i B) complex $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]\text{Cl}$. * Senyal causada per l'spinning de la mostra.

L'espectre IR mostra les bandes més intenses a 1630 i 1454 cm^{-1} , fet que està d'acord amb que la coordinació del lligand és dóna a través dels grups cetona i carboxilat. En la literatura es troben descrites aquestes bandes entre 1630 i 1400 cm^{-1}

⁶¹ Chattah, A. K.; Linck, Y. G.; Monti, G. A.; Levstein, P. R. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 850.

amb metalls com: Zn,⁶² Mg,⁶³ Cd⁶⁴ entre d'altres. La banda a 896 cm⁻¹ podria correspondre al enllaç $\nu(\text{Re}=\text{O})$. Aquesta banda sol estar present en els oxocomplexos de reni entre 1000 i 850 cm⁻¹. L'espectre també mostra una banda d'intensitat mitjana a 1730 cm⁻¹, aquesta banda en l'espectre de l'antibiòtic apareix molt més intensa, fet que indica la presència de petites quantitats de l'antibiòtic lliure en el producte, les quals no es varen poder eliminar. Aquest fet va fer impossible l'obtenció de resultats reproduïbles en els anàlisi elementals.

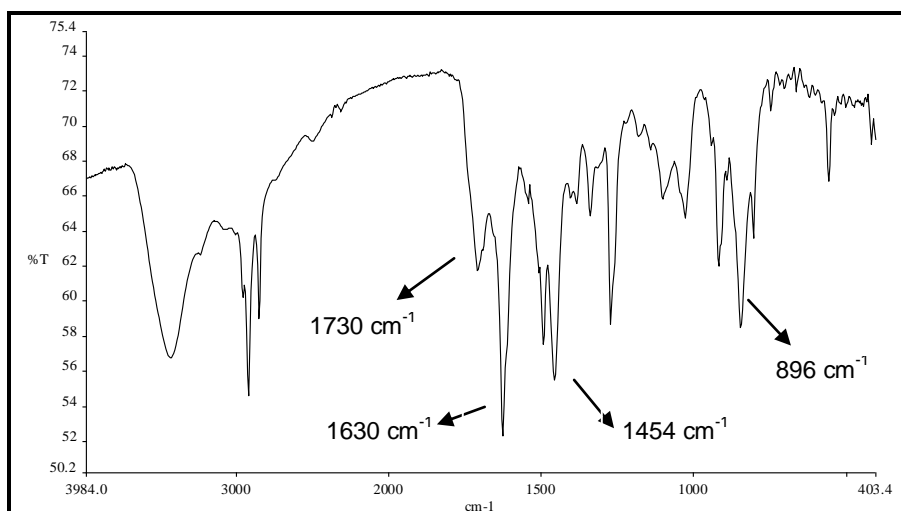


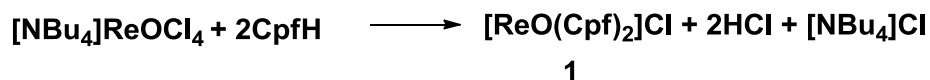
Figura 23. Espectre IR (ATR) del complex 1.

Conseqüentment, tot i què la síntesi anterior està d'acord amb la formació d'un complex de reni amb Ciprofloxacina d'estequiometria $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]^+$, es va procedir amb la síntesi del complex emprant un altre precursor (Esquema 6, Via B) que fos molt més reactiu que l'anterior a fi de poder obtenir el producte amb major puresa. És per aquest motiu, que es va escollir el precursor $[\text{NBu}_4][\text{ReOCl}_4]$. Aquest compost de Re (V) conté quatre anions clorur extremadament làbils i és força emprat en la síntesi d'oxocomplexos de reni. La gran reactivitat d'aquest complex obliga a la seva manipulació en unes condicions que impedeixin el contacte amb l'aire i molt especialment amb l'aigua ja que és un producte que s'hidrolitza instantàniament.

⁶² Zahid, H. C.; Caludiu, T. S.; Scozzafava, A. *J. Enzyme Inhibition and Med. Chem.* **2005**, 20, 303.

⁶³ Alberto, R. *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1179.

⁶⁴ Marzilli, L. G.; Carlone, M.; Taylor, A. T.; Xu, X. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 5437.

2.2.2.2. Síntesi del complex de Re (V) amb Ciprofloxacina via $[ReOCl_4]$ (Via B)

Esquema 10. Preparació del complex homòleg al radiofàrmac.

La gran reactivitat d'aquest precursor de reni (V) va permetre realitzar la síntesi del oxocomplex amb l'antibiòtic a 0 °C. D'aquesta manera es pretenia evitar qualsevol possible descomposició del producte un cop format. En aquesta via és necessari assecat perfectament la Ciprofloxacina per tal d'evitar la reacció d'hidròlisi del precursor de reni comentada amb anterioritat. L'únic solvent emprat va ser el metanol prèviament anhidritzat. És important remarcar que per aquesta via no s'obté com a subproducte cap molècula d'aigua, ja que el precursor de reni no conté inicialment dos lligands oxo. Els experiment realitzats amb aquest precursor, sempre donaven com a resultat l'enfosquiment de la solució corresponent a la formació del complex, el qual precipitava quasi instantàneament en el medi de reacció com a conseqüència de la baixa temperatura del medi de reacció. A més a més, es va observar que la reacció era significativament més ràpida respecte a la de l'anterior precursor tot i portada a terme a 0 °C.

L'espectre de **EM** del complex obtingut per aquesta via (compost **1**) mostra un pic $m/z = 863.2$ corresponent novament a l'estequiometria esperada $[ReO(Cpf)_2]^+$ i la distribució isotòpica del pic coincidia al obtingut anteriorment.

Tant l'espectre de **1H -RMN** com el de **^{13}C CP-MAS** del complex s'observen els mateixos canvis respecte l'antibiòtic lliure, els quals ja han estat comentats anteriorment.

L'espectre d'infraroig (Figura 24) mostrava novament bandes intenses a 1626 i 1451 cm^{-1} i una banda a 896 cm^{-1} d'intensitat mitjana que podria correspondre al enllaç $\nu(Re=O)$. Una diferència significativa respecte de l'espectre del anterior compost, és l'absència de la banda a 1730 cm^{-1} indicant l'absència de Ciprofloxacina lliure contaminant el producte.

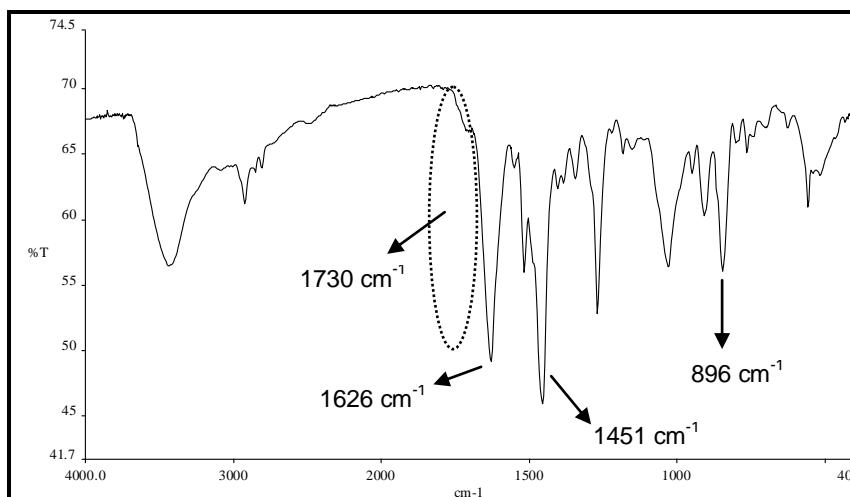


Figura 24. Espectre IR (ATR) del complex 1.

Posteriorment, es va procedir a analitzar la puresa del producte mitjançant **anàlisi elemental**. Els resultats obtinguts indicaven una estequiometria $[\text{ReO}(\text{CpfH})_2]\text{Cl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en la qual la Ciprofloxacina es trobaria coordinada al metall en forma zwitteriònica. Aquest resultat indica que, durant la formació del oxocomplex metàl·lic, les amines secundàries dels anells de piperazina de les dues molècules coordinades es protonen amb l'àcid clorhídric generat en el transcurs de la reacció. D'aquesta manera el complex tricatiònic format (Figura 25) precipita en el si de la solució junt amb tres anions clorur.

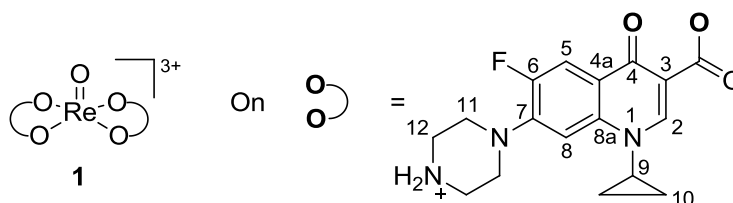


Figura 25. Estructura proposada pel complex de reni (V) amb Ciprofloxacina $[\text{ReO}(\text{CpfH})_2]^{3+}$ on la Ciprofloxacina coordinaria en forma zwitteriònica.

Així doncs, un cop sintetitzat i caracteritzat el complex de reni homòleg al radiofàrmac $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ciprofloxacina per dues vies diferents, podem concloure que el compost es tractaria d'un oxocomplex amb estat d'oxidació V i estructura de piràmide de base quadrada. La coordinació seria del tipus O,O-donador on intervindrien els grups cetona i carboxilat formant un anell de sis baules amb el metall. Arribats aquest punt, és important remarcar que aquest tipus de coordinació (O-donador) no sol ser molt emprada en els radiofàrmacs de tecneci (V) ja que els complexos formats solen ser làbils i bescanvien els lligands amb relativa facilitat. Aquest fet s'ha pogut comprovar amb els

intents d'enregistrar els espectres de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en solució. Com s'ha comentat anteriorment, es va observar que en deixar el complex en solució aquesta perdia poc a poc el color corresponent a la formació del complex i, a més a més, s'observava la precipitació de Ciprofloxacina lliure. D'altra banda, és important destacar que els complexos O-donador es fan servir majoritàriament en radiofarmàcia com a compostos intermedis. Els més habituals solen ser el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Gluconat o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tartrat. Aquest últim és emprat en la pròpia síntesi del radiofàrmac de tecneci amb Ciprofloxacina.

2.3. Síntesi i caracterització de dos nous complexos de reni tricarbonil amb Ciprofloxacina

A més del fragments $\{\text{TcO}^{3+}\}$ i $\{\text{TcO}_2^+\}$ molt utilitzats en Medicina Nuclear, existeixen altres fragments que recentment han despertat un gran interès. És el cas del fragment organometàl·lic *fac*- $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}$. Els radiofàrmacs que contenen aquest nou fragment de tecneci solen presentar una gran estabilitat "*in vivo*" i resulten molt atractius per la gran capacitat de travessar les membranes cel·lulars del organisme, així com per la seva fàcil preparació. De les seves propietats, i dels grans avantatges que comporta l'ús d'aquest fragment metàl·lic tricarbonílic, se'n parlarà més àmpliament en l'apartat 1.1.3. del capítol III.

El primer dels dos nous complexos metàl·lics amb Ciprofloxacina i el fragment de reni tricarbonil pretén ser un compost amb el mateix tipus de coordinació (O,O-donador) on l'única diferència significativa sigui el fragment metàl·lic unit a l'antibiòtic. D'altra banda, pel segon complex es modificaria lleugerament l'antibiòtic a fi de forçar un altre tipus de coordinació amb el metall. És important remarcar que durant el transcurs d'aquest treball s'han publicat estudis de nous radiofàrmacs de tecneci basats en aquestes dues aproximacions.⁶⁵⁻⁶⁷

⁶⁵ Halder, K. K.; Nayak, D. K.; Baishya, R.; Sarkar, B. R.; Sinha, S.; Ganguly, S.; Debnath, B. C. *Metallomics*, **2011**, 3, 1041.

⁶⁶ Shijian, Z.; Weifang, Z.; Yue, W.; Zhonghui, J.; Xuebin, W.; Junbo, Z.; Yanyan, Z. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 369.

⁶⁷ Junbo, Z.; Xuebin, W.; Shijian, Z.; Haixun, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3781.

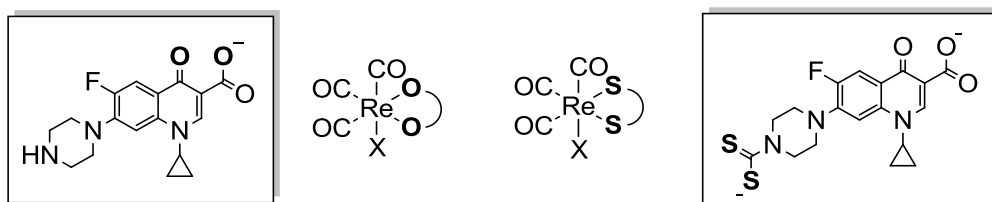


Figura 26. Representació dels complexos de reni (I) tricarbonílics amb Ciprofloxacina. (X= lligand monodentat).

Així doncs per a la preparació d'aquests dos nous complexos es varen preparar, seguint la metodologia descrita en la bibliografia, dos precursors de reni (I) tricarbonil; el $\text{Re}(\text{CO})_5(\text{O}_3\text{SCF}_3)^{68}$ i el $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{Br})_3(\text{CO})_3]^{69}$.

2.3.1. Síntesi del complex *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cpf})(\text{H}_2\text{O})]$

Per a realitzar la síntesi d'aquest complex és necessari preparar prèviament *in situ* el complex precursor *fac*- $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, amb el contraanió triflat. Per a l'obtenció d'aquest compost es realitza un reflux del complex de $\text{Re}(\text{CO})_5(\text{O}_3\text{SCF}_3)$ en aigua. Cal destacar que a causa del fort caràcter π -acceptor dels lligands CO, el nou complex format és capaç de desprotonar-se en aigua⁷⁰ (Figura 27) donant lloc a espècies dimèriques com $[\text{Re}_2(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_6]^-$ o trimèriques com $[\text{Re}_3(\mu\text{-OH})_3(\mu_3\text{-OH})(\text{CO})_9]^-$.

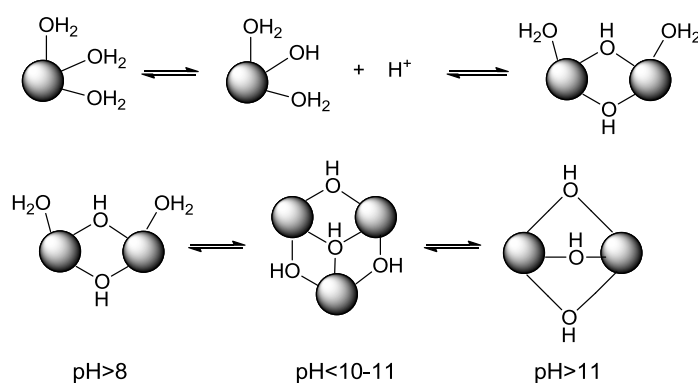


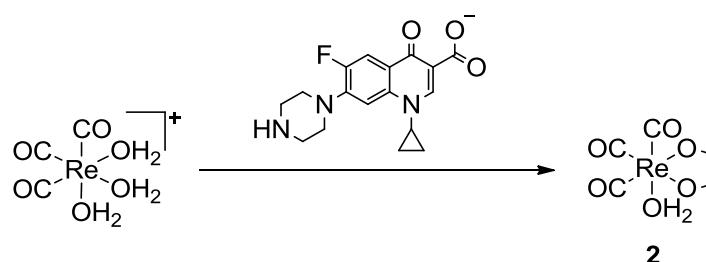
Figura 27. Equilibris àcid-base del complex *fac*- $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$.

⁶⁸ Schmidt, S. P.; Troglor, W. C.; Basolo, F. *Inorg. Synth.* **1985**, 23, 41.

⁶⁹ Miroslavov, A. E.; Gorschkov, N. I.; Lumpov, A. A.; Suglobov, D. N. *Radiokhimiya* **1996**, 15, 213.

⁷⁰ Egli, A.; Hegetschweiler, K.; Alberto, R.; Abram, U.; Schibli, R.; Hedinger, R.; Gramlich, V.; Kissner, R.; Schubiger P. A. *Organometallics* **2007**, 26, 1332.

La formació d'aquestes espècies obliga l'ús de condicions neutres o àcides i és per aquest motiu que es varen realitzar diferents proves modificant les condicions de pH de la mescla de reacció.



Esquema 11. Síntesi del complex de reni tricarbònic amb Ciprofloxacina (O,O-donador).

Es va observar que com a conseqüència de la baixa solubilitat que presenta l'antibiòtic entre els pHs 5 i 7 la reacció amb el precursor de reni no era completa i per tant quedaven restes d'antibiòtic lliure en el producte final. No va ser possible eliminar aquestes restes de CpfH lliure ja que el producte presentava una baixa solubilitat en tot tipus de dissolvent. Per aquest motiu es va creure convenient realitzar la síntesi a $\text{pH} \approx 3$. En aquestes condicions, la Ciprofloxacina es troba completament dissolta i en un equilibri entre les espècies totalment protonada i el zwitterió.^{71,72} Amb aquestes condicions de síntesi va ser possible l'obtenció d'un producte sòlid de color groc no contaminat amb Ciprofloxacina (producte **2**).

L'espectre d'**EM** d'aquest complex realitzat amb metanol mostra un pic $m/z = 602.2$ el qual es correspon a $M+H^+$ on M és $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cpf})]$. La distribució isotòpica del pic va ser la prevista per un complex de reni. La baixa solubilitat del producte no va permetre l'enregistrament del espectre HRMS.

En els espectre de **¹H-RMN** enregistrat en dimetilsulfòxid- d_6 s'observen només els senyals de la Ciprofloxacina. Com en el cas anterior s'observa un desplaçament químic dels tres protons aromàtics a δ majors fet que estaria d'acord amb una coordinació igual que en el complex anterior (grups carboxilat i cetona).

La baixa solubilitat del complex va obligar novament a l'enregistrament de l'espectre de carboni en estat sòlid. En l'espectre **¹³C CP-MAS** es poden observar els dos senyals dels carbonis C-4 ($\delta \approx 175$) i carboxilat ($\delta \approx 168$) de la Ciprofloxacina corresponent

⁷¹ Fallati, C. S.; Ahumada, A. A.; Manzo, R. H. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **1994**, 13, 73.

⁷² Hernández-Borrell, J.; Montero, M. T. *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 1311.

a la formació del complex amb la Ciprofloxacina amb el mateix tipus de coordinació que l'anterior (Figura 28). A més a més, també es pot observar un senyal a desplaçament químic major de 200 ppm, que podria ser assignat als tres carbonils del complex.⁷³

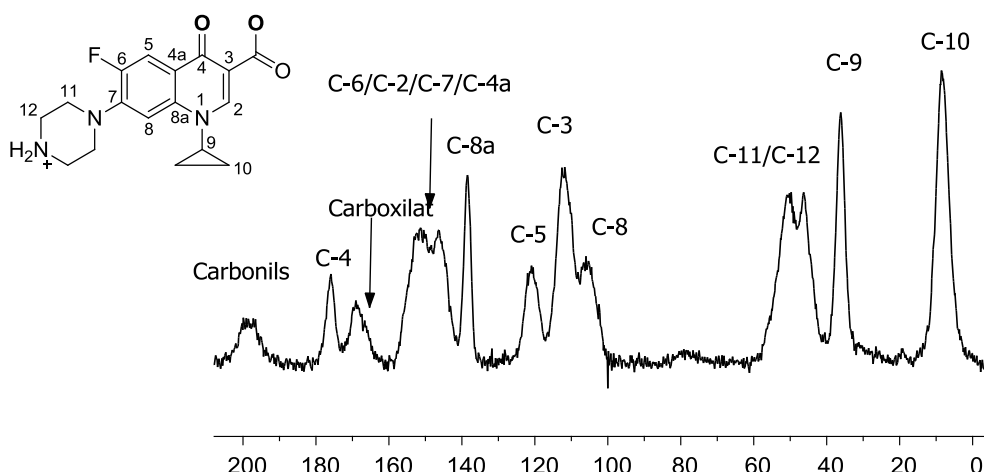


Figura 28. Espectre de ^{13}C CP-MAS del complex $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cpf})(\text{H}_2\text{O})$.

L'espectre **IR(ATR)** mostra les bandes corresponents a la coordinació de la Ciprofloxacina pels grups carboxilat i cetona (1614 i 1480 cm^{-1}) i no es va observar la banda corresponent a la presència d'antibiòtic lliure en el producte. L'absència de Ciprofloxacina contaminant el producte es va poder confirmar amb posterioritat en realitzar l'anàlisi elemental del compost. També s'observen dues bandes molt intenses a 2018 i 1871 cm^{-1} , que s'assignen a la vibració del enllaç $\nu(\text{CO})$ dels tres carbonils.

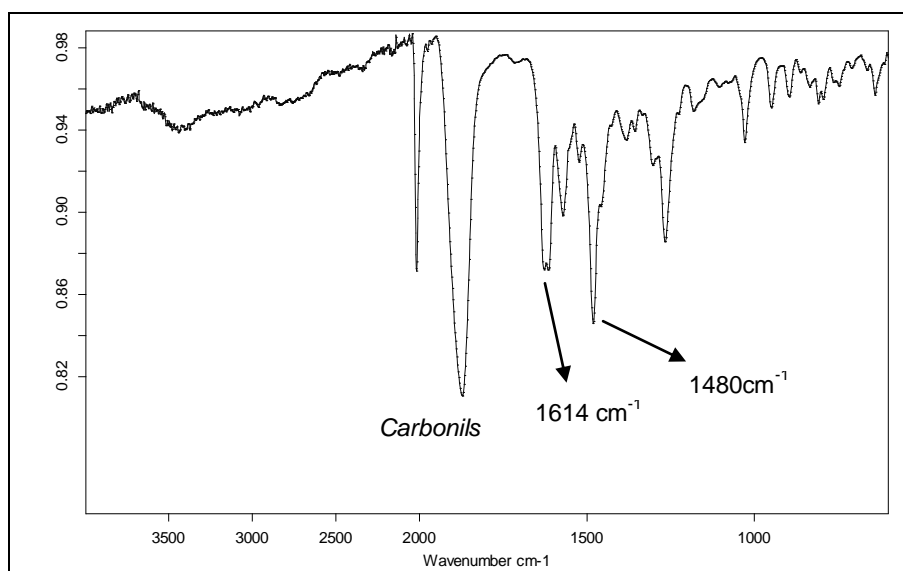
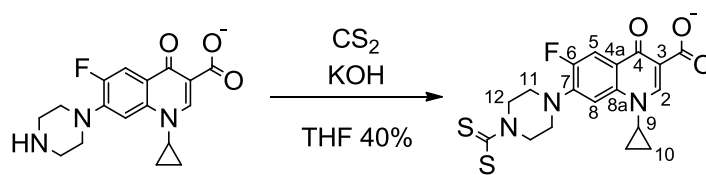


Figura 29. Espectre IR (ATR) del complex 2.

⁷³ Gray, H. B.; Brewer, J. C. *Inorg. Chem.* **1997**, 31, 257.

2.3.2. Síntesi del complex *fac*-Re(CO)₃(DTC-Cpf)(PPh₃)

2.3.2.1. Síntesi del ditiocarbamat de Ciprofloxacina (DTC-cpf)



Esquema 12. Síntesi del ditiocarbamat de Ciprofloxacina.

El ditiocarbamat de Ciprofloxacina (DTC-Cpf) es va preparar segons el procediment experimental publicat en la bibliografia.⁷⁴ L'única diferència va ser l'ús d'hidròxid de potassi en vers del de sodi per la presumpte major solubilitat de les sals de potassi. La síntesi consta de dos passos, els quals es duen a terme en un bany d'aigua-gel. El primer és la desprotonació de l'antibiòtic mitjançant hidròxid de potassi i el segon l'addició poc a poc de disulfur de carboni en el si de la solució. Un cop acaba l'addició es deixa reaccionar primer a baixa temperatura i posteriorment a temperatura ambient. S'evapora la solució i el cru resultant es recristal·litza amb una mescla metanol/èter dietílic.

L'espectre de ¹H-RMN (Figura 30) confirma la formació del ditiocarbamat. En l'espectre es pot observar el desplaçament del senyal dels protons H-12 cap a camp baix per la presència del grup ditiocarbamat.

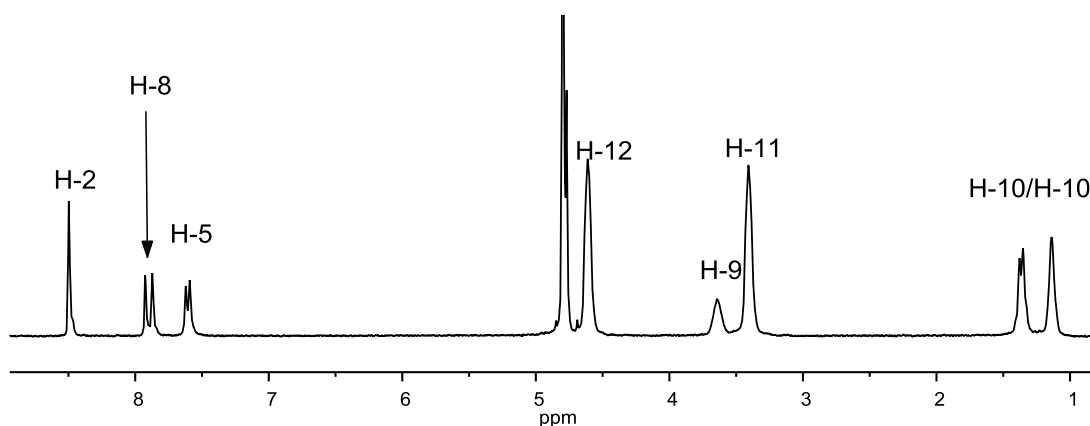
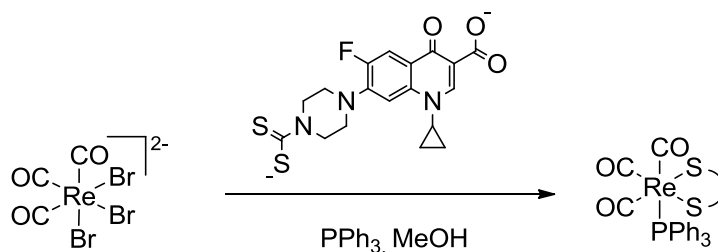


Figura 30. Espectre de ¹H-RMN enregistrat en D₂O del compost DTC-Cpf.

⁷⁴ Junbo Z.; Haixun G.; Shijian Z.; Yan L.; Xuebin W.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5168.

Un cop preparat el ditiocarbamat de la Ciprofloxacina es va realitzar la síntesi del complex de reni en metanol (Esquema 13), afegint primerament l'antibiòtic i després la trifenilfosfina.



Esquema 13. Síntesi del complex de reni carbonílic amb el ditiocarbamat de la Ciprofloxacina.

A diferència del cas anterior es va decidir afegir un segon lligand (trifenilfosfina) per tancar la coordinació del complex de reni i així obtenir un complex del tipus $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$, els quals es coneix que presenten molta estabilitat. A més a més, la síntesi es dur a terme en dos passos per evitar la formació d'espècies de reni amb dues trifenilfosfines coordinades. Un cop acabada la reacció en deixar refredar la solució per tal de precipitar el producte.

Malauradament, la baixa solubilitat del producte no va permetre enregistrar un espectre de ^1H -RMN representatiu de la mostra, ja que en intentar dissoldre el producte en DMSO-d_6 una part important del sòlid roman precipitada. Per aquest motiu, la caracterització completa del producte es fa molt difícil ja que només es disposa dels espectre de ^{13}C CP-MAS (Figura 31) i l'infraroig. En l'espectre de carboni en estat sòlid es pot observar els senyals del grup ditiocarbamat a $\delta \approx 210$, aquest valor és proper a altres complexos de reni carbonil. No obstant això, el desdoblament dels senyals del carboni C-4 i el grup carboxilat sembla indicar, com en els casos anteriors, la presència d'un metall coordinat covalentment a aquests grups. També s'observen els senyals dels carbonis de la trifenilfosfina entre 125 i 140 ppm.

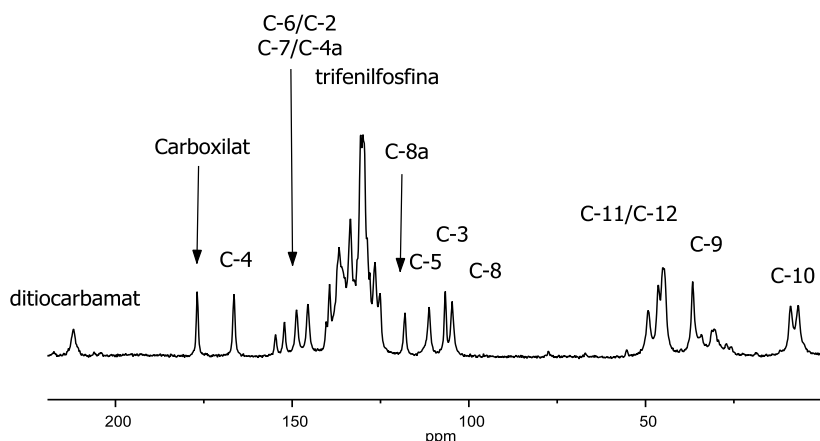


Figura 31. Espectre de ^{13}C CP-MAS del complex producte de reni carbonil format amb Dtc-Cpf.

Aquestes poques dades espectroscòpiques del producte no permeten poder afirmar quina és l'estructura exacte, tot i que l'extremada baixa solubilitat, fins i tot en dimetilsulfòxid, fa pensar que es pugui tractar d'un producte més aviat polimèric⁵⁷ que no pas un complex de coordinació monomèric. A fi de poder obtenir el producte desitjat es varen variar les condicions de reacció (temperatura, quantitat de reactius,...) però en tots els casos es van obtenir productes similars i, per tant, no ha estat possible la caracterització completa d'aquest compost.

2.4. Estudi de les propietats antibacterianes dels complexos de reni

Els estudis bacteriològics dels complexos de reni (**1**, **2**) amb Ciprofloxacina han estat realitzats a la Unitat de Microbiologia del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. La comparació dels resultats que s'obtinguin amb els dos complexos pot ajudar a entendre quina és la influència del metall en l'activitat antibacteriana de l'antibiòtic. A més a més, en el cas del complex **1**, els resultats ajudarien a comprendre el mecanisme d'acció del radiofàrmac Infecton i així poder aportar nova informació que ajudi a les seves propietats radiofarmacèutiques.



Figura 32. Complexos de reni amb Ciprofloxacina emprats en els estudis bacteriològics.

2.4.1. Determinació dels diàmetres d'inhibició en el creixement bacterià⁷⁵

El primer dels estudis realitzats es va portar a terme amb alguns dels bacteris més comuns gram positius i gram negatius. L'experiment consisteix en exposar diferents bacteris a una quantitat coneguda de complex (Figura 33) i observar el creixement d'aquests. S'impregna un petit disc amb el producte que es vulgui avaluar i es diposita sobre una placa de petri. Seguidament s'incuba un cultiu del bacteri a estudiar durant un temps determinat i es mesura el diàmetre d'inhibició del producte, el qual correspon a l'àrea al voltant del disc on el bacteri no ha pogut créixer. En la Taula 3 es recullen els resultats obtinguts en l'estudi.

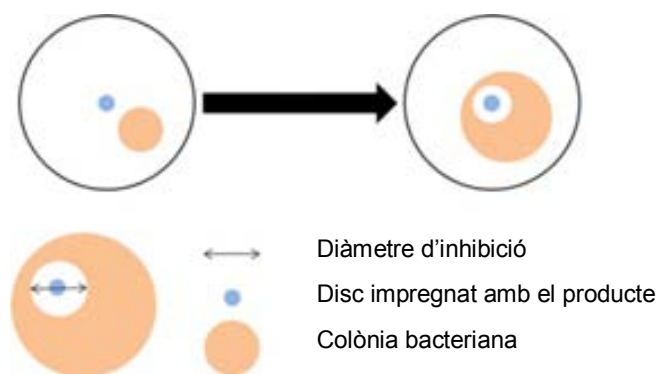


Figura 33. Representació esquemàtica del procediment per determinar els diàmetres d'inhibició.

Taula 3. Activitat antibacteriana dels compostos 1-2 i el clorhidrat de la Ciprofloxacina. *Els diàmetres d'inhibició han estat substituïts pels següents símbols: +, Ø=7-19 mm; ++, Ø= 20-29 mm; +++, Ø>29 mm.⁷⁶

Microorganismes	Substàncies*			
	[CpfH ₂]Cl	1	2	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	-

En la Taula 3 es pot observar que el complex **1** té una activitat antibacteriana semblant a la Ciprofloxacina, mentre que el complex **2** mostra una activitat lleugerament inferior a l'antibiòtic lliure. Puig que la solubilitat en aigua del complex **2** es molt baixa es

⁷⁵ Lecompte, S.; Baron, M. H.; Chenon, M. T.; Coupry, C.; Moreau, N. J. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1994**, 38, 2810.

⁷⁶ Turel, I.; Leban, I.; Bukovek, N. J. *Inorg. Biochem.* **1997**, 66, 241.

va haver d'emprar DMSO per a poder impregnar el disc amb la mostra i, per tant, es va haver d'avaluar la capacitat antibacteriana d'aquest dissolvent. En la Taula també es mostren els resultats obtinguts amb el DMSO i es pot comprovar que aquest no té cap influència en el creixement de cap dels bacteris estudiats.

2.4.2. Estudi de la interacció dels complexos amb ADN-Girasa (Topoisomerasa II)

Un cop completat l'estudi de l'activitat antibacteriana es va plantejar realitzar un estudi de l'activitat dels complexos enfront una ADN-Girasa⁷⁷ de bacteri (*E. coli*). Amb aquesta prova es pretén analitzar si el mecanisme d'interacció dels complexos de reni sintetitzats és similar al del antibiòtic lliure. Com ja s'ha comentat anteriorment, l'ADN-Girasa és l'enzim encarregat de relaxar la doble cadena d'ADN del bacteri durant el procés de replicació, formant un macrocomplex que és la diana sobre la qual actuen els antibiòtics de la família de les quinolones i fluoroquinolones. Existeixen diferents models per explicar com és el mecanisme d'unió entre l'antibiòtic i el par ADN/ADN-Girasa.⁷⁸ El més acceptat avui dia és aquell que proposa que, un cop l'enzim s'uneix al ADN, la cavitat que es forma per l'obertura de la doble cadena d'ADN⁷⁹ és ocupada per molècules d'antibiòtic disposades en paral·lel entre elles (Figura 34).⁸⁰

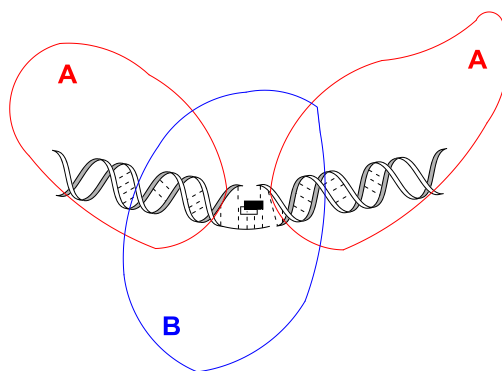


Figura 34. Mecanisme d'actuació de la Ciprofloxacina. Les 2 subunitats de l'ADN-Girasa estan representades pels colors vermell (subunitat A) i blau (subunitat B). Les diferents molècules de l'antibiòtic es troben representades per rectangles de colors dins la cavitat formada per l'obertura de la doble cadena de ADN.

⁷⁷ Brown, P. O.; Cozzarelli, N. R. *Science* **1979**, 206, 1081.

⁷⁸ Shen, L. L.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Donell, T. J.; Chu, D. W. T.; Cooper, C. S.; Rosen, T.; Pernet, A. G. *Biochemistry* **1989**, 28, 3886.

⁷⁹ Kirchhausen, T.; Wang, J. C.; Harrison, S. C. *Cell* **1985**, 41, 933.

⁸⁰ Drlica, K.; Franco, R. J. *Biochemistry* **1988**, 27, 2253.

Així doncs, les molècules d'antibiòtic un cop es troben a la cavitat, interaccionarien per ponts d'hidrogen amb les bases nitrogenades lliures, mitjançant els grups carboxilat i cetona i s'estabilitzarien entre elles per forces π - π stacking (Figura 35). Com a resultat de totes aquestes unions, el macrocomplex format quedaria estabilitzat i conseqüentment, s'aturaria el procés de replicació de l'ADN provocant la mort del bacteri.

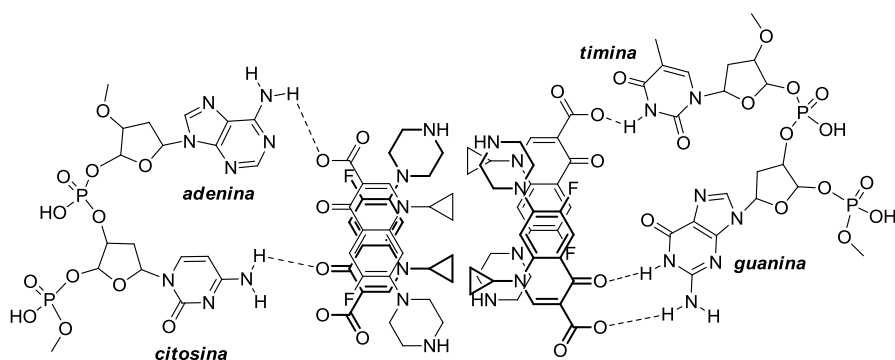


Figura 35. Representació orientativa de la unió de quatre molècules de Ciprofloxacina amb els parells de bases de la doble cadena de ADN. Les bases nitrogenades han estat escollides arbitràriament.

Per estudiar l'activitat dels complexos enfront l'enzim, es va realitzar un experiment que consistia en incubar una unitat de d'ADN-girasa de bacteri amb una mostra d'ADN superenrotllat (pBR322). Posteriorment s'hi adicionava una quantitat de producte (complex de reni o $[CpfH_2]Cl$) i es deixava incubant un temps determinat. Posteriorment s'atura la reacció i s'analitzen les mostres mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. L'ADN superenrotllat, com que es troba en una forma molt compacte, es desplaça a través del gel ràpidament i conseqüentment té un factor de retenció molt petit. Per contra, quan l'enzim interacciona amb l'ADN de bacteri el desenrotlla, augmentant el temps de retenció i fent aparèixer tota una sèrie de noves senyals que corresponen a les diferents formes en que podria trobar-se l'ADN desenrotllat.⁸¹ Aquest fenomen es pot veure clarament en la Figura 36, la qual correspon al test realitzat amb el clorhidrat de Ciprofloxacina. En la columna SC (*supercoiled*) trobem el ADN de bacteri superenrotllat, les columnes que contenen el símbol (+) són mostres d'ADN incubades amb presència de l'enzim. Així doncs, a la segona columna trobem els senyals corresponents a les diferents formes de l'ADN originades durant el procés de replicació. Les columnes

⁸¹ Black, M. T.; Stachyra, T.; Platel, D.; Girard, A. M.; Claudon, M.; Bruneau, J. M.; Miossec, C. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **2008**, 52, 3339.

restants consisteixen en mostres que contenen tant ADN com enzim i diferents concentracions de la substància a avaluar, en aquest cas clorhidrat de Ciprofloxacina (des de 1 fins a 250 μM). Pel que respecte a l'antibiòtic lliure, aquest té el comportament esperat a baixes concentracions (1 μM). En la Figura 36 es pot observar com la tercera columna mostra novament grans quantitats de l'ADN superenrotllat ja que l'activitat de l'ADN-Girasa es troba inhibida per l'antibiòtic.

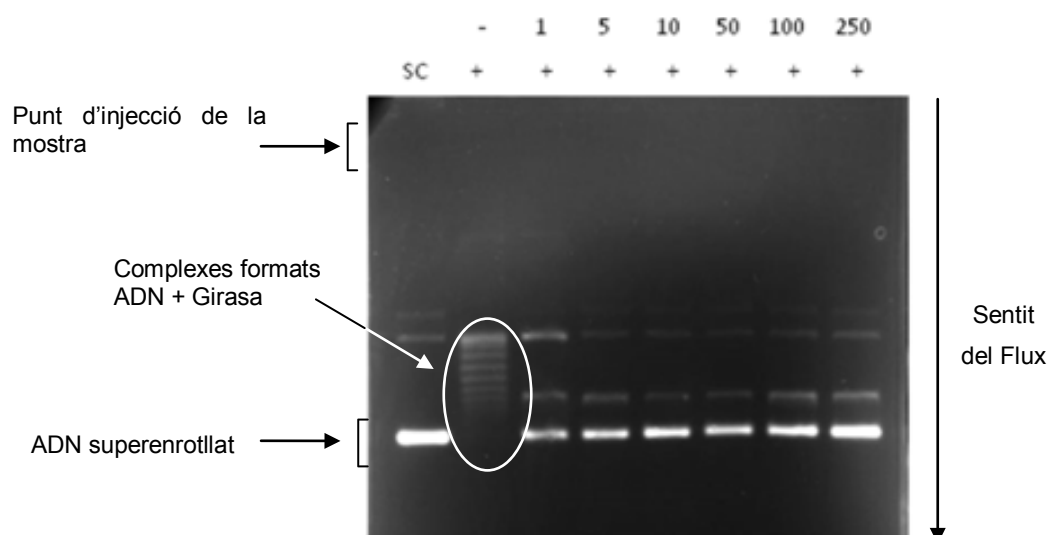


Figura 36. Electroforesi en gel d'agarosa de l'ADN superenrotllat (pBR322) tractat amb ADN-Girasa i diferents quantitats de $[\text{CpfH}_2]\text{Cl}$.

Aquest comportament és el esperat per la Ciprofloxacina ja que a molt baixes concentracions ja es capaç d'inhibir l'activitat de l'enzim i impedir que es formin les diferents espècies d'ADN desenrotllat (columna 2).

Si comparem els resultats obtinguts amb el clorhidrat de la Ciprofloxacina i cadascun dels complexos sintetitzats podem observar que el complex **1** (Figura 37) té un comportament molt semblant al de l'antibiòtic lliure. A baixes concentracions (1 μM), el compost **1** ja és capaç d'inhibir l'activitat de l'ADN-Girasa⁸² com en el cas anterior.

⁸² Patel, M. N.; Chhasatia, M. R.; Patel, S. H.; Bariya, H. S.; Thakkar, V. R. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 715.

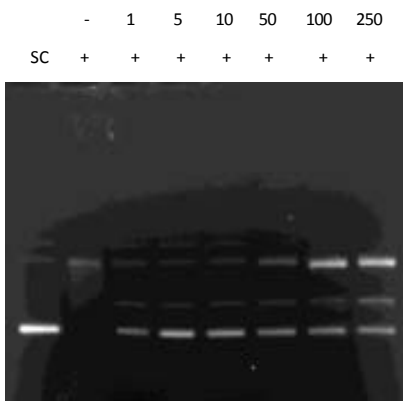


Figura 37. Electroforesi en gel d'agarosa de l'ADN superenrotllat (pBR322) tractat amb ADN-Girasa i diferents quantitats del complex 1.

La sorprenent similitud en els resultats de les proves realitzades amb el complex 1 i amb l'antibiòtic lliure fa sospitar que l'espècie que inhibeix l'ADN-Girasa sigui la mateixa. De ser així, també estaria d'acord amb els resultats obtinguts en l'apartat 2.4.1. d'aquest capítol on els diàmetres d'inhibició d'ambdues substàncies eren molt semblants.

D'altre banda, pel que respecte al complex 2, no es va observar una inhibició tant gran de l'activitat de l'enzim ja que cal augmentar la concentració del complex fins a 10 μ M (columna 5) per començar a veure un efecte clar en la disminució de l'activitat de l'ADN-Girasa (Figura 38). Com en la determinació dels diàmetres d'inhibició (apartat 2.4.1.), el complex 2 es va dissoldre prèviament en DMSO (darrera columna) per afavorir la seva solubilització. Per aquest motiu, es va haver d'avaluar l'afecta d'aquest en l'activitat de la ADN-Girasa. Com s'observa en la figura, el DMSO (darrera columna) no ocasiona una disminució en l'activitat de l'enzim.

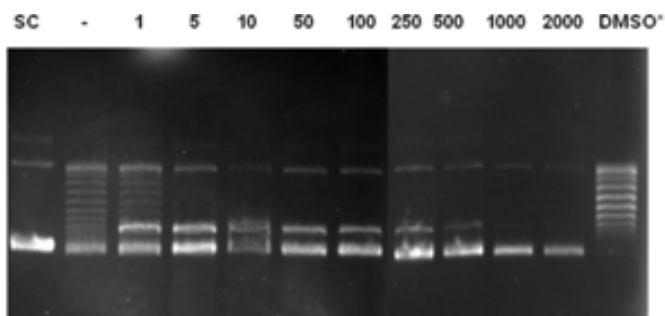


Figura 38. Electroforesi en gel d'agarosa de l'ADN superenrotllat (pBR322) tractat amb ADN-Girasa i diferents quantitats del complex 2.

Aquests resultats semblen indicar que la presència d'un metall unit fortament a l'antibiòtic afecta a la interacció de la d'aquest amb el par ADN/enzim. Aquest comportament és semblant al que presenten alguns dels complexos metàl·lics amb Ciprofloxacina publicats en la literatura.

3. CONCLUSIONS

S'ha realitzat la preparació del radiofàrmac de tecneci amb Ciprofloxacina fent servir una mostra enriquida amb el isòtop tecneci-99 i s'ha pogut determinar, mitjançant EM, el pes molecular i l'estequiometria del radiocompost. Amb aquesta informació s'ha pogut deduir tant el fragment metàl·lic del radionúclid com el nombre de Ciprofloxacines coordinades a aquest. Posteriorment, s'ha assajat diferents metodologies i precursors per tal de poder sintetitzar un complex de reni homòleg al radiofàrmac amb la màxima puresa possible. L'estudi espectroscòpic i espectrofotomètric d'aquest nou compost a permès establir que el tipus de coordinació del metall amb l'antibiòtic té lloc a través dels àtoms d'oxigen cetona i carboxilat, tal com es mostra en la figura 39.

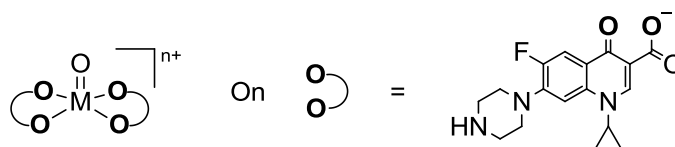


Figura 39. Estructura del complex metàl·lic $[MO(Cpf)_2]^{n+}$ ($M = Re, Tc$). La càrrega final del complex pot variar en funció de la protonació de l'amina secundària de l'antibiòtic.

D'altra banda, s'ha sintetitzat i caracteritzat pels mètodes espectroscòpics i espectromètrics habituals un nou complex de reni amb Ciprofloxacina que conté el fragment *fac*- $\{Re(CO)_3\}$, **2**. L'anàlisi de les dades obtingudes està d'acord amb el mateix tipus de coordinació (O-donador), observat en el complex **1** (Figura 40). S'ha assajat la síntesi d'un tercer complex on el fragment metàl·lic estaria enllaçat a la Ciprofloxacina per mitja d'un grup ditiocarbamat incorporat al nitrogen piperazínic. No obstant, la extremadament baixa solubilitat d'aquest compost ha impedit la seva caracterització.

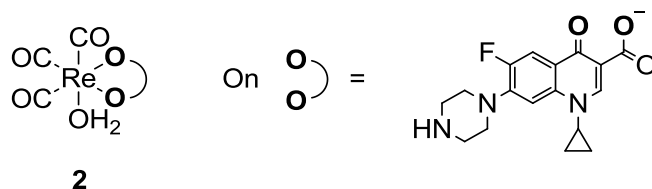


Figura 40. Estructura del complex metàl·lic *fac*-[Re(CO)₃(Cpf)(H₂O)].

L'anàlisi de l'activitat antibacteriana dels compostos **1** i **2**, així com l'estudi de la interacció d'aquest complexos amb l'ADN-Girasa, ha demostrat que les propietats antibiòtiques del complex **1**, són molt semblants a les del clorhidrat de la Ciprofloxacina. Per contra, el complex **2** mostra una activitat sensiblement inferior.

Aquest comportament es pot relacionar amb un caràcter més làbil del complex **1** respecte a **2**. Aquesta proposta esta fonamentada en fets experimentals com el comportament del compost **1** en solució (tendència a descomposar donant lloc a la precipitació del lligand lliure) i en algunes de les propietats del compost homòleg de tecneci. Així, es conegut que en presència de elevades concentracions de tartrat disminueix la concentració del complex [TcO(Cpf)₂]⁺.⁴⁸ A més a més, aquesta hipòtesis és coherent amb el comportament descrit per a altres complexos de tecneci (V) amb lligands O-donadors (tartrat, gluconat). Els quals són emprats en radiofarmàcia com a lligands d'intercanvi precisament pel seu caràcter làbil. La major estabilitat del complex **2** es pot justificar pel caràcter inert dels complexos octaèdrics de Re (I) amb configuració d⁶.

Aquestes característiques dels complexos **1** i **2** es poden relacionar amb les seves propietats antibacterianes. Així, el fet que el complex **1** tingui un comportament quasi idèntic al del antibiòtic lliure podria ser una conseqüència de la dissociació del complex. Aquest fet permetria als grups cetona i carboxilat interaccionar mitjançant ponts d'hidrogen amb les bases nitrogenades de la cadena d'ADN i inhibir l'activitat de l'ADN-Girasa. Aquest raonament pot també explicar algunes de les propietats radiofarmacèutiques del Tc-Ciprofloxacina. D'acord amb el que s'ha dit, el radiocompost podria: arribar al bacteri, travessar la membrana cel·lular i dissociar-se al interior del microorganisme, permeten la localització de la infecció. Aquesta proposta està d'acord amb un estudi microbiològic que va mostrar el marcatge de bacteris resistents a la Ciprofloxacina amb el radiofàrmac [TcO(Cpf)₂]⁺. Es conegut que el mecanisme de resistència consisteix en l'expulsió de l'antibiòtic després d'introduir-se en el bacteri. La

nostra proposta explicaria el marcatge dels bacteris resistents ja que, el metall quedaria atrapat en el medi intracel·lular del bacteri i marcaria la zona infectada.⁸³

Finalment, tot i que faria falta realitzar més experiments per comprovar aquesta proposta, la labilitat del enllaç Tc-O en el radiofàrmac també podria relacionar-se amb els fals positius i les imatges difoses que s'han observat en alguns assaigs clínics.³⁷ El radiofàrmac un cop introduït en el cos, si aquest no té una infecció es dissociarà en el torrent sanguini acumulant-se en àrees on el flux de sang sigui més baix. Un exemple clar de menor perfusió de sang es troba en els teixits inflamats.

⁸³ Sierra, J. M.; Rodríguez-Puig, D.; Soriano, A.; Mensa, J.; Piera, C.; Vila, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2691.

Capítol III

Síntesi de Radiofàrmacs de 2a generació
d'elevada activitat específica



1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1. Introducció

1.1.1. Radiofàrmacs de segona generació

Com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 1.3.1 del capítol I), els radiofàrmacs de tecneci-99m de segona generació són radiofàrmacs que contenen en la seva estructura una biomolècula unida covalentment. Aquesta biomolècula conté una sèrie d'àtoms o grups funcionals disposats d'una manera determinada en l'espai que permeten la interacció específica amb un receptor concret del cos (Figura 41).

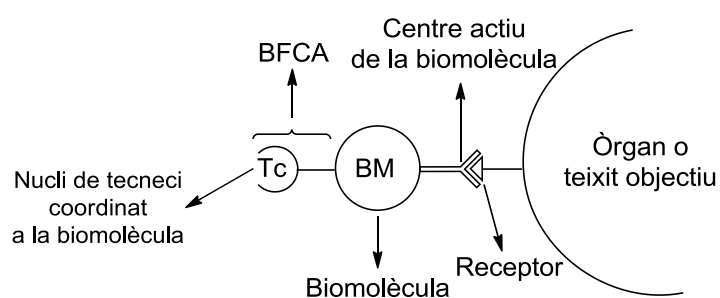


Figura 41. Representació esquemàtica del mecanisme d'actuació d'un radiofàrmac de segona generació de tecneci-99m. BM = biomolècula.

En una situació ideal, el radiofàrmac un cop introduït en el cos s'acumularà essencialment en les cèl·lules que continguin els corresponents receptors i això es traduirà en una menor distribució del radiofàrmac en altres teixits o òrgans, permeten

obtenir imatges més específiques per un grup concret de cèl·lules. A mode d'exemple en la Figura 42 es mostra la imatge d'un pacient al qual es va diagnosticar parkinson mitjançant una gammagrafia SPECT cerebral amb el radiofàrmac de segona generació ^{99m}Tc -TRODAT, el qual interacciona específicament amb els receptors de dopamina.⁸⁴

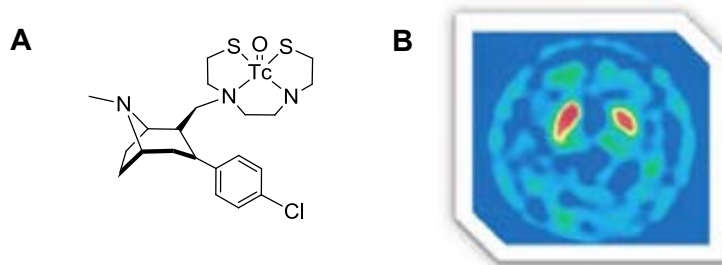


Figura 42. (A) Estructura del radiofàrmac ^{99m}Tc -TRODAT, (B) gammagrafia SPECT cerebral.

Un dels problemes més importants que presenten aquests nous tipus de radiofàrmacs, està lligat al mètode de preparació que s'utilitza actualment, el qual no és més que una extrapolació del emprat en els radiofàrmacs essencials, on l'àtom de tecneci és reduït i complexat per un lligand. En els radiofàrmacs essencials, els lligands lliures que no han quedat units al tecneci no interfereixen en la captació de les molècules marcades per part dels òrgans o teixits, ja que químicament el complex és molt diferent del lligand i conseqüentment el radiofàrmac té una biodistribució i acumulació completament diferent a la del lligand lliure.

Per contra, en els radiofàrmacs de segona generació tant el lligand marcat (radionúclid + biomolècula) com el lligand lliure (biomolècula) presenten una interacció igual o comparable amb el receptor diana del cos, ja que el lligand lliure també conté la biomolècula. Per tant, un cop preparats i injectats en el pacient els dos compostos competiran pel receptor (Figura 43) originant una disminució de l'activitat específica en aquest. Cal tenir present que en la solució injectable la relació $[\text{}^{99m}\text{Tc}]/[\text{Lligand}]$ és de l'ordre de 10^{-3} , ja que és imprescindible que la concentració de lligand ($\approx 10^{-4}$ M) es trobi varis ordres de magnitud per sobre de la del radionúclid ($\approx 10^{-7}$ M). La concentració de tecneci ve fixada pel generador i la del lligand amb la biomolècula no pot ser més baixa per tal d'assegurar que la reacció de marcatge sigui completa i no quedi tecneci lliure en solució. El metall lliure tindria una distribució i acumulació diferent al radiofàrmac i

⁸⁴ Wen-Sheng, H.; Yung-Hsiao, C.; Jiann-Chyun, L.; Yuan-Hwa, C.; Cheng-Yi, C.; Ren-Shyan, L. *J Nucl. Med.* **2003**, *44*, 999.

afectaria tant a la qualitat de les imatges com a la interpretació per part del personal mèdic especialitzat.

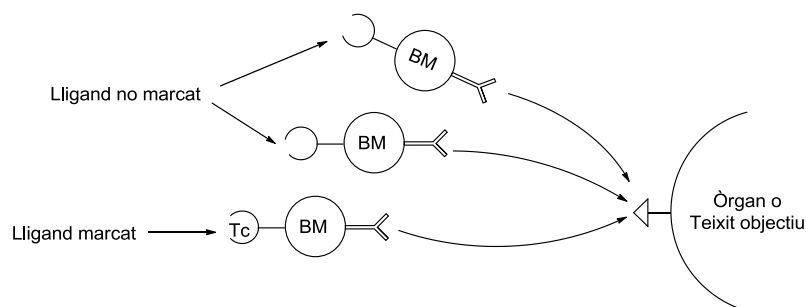


Figura 43. Representació esquemàtica de la competència entre molècules marcades i no marcades i el seu receptor diana.

Així doncs, en aquest capítol es parlarà d'un nou mètode de preparació de radiofàrmacs de segona generació que pretén millorar la relació entre la concentració de biomolècula marcada i no marcada, la qual en els millors dels casos es de l'ordre de 10^{-3} . Aquest nou mètode no es basarà en l'ús de tècniques de separació (HPLC,...) per disminuir la quantitat de lligand no marcat en els preparats radiofarmacèutics. Emprar tècniques cromatogràfiques no es viable en la pràctica clínica actual, ja que en els hospitals no es disposa dels aparells adequats i, a més a més, no és compatible amb la metodologia basada en la utilització de kits de preparació.

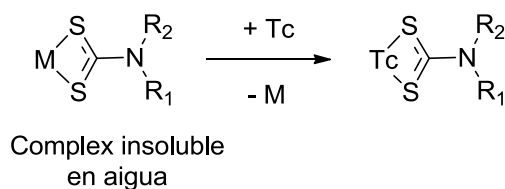
1.1.2. Disseny de la nova metodologia de preparació de radiofàrmacs

La nova metodologia de preparació de radiofàrmacs de segona generació, que s'ha desenvolupat en la present tesi doctoral, amb la qual es pretén afavorir la problemàtica associada a la diferència de concentracions entre molècula marcada i no marcada, consisteix en portar a terme la reacció de preparació dels radiocompostos a partir d'una molècula funcionalitzada que sigui poc soluble en aigua. La idea és que, a mesura que la biomolècula funcionalitzada es vagi solubilitzant en aigua, aquesta reaccionarà amb el tecneci en solució, i un cop acabada la reacció s'eliminarà l'excés no reaccionat fàcilment per microfiltració o centrifugació. L'estratègia que es farà servir per disminuir la solubilitat de la biomolècula consistirà en la formació d'un complex metàl·lic poc soluble en aigua. Amb aquest nou mètode, la reacció de marcatge de la biomolècula amb el tecneci tindrà lloc a través d'una reacció de transmetal·lació. És important

destacar que aquest tipus de reacció ja es fa servir en la preparació del radiofàrmac de tecneci ^{99m}Tc -Sestamibi (Cardiolite®),⁸⁵ el qual és emprat per l'obtenció d'imatges del cor. No obstant això, la reacció de transmetal·lació té una finalitat completament diferent a la que es proposa en el present treball de tesi doctoral, ja que simplement és una eina per a obtenir un millor rendiment en la preparació.

1.1.2.1. Reacció de transmetal·lació

La reacció de transmetal·lació⁸⁶ (Esquema 14) és un tipus de reacció emprada en química organometàl·lica, consistent en el intercanvi d'un o més lligands entre dos centres metàl·lics. La diferència d'estabilitat en els enllaços entre els metalls i els àtoms que intervenen en la complexació és el que origina el desplaçament de la reacció cap a la formació de productes.



Esquema 14. Síntesi de radiofàrmacs de ^{99m}Tc a través d'una reacció de transmetal·lació d'un complex metall-ditiocarbamat.

Per tal d'assolir aquest objectiu es va dissenyar un BFCA basat en l'àcid Isonipecòtic, el qual és un compost simètric i fàcilment derivatitzable. A més a més, és un compost que presenta una baixa toxicitat i que ja ha estat emprat en la preparació i estudi de diferents fàrmacs.⁸⁷

⁸⁵ Alberto, R. *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol 5, chapter 5.2, (McCleverty, J. A.; Meyer, T. J., editors), Elsevier, **2003**.

⁸⁶ Stahl, L.; Smoliakova, I. P. *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol 3, Chapter 2, (Crabtree, R. H.; Mingos, D. M. P, editors), Elsevier, **2007**.

⁸⁷ Boyle, E. M.; Kovacich, J. C.; Norbert, F.; Canty, T. O. Jr.; Morgan, E.; Pohlman, T. H.; Verrier, E. D. Inhibition of NF- κ B mediated tissue injury using dithiocarbamate derivatives. Patent WO 2000/000192, Jan 6, 2000.

1.1.2.2. Àcid Isonipecòtic

L'àcid Isonipecòtic (Figura 44), és un compost heterocíclic que consisteix en un anell de piperidina amb un grup carboxílic en la posició 4. Aquest compost, a més de ser fàcilment assequible (cost baix), conté dos grups funcionals (amina i àcid carboxílic) que permeten la seva derivatització.

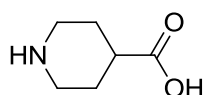
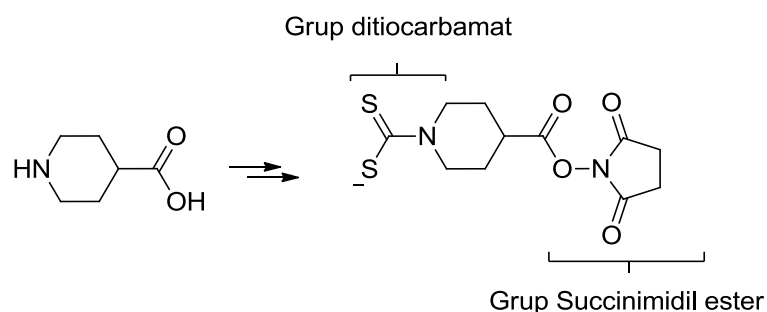


Figura 44. Estructura de l'àcid Isonipecòtic.

Mitjançant reaccions descrites en la bibliografia (Esquema 15) podem incorporar a l'estructura base un grup ditiocarbamat⁸⁸ i un grup *N*-hidroxisuccinimidil èster.^{89,90} Aquest últim ens permetrà realitzar reaccions d'acoblament amb amines a fi de poder unir-hi diferents biomolècules.



Esquema 15. Derivatització de l'àcid Isonipecòtic per l'obtenció d'un BFCA bidentat.

Els ditiocarbamats (DTCs) són agents quelants bidentats basats en sofre. La seva capacitat per complexar metalls ha estat avaluada en diversos estudis,⁹¹ i en els darrers anys el nombre de publicacions on apareixen aquests tipus de lligands amb els metalls

⁸⁸ Jones, M. M.; Singh, P. K.; Jones, S. G.; Mukundan, C. R.; Banton J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 27.

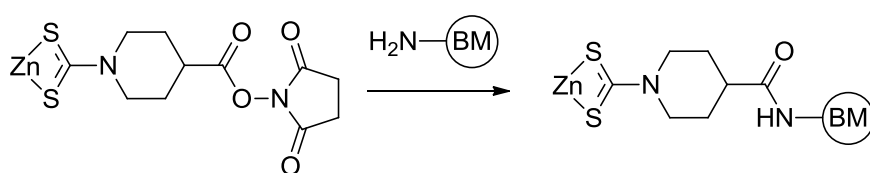
⁸⁹ Arterburn, J. B.; Rao K. V.; Goreham, D. M.; Valenzuela, M. V.; Holguin, M. S.; Hall, K. A.; Ott, K. C.; Bryan, J. C. *Organometallics* **2000**, 19, 1789.

⁹⁰ Eisenhut, M.; Lehmann, W. D.; Becker, W.; Behr, T.; Elser, H.; Strittmatter, W.; SteinstrÄasser, A.; Baum, R. P.; Valerius, T.; Repp, R.; Deo, Y. *J. Nucl. Med.* **1996**, 37, 362.

⁹¹ Haiduc, I. *Comprehensive Coordination Chemistry II*; McCleverty, J. A.; Meyer, T. J. Elsevier: Oxford, 2004. Vol. 1 Chapter 1.15.6.

reni o tecneci⁹² ha augmentat notablement. Això és degut a que presenten una bona estabilitat en condicions biològiques.⁹³ A més a més, es tracte d'un grup funcional capaç de realitzar reaccions de transmetal·lació. Concretament, els ditiocarbamats de zinc, els quals estan descrits en la bibliografia com poc solubles en aigua, exhibeixen aquest tipus de reacció.⁹⁴

Amb aquestes propietats, la nova molècula podria actuar com un "synton" fent possible la preparació d'una gran varietat de nous radiofàrmacs de segona generació gràcies al grup *N*-hidroxisuccinimidil èster que permet l'acoblament amb biomolècules que continguin en la seva estructura un grup funcional amina (Esquema 16).



Esquema 16. Reacció d'acoblament peptídica del derivat de Zn.

Per resumir, amb el nou BFCA dissenyat, seria possible sintetitzar tota una sèrie de radiofàrmacs de tecneci de segona generació, mitjançant una reacció de transmetal·lació. A més a més, tractant-se d'un compost poc soluble en aigua, ens permetria eliminar les molècules no marcades per mètodes senzills abans comentats com són la microfiltració o la centrifugació (Figura 45), d'aquesta manera es podria millorar la relació entre biomolècula marcada/biomolècula no marcada.

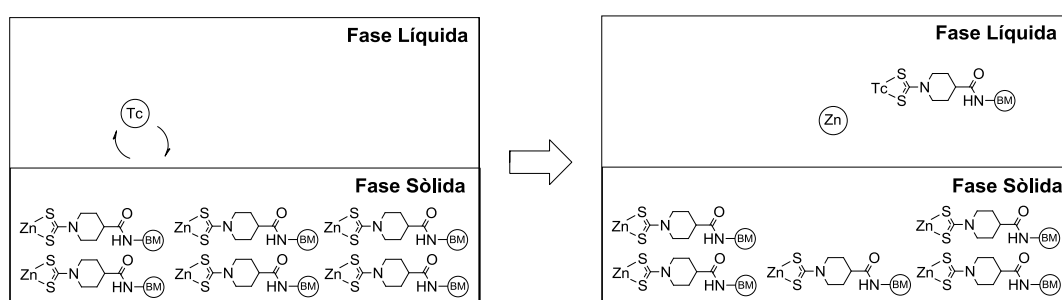


Figura 45. Representació esquemàtica de la reacció de transmetal·lació amb el complex de Zn insoluble.

⁹² Lin, X.; Jin, Z.; Ren, J.; Pang, Y.; Zhang, W.; Huo, J.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2012**, *79*, 239.

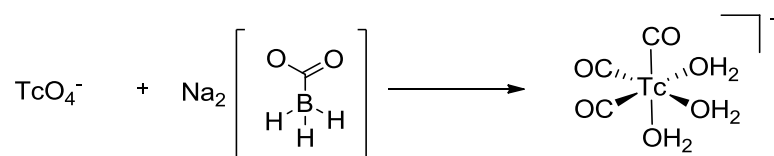
⁹³ Kim, Y. S.; He, Z.; Hsieh, W. Y.; Liu, S. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 473.

⁹⁴ Sokolov M.; Imoto, H.; Saito H. *Inorg. Chem. Comm.* **1999**, *2*, 422.

1.1.3. El fragment $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}$

A més del fragment $\{^{99m}\text{TcO}^{3+}\}$, actualment el més emprat en Medicina Nuclear d'imatge amb radiofàrmacs de tecneci-99m, existeixen altres que recentment han despertat un gran interès. És el cas del $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}$ que es pot generar fàcilment a partir del complex organometàl·lic $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$.

Els radiofàrmacs sintetitzats amb aquest fragment (actualment en fase experimental) resulten molt atractius ja que al tractar-se d'un fragment petit i molt lipofílic té una gran capacitat de travessar les membranes cel·lulars del organisme. Com que l'àtom de tecneci és troba en estat d'oxidació +1, i per tant, amb configuració electrònica d^6 , els complexos metàl·lics solen ser molt estables tant *in vitro* com *in vivo*. Aquest conjunt de propietats han fet que la química del tecneci (I) amb carbonils sigui el camp de recerca més estudiat en l'actualitat dins de la química radiofarmacèutica de tecneci. Un fet clau en aquesta tendència va ser la posada a punt d'un kit⁹⁵ per l'empresa Mallinckrodt (actualment Covidien) que permet preparar el complex $fac\text{-}[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ en aigua a partir de les solucions de TcO_4^- obtingudes dels generadors de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. L'efectivitat de la reacció que té lloc en un kit, recau en l'ús d'un boranocarbonat com a reductor i també com a generador de monòxid de carboni, fent que la reacció sigui quantitativa i per damunt de tot perfectament reproducible (Esquema 17).



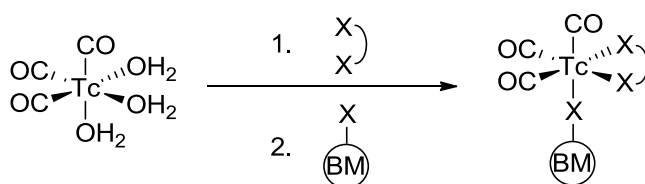
Esquema 17. Reacció que té lloc en el KIT ISOLINK®.

El complex metàl·lic $fac\text{-}[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ conté tres lligands carbonil units fortament a l'àtom de tecneci i tres lligands aquo fàcilment bescanviables per altres molècules. Els lligands emprats per unir la biomolècula a aquest fragment organometàl·lic poden ser tant mono-, bi-, o tridentats. A continuació s'exposa de manera resumida els avantatges i els inconvenients de cadascun d'ells:

⁹⁵ Alberto, R.; Schibli, R. Method for the Preparation of Facial Metal Tricarbonyl Compounds and their use in the Labelling of Biologically Active Substrates. Patent WO/1998/048848, Nov, 1998.

1.1.3.1. Lligands monodentats⁹⁶

Aquests primers tipus de lligands coordinen eficientment en el fragment tricarbònic però, tenen el principal inconvenient que no és possible controlar el número de lligands que coordinaran alhora, la qual cosa pot conduir a mescles de productes. Davant la possibilitat que més d'una biomolècula coordini al fragment metàl·lic, aquest tipus de lligands solen estar acompanyats d'un altre lligand bidentat. Aquest tipus de procediment rep el nom d'aproximació [2+1_B] (Esquema 18). El lligand bidentat emprat sol ser mono-aniónic i no ha de poder actuar com a lligand monodentat. Els principals tipus de lligands monodentats que s'utilitzen són: isonitrils, fosfines, amines aromàtiques, entre altres.



Esquema 18. Representació esquemàtica de l'aproximació [2+1_B] on X pot ser qualsevol àtom electrodonador.

1.1.3.2. Lligands bidentats⁹⁷

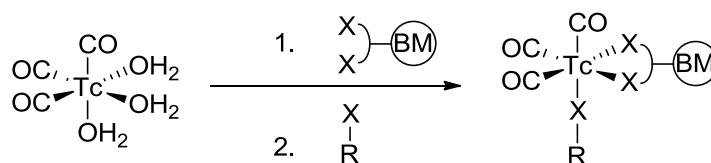
Aquest tipus de lligands tenen una molt bona estabilitat termodinàmica i, per tant, no descomponen en condicions biològiques. L'esfera de coordinació queda completa per la presència dels anions clorur de la solució salina (en el cas dels lligands bidentat neutres) o d'una molècula d'aigua (lligand bidentat monoaniònic com els ditiocarbamats). Tot i que, la competència per part d'altres molècules que continguin àtoms donadors com les proteïnes del sèrum sanguini, obliga a tancar l'esfera de coordinació amb un segon lligand, en aquest cas monodentat. És per aquest motiu, que l'ús d'aquest tipus de lligands també requereix com en el cas anterior d'una segona molècula, aquest procediment és el conegut com aproximació [2_B+1]⁹⁸ (Esquema 19). Aquesta ha estat la metodologia emprada en la present tesi doctoral. Un factor molt important tant en els

⁹⁶ Mundwiler, S.; Kündig, M.; Ortner, K. Alberto, R. *Dalton trans* **2004**, 1320.

⁹⁷ Egli, A.; Alberto, R.; Tannahill, L.; Schibli, R.; Schubiger, P. A. *J. Nucl. Med.* **1990**, 40, 1913.

⁹⁸ Gorshkov, N. I.; Schibli, R.; Schubiger, A. P.; Lumpov, A. A.; Miroslavov, A. E.; Suglobov, D. N. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4757.

l·ligands bi- com els monodentats és que, l'ús d'un segon l·ligand auxiliar per tancar la coordinació permet modificar les propietats farmacocinètiques del radiocompost fàcilment. D'aquesta manera no cal variar el BFCA, fet que obligaria a dissenyar una nova ruta sintètica per aquest.

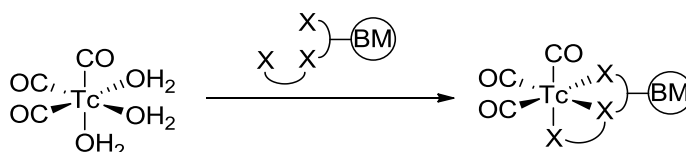


Esquema 19. Aproximació $[2_B+1]$ on X pot ser qualsevol àtom electro-donador i R un grup qualsevol.

1.1.3.3. L·ligands tridentats⁹⁹

El principal avantatge d'aquests tipus de l·ligands és la seva gran estabilitat termodinàmica, superior a la dels altres l·ligands explicats anteriorment. No obstant, com que els complexos obtinguts amb aquest tipus de l·ligand no requereixen d'una altre molècula per tancar l'esfera de coordinació del metall (Esquema 20), impossibilita l'ús d'un segon l·ligand com a modulador de les propietats farmacocinètiques del complex.

A més a més, la síntesi d'aquest tipus de l·ligands sol ser molt més complicada, obligant a l'ús de diferents tipus de grups protectors en els àtoms implicats posteriorment en la coordinació del metall. Això fa que el nombre de passos de preparació sigui molt superior al dels l·ligands mono- i bidentats.



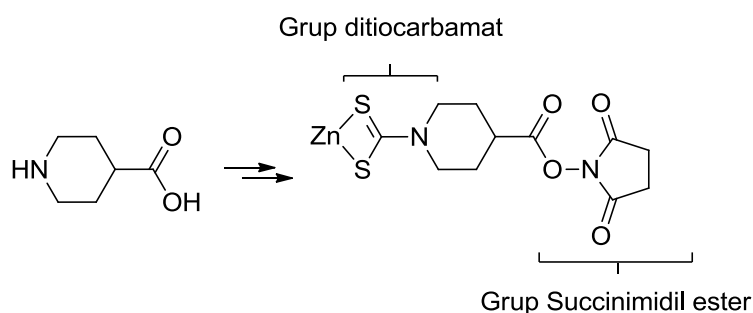
Esquema 20. Síntesi d'un compost *fac*- $[Tc(L^3)(CO)_3]$.

⁹⁹ Schibli, R.; La Bella, R.; Alberto, R.; Garcia-Carayoa, E.; Ortner, K.; Abram, U.; Schubiger, P. A.; *Bioconjugated* **2000**, 11, 345.

1.2. Objectius

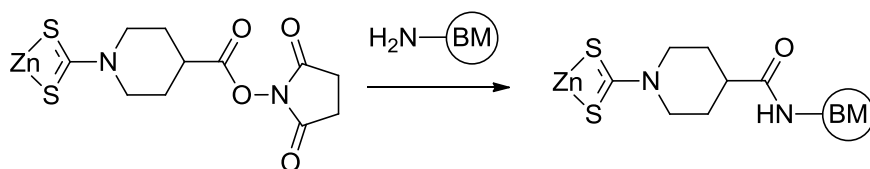
El principal objectiu plantejat en aquest capítol és el disseny d'un nou mètode de preparació de radiofàrmacs de segona generació que millori la relació existent entre [biomolècula marcada]/[biomolècula no marcada], la qual en el millor dels casos es troba del ordre de 10^{-3} . La nova metodologia pretén poder ser implementada en hospitals i, per aquest motiu, estarà basada en mètodes de preparació simples (escalfament, centrifugació, filtració, etc.). A ser possible, hauria de ser compatible amb els procediments emprats avui dia en els hospitals (kits de preparació). Per assolir aquest objectiu ens varem plantejar els següents passos:

(A) Dissenyar un nou complex metàl·lic de zinc (II) que sigui derivatitzable i permeti l'acoblament de diferents biomolècules a través d'un grup funcional reactiu (Esquema 21).



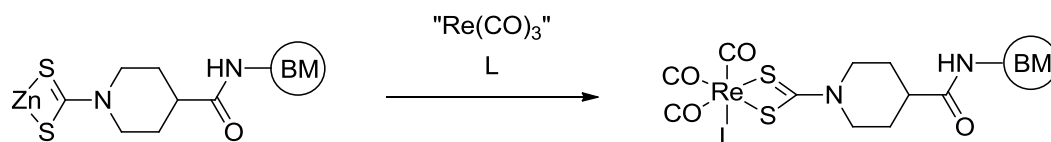
Esquema 21. Derivatització de l'àcid Isonipecòtic per l'obtenció d'un BFCA bidentat.

(B) Provar la reacció de bioconjugació amb diferents biomolècules a través del grup funcional altament reactiu incorporat anteriorment (Esquema 22). Ajustar, si cal, les condicions de síntesi per a poder obtenir reaccions quantitatives.



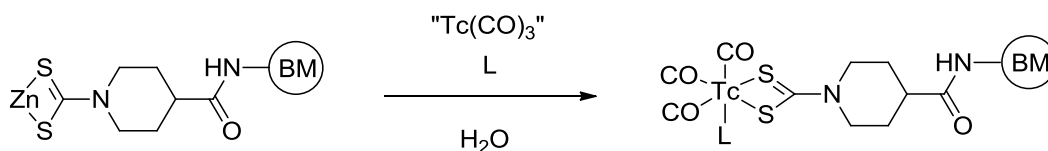
Esquema 22. Reacció d'acoblament peptídica del derivat de Zn.

(C) Sintetitzar i caracteritzar nous complexos de reni carbonil a través d'una reacció de transmetal·lació per posteriorment emprar-los en la caracterització dels complexos homòlegs de tecneci-99m (Esquema 23).



Esquema 23. Reacció de transmetal·lació del derivat de zinc i el fragment reni carbonil. Aproximació [2_B+1]

(D) Provar la reacció de transmetal·lació amb el precursor *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ en condicions de radiofarmàcia (Esquema 24) i ajustar les variables per a la preparació de radiofàrmacs de segona generació (temps de preparació, puresa radioquímica > 95%, etc.). Finalment estudiar *in vitro* la viabilitat d'aquest nous complexos de tecneci.



Esquema 24. Reacció de transmetal·lació del derivat de zinc i el fragment tecneci-99m carbonil. Aproximació [2_B+1]

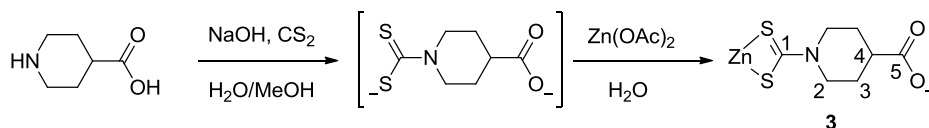
2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Abans de començar amb la discussió dels resultats obtinguts en aquesta part de la present tesi doctoral, és important comentar que per tal de simplificar els dibuixos de les estructures dels complexos de zinc, només es representarà un dels dos lligands tot i ser en tots els casos complexos metàl·lics amb estequiometria M(Lligand)₂.

Tots i cadascun dels complexos de zinc i reni que comprenen aquest capítol del present treball han estat caracteritzats mitjançant les tècniques espectroscòpiques de ressonància magnètica nuclear, espectrometria de masses, infraroig i anàlisi elemental. La tècnica de difracció de raig X en monocristall ha estat emprada només en els casos on s'han obtingut cristalls de suficient qualitat.

2.1. Síntesi i caracterització dels complexos de zinc (II)

2.1.1. Síntesi i caracterització del complex de zinc (II) ditiocarbamat de l'àcid Isonipecòtic, 3



Esquema 25. Preparació del complex 3.

La síntesi del complex de zinc amb l'àcid Isonipecòtic es duu a terme en dos passos successius. El primer consisteix en la reacció entre l'àcid Isonipecòtic en medi bàsic i disulfur de carboni per formar el corresponent ditiocarbamat. El procediment emprat és molt similar al descrit en la bibliografia¹⁰⁰ per la preparació del ditiocarbamat de l'àcid Isonipecòtic. L'única diferència significativa és la modificació de la composició del dissolvent a fi d'afavorir el posterior aïllament del complex de zinc. Per simplificar el procediment experimental, la reacció entre el ditiocarbamat format i la sal metàl·lica de zinc es va duu a terme *in situ*. És important destacar que la velocitat d'addició de la solució que conté el metall sobre el ditiocarbamat ha de ser molt lenta per evitar una precipitació ràpida del complex. En deixar refredar la mescla resultant, és possible l'obtenció del producte amb un elevat grau de puresa i en forma cristal·lina. Tot i això, en assecar el producte a baixa pressió s'originava una pèrdua de la cristal·linitat, convertint-se en una pols blanca. Aquest fet repercutia lleugerament en la solubilitat del producte final però no implicava canvis rellevants en la seva reactivitat.

La formació del grup ditiocarbamat i la seva complexació amb zinc és confirmada amb l'espectre de ¹³C{¹H}-RMN, on es pot observar un nou senyal a $\delta \approx 202$ corresponent a l'àtom de carboni C-1 del grup ditiocarbamat. La resta de senyals del compost no presenten canvis importants respecte de l'àcid Isonipecòtic.

¹⁰⁰ Jones, M. M.; Singh, P. K.; Jones, S. G.; Mukundan, C. R.; Banton J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 27.

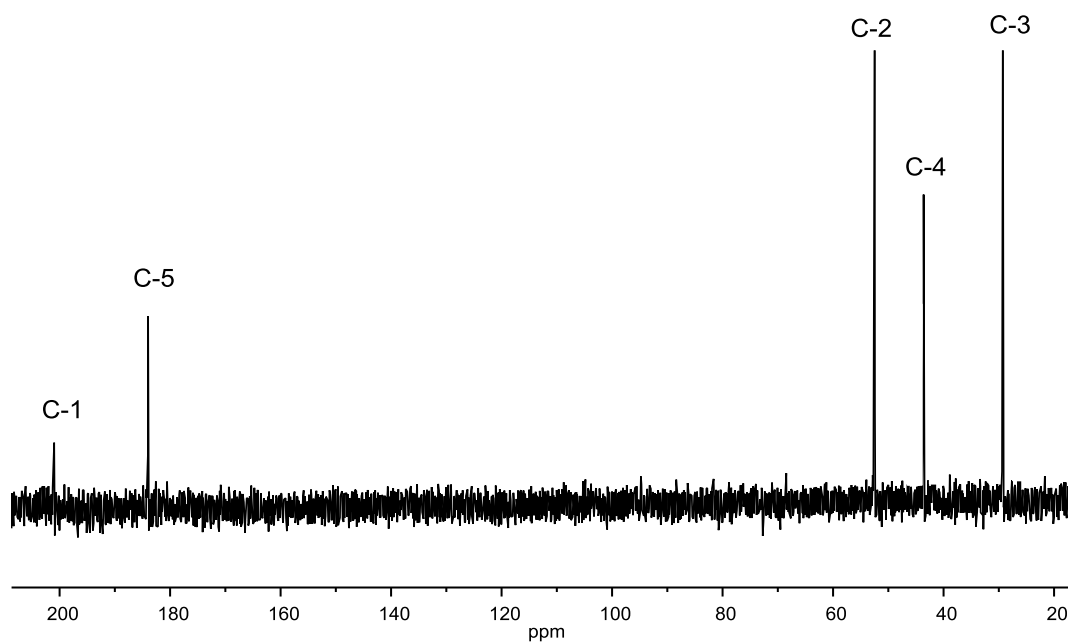


Figura 46. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en D_2O del complex 3.

L'espectre d'infraroig mostra una banda intensa a 1493 cm^{-1} característica d'un grup ditiocarbamat bidentat enllaçat a metall¹⁰¹⁻¹⁰³ i està d'acord amb la coordinació proposada.

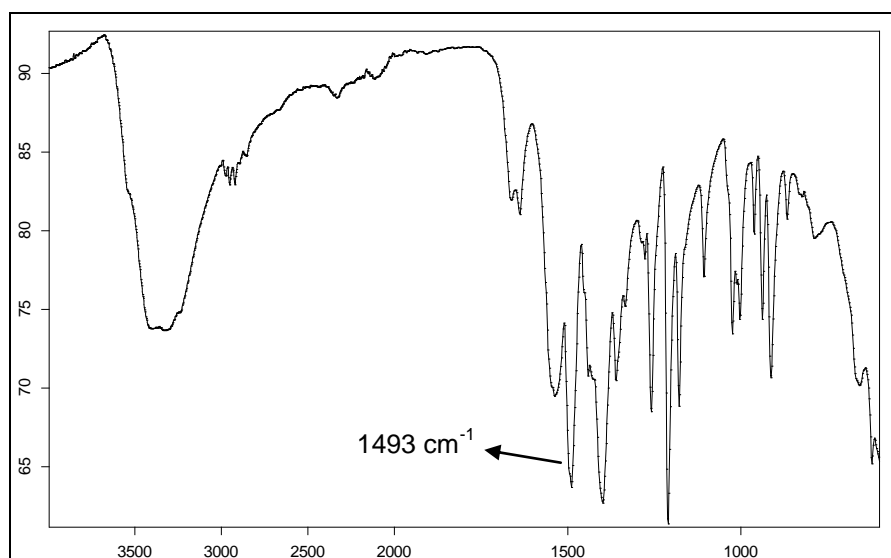


Figura 47. Espectre IR del complex 3.

¹⁰¹ Aravamundan, G.; Brown, D. H.; Venkappayya, D. *J. Chem. Soc.(A)* **1971**, 2744.

¹⁰² Van Gaal, H. L. M.; Diesveld, J. W.; Pijpers, F. W.; Van Der Linden, J. G. M. *Inorg. Chem.* **1979**, 18, 3251.

¹⁰³ Prakasam, B. A.; Ramalingam, K.; Bocelli, G.; Cantoni, A. *Polyhedron* **2007**, 26, 448.

Arribats aquest punt, i abans de comentar l'espectre $^1\text{H-RMN}$, és important remarcar que degut a que la molècula no és plana trobem que els protons units a un mateix àtom de carboni són diastereotòpics¹⁰⁴ i, per tant, tenen desplaçament químic diferent. Conseqüentment, en l'espectre de protó s'observen els senyals dels protons axials i equatorials de l'anell. Així doncs, en l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ del compost **3** (Figura 48) podem observar un senyal a $\delta \approx 4.9$ i un altre senyal a $\delta \approx 3.3$ que corresponen als protons equatorials i axials respectivament, dels grups CH_2 més propers a l'àtom de nitrogen de l'anell. Aquests protons es troben desplaçats cap a camps més baixos per la presència del grup ditiocarbamat. Com en el cas de l'espectre de carboni la resta de senyals no presenten canvis important respecte de l'àcid Isonipeccòtic.

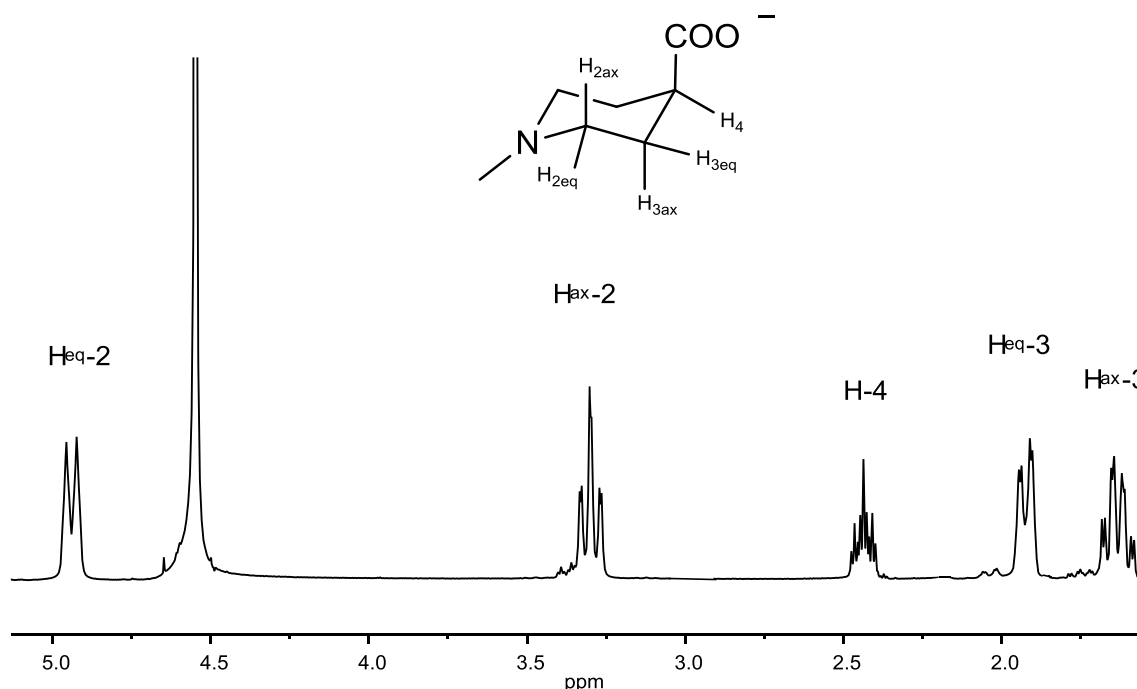


Figura 48. Espectre de $^1\text{H-RMN}$ en D_2O del complex **3**.

L'obtenció de monocristalls va permetre l'estudi de **3** mitjançant les tècniques de **difracció de raig X** i la confirmació de l'estructura del compost, el qual va resultar ser un complex dimèric de zinc (Figura 49). Aquest tipus d'estructura pentacoordinada és molt freqüent en els ditiocarbamats de zinc,^{105,106} els quals presenten quatre distàncies

¹⁰⁴ Mora, A. J.; Delgado, G.; Ramírez, B. M.; Rincón, L.; Almeida, R.; Cuervo, J.; Bahsas, A. *Journal of Molecular Structure*, **2002**, 615, 201.

¹⁰⁵ Bonamico, M.; Muzzoni, G.; Vaciago, A.; Zambonelli, L. *Acta Cryst.* **1965**, 19, 898.

¹⁰⁶ Myamae, H.; Ito, M.; Iwasaki, H. *Acta Cryst.* **1979**, B35, 1480.

d'enllaç molt semblants {Zn-S₂₁ = 2.3433(5) Å, Zn-S₁₂ = 2.3457(6) Å, Zn-S₂₂ = 2.3972(5) Å, Zn-S₁₁ = 2.4780(5) Å}; mentre una d'elles és sensiblement més llarga {Zn-S₂₂ = 2.8162(5) Å}. Atès que la majoria de geometries pentacoordinades solen ser intermèdies entre bipiràmide trigonal (Bpt) i piràmide de base quadrada (Pbq), és pot definir un paràmetre (τ)¹⁰⁷ que permet calcular quin és el percentatge de cadascuna de les geometries en el complex. Aquest paràmetre es calcula mitjançant la fórmula $\tau=(\alpha-\beta)/60$ on α i β són els angles majors de la base SZnS i $\alpha>\beta$. En el cas d'una piràmide de base quadrada trobem que $\alpha = \beta = 180^\circ$ per tant $\tau = 0$. D'altra banda, $\tau = 1$ quan es tracte d'una bipiràmide trigonal ja que els valor dels angles són $\alpha = 180^\circ$ i $\beta = 120^\circ$. El valor de τ calculat per al complex **3** és de 0.543, això vol dir que la contribució de cadascuna de les geometries al compost és de bpt = 54% i pbq = 46%. La semblança en els dos percentatge permet afirmar que la geometria que presenta el metall és intermèdia entre bipiràmide trigonal i piràmide de base quadrada.

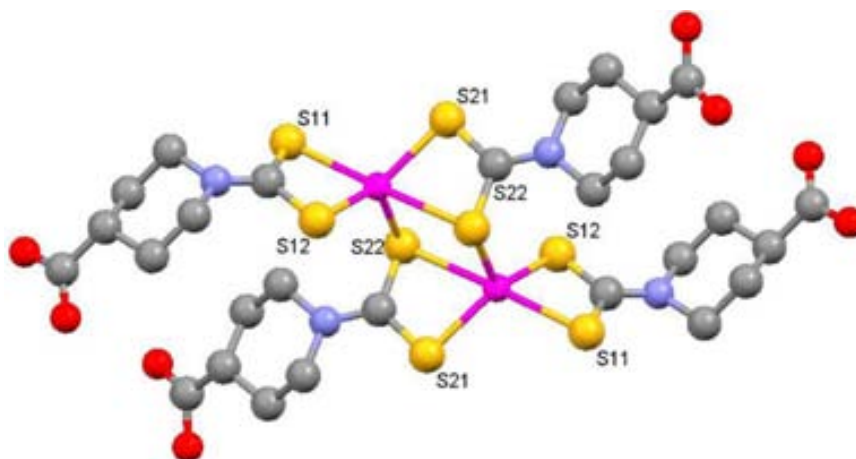


Figura 49. Estructura cristal·lina del anió $[Zn_2(C_7H_9O_2S_2)_4]^{4-}$ del compost **3**. Per a major claredat no es representen els àtoms d'hidrogen.

Cadascun dels complexos dinuclears de zinc es troben units per enllaços O...Na formant una xarxa tridimensional. En la Figura 50 es pot observar la formació dels ponts constituïts per àtoms de sodi amb coordinació octaèdrica. Els grups carboxilats del complex aniónic aparentment lliures en el dibuix participen també en la formació d'altres ponts creant una xarxa tridimensional.

¹⁰⁷ Addison, A. W.; Rao, T, N J. *Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 1349.

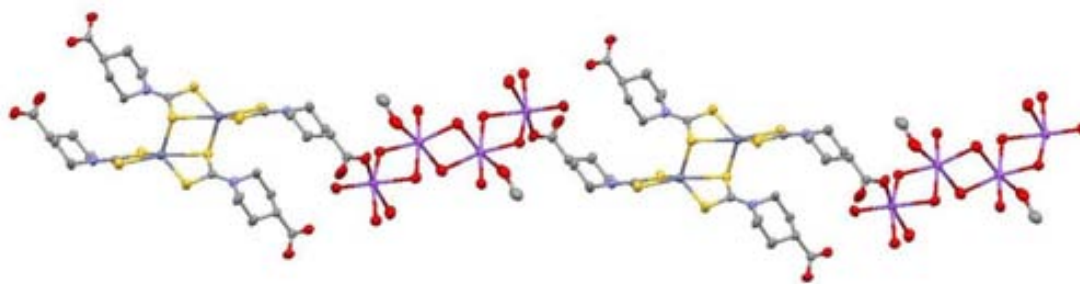
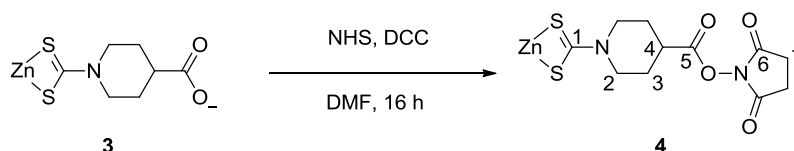


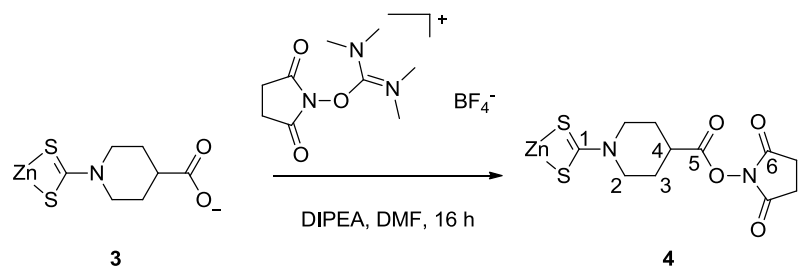
Figura 50. Vista parcial de la cadena formada entre el complex aniónic dinuclear de zinc (blau) i els àtoms de Na (lila).

2.1.2. Síntesi i caracterització del complex de zinc (II) ditiocarbamat de l'àcid Isonipecòtic amb el fragment Succinimidil èster



Esquema 26. Preparació del mitjançant la combinació de reactius NHS i DCC del complex 4.

El primer mètode assajat per a l'obtenció d'un grup èster activat va consistir en la combinació dels reactius *N*-hidroxisuccinimida (NHS) i *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en el si de dimetilformamida anhidre (Esquema 26). Aquests tipus de reaccions es duen a terme habitualment a pH baix fet que resultava un inconvenient degut a la descomposició del grup ditiocarbamat en medis àcids. Per aquest motiu, es va assajar la reacció en unes condicions de pH més suaus que, tot i permetre l'obtenció del producte desitjat, els rendiments no eren quantitius. Aquest fet comportava l'ús de tècniques de purificació del compost les quals resultaven tedioses i ineficients per la baixa solubilitat del complex 4 en la majoria dels dissolvents més comuns. Per aquest motiu, es va decidir canviar d'estratègia i emprar com agent d'acoblament el reactiu *N,N,N,N*-Tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uroni tetrafluoroborat (TSTU).



Esquema 27. Preparació del mitjançant l'agent d'acoblament peptídic TSTU del complex **4**.

Aquest reactiu va permetre incorporar el fragment desitjat amb bons rendiments de reacció (reacció pràcticament quantitativa) i permet evitar l'ús de condicions àcides. La síntesi es va dur a terme a temperatura ambient i en presència d'una base impedida no nucleòfila (diisopropiletilamina, DIPEA). Novament el dissolvent escollit va ser DMF anhidre. L'ús de DMF com a dissolvent dificultava l'aïllament del producte desitjat pur ja que aquest dissolvent té un punt d'ebullició alt i, per tant, això fa que no sigui possible eliminar-lo fàcilment mitjançant l'evaporació a baixa pressió. A més a més, la baixa solubilitat del compost **4** tampoc permet l'extracció d'aquest en dissolvents orgànics per eliminar la DMF. Per aquest motiu, i aprofitant la baixa solubilitat del complex **4**, es va decidir canviar l'estratègia d'aïllament. Aquesta nova metodologia va consistir en l'addició d'un dissolvent a fi de precipitar únicament el producte desitjat. Després d'assajar amb diferents solvents i mescles, es va trobar que els millors resultats, en termes de rendiment i puresa, s'obtenien afegint sobre la solució de DMF una mescla etanol:aigua (1:1, v/v). El producte desitjat **4** precipita instantàneament (rendiment del 99%) en forma de sòlid blanc a causa de la baixa solubilitat dels ditiocarbamats de zinc en aigua. És possible la recristal·lització del complex **4** emprant acetonitril calent anhidre. D'aquesta manera es varen obtenir monocristalls per a realitzar la difracció de raig X.

En l'espectre **¹H-RMN** (Figura 51) del compost **4** es pot observar el senyal corresponent als metilens del grup Succinimidil ($\delta \approx 2.9$). La incorporació d'aquest nou grup a la molècula desplaça el senyal del protó 4 fins $\delta \approx 3.3$ mentre que la resta romanen pràcticament immòbils. Aquest fet sembla indicar que la presència del grup èster activat no implica canvis importants en la resta de la molècula.

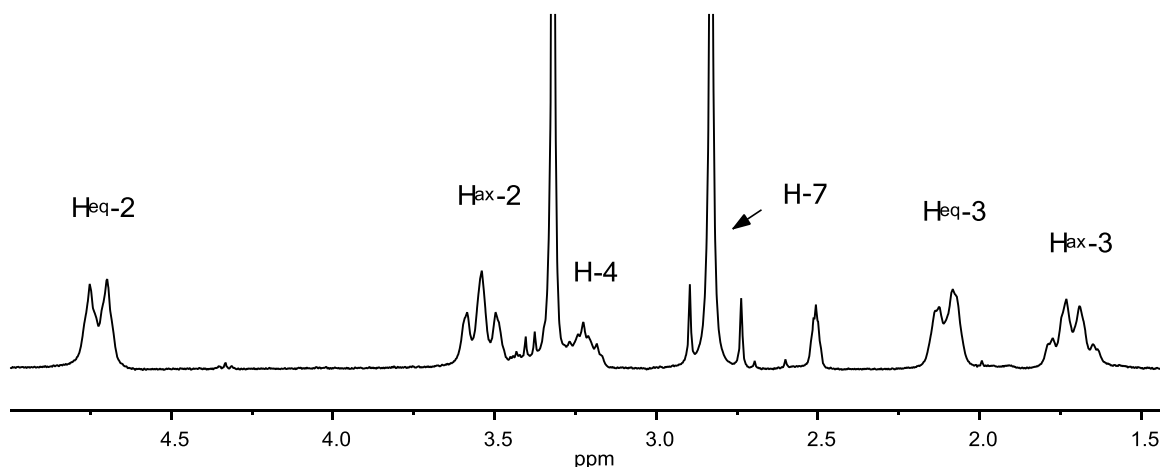


Figura 51. Espectre de ^1H -RMN en DMSO-d_6 del complex 4.

La introducció del grup succinimidil també es manifesta en l'espectre $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN on apareix un senyal amb un desplaçament químic a $\delta \approx 170$ (C-5) que estaria d'acord amb la presència d'un grup èster en la molècula. És important destacar que el senyal del carboni del grup ditiocarbamat C-1 ($\delta \approx 203$), no varia significativament respecte del complex anterior. Per tant, la presència del grup Succinimidil èster no sembla afectar al grup ditiocarbamat coordinat amb el metall zinc.

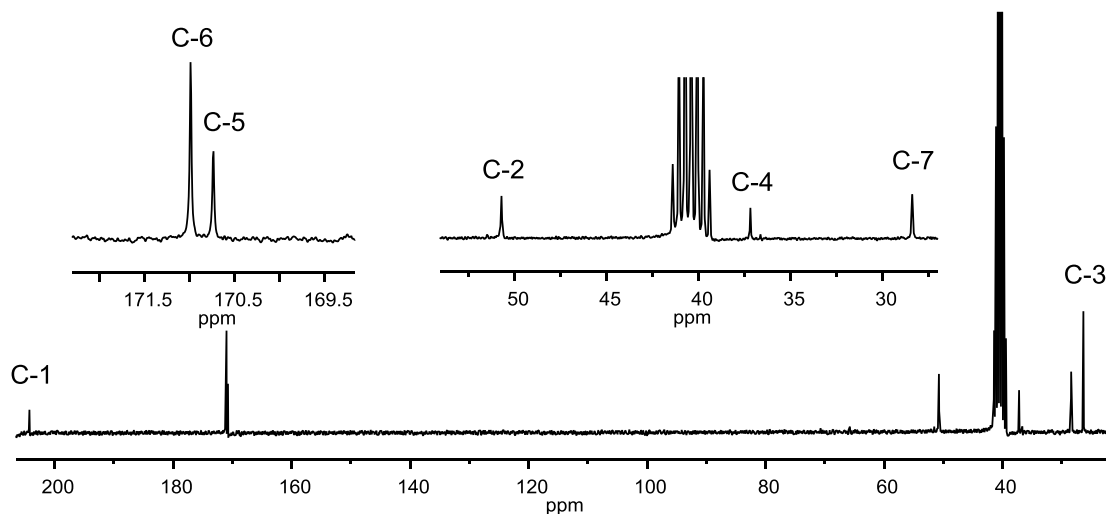


Figura 52. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en DMSO-d_6 del complex 4.

La difracció de raig X va revelar que es tractava novament d'un dímer amb un número de coordinació idèntic al complex de zinc prèviament sintetitzat, **3**. La incorporació del fragment Succinimidil èster no va representa cap canvi important en l'entorn metàl·lic del complex, el qual seguia tenint una geometria intermèdia entre

bipiràmide trigonal i piràmide de base quadrada, tot i que, la contribució de cadascuna de les geometries era diferent com va revelar el valor de τ (bpt = 63% i pbq = 37%). Malgrat aquesta diferència entre ambdós compostos, el complex **4** té quatre distàncies semblants Zn-S i una sensiblement major, i els valors són molt similars als trobats en el complex **3**.

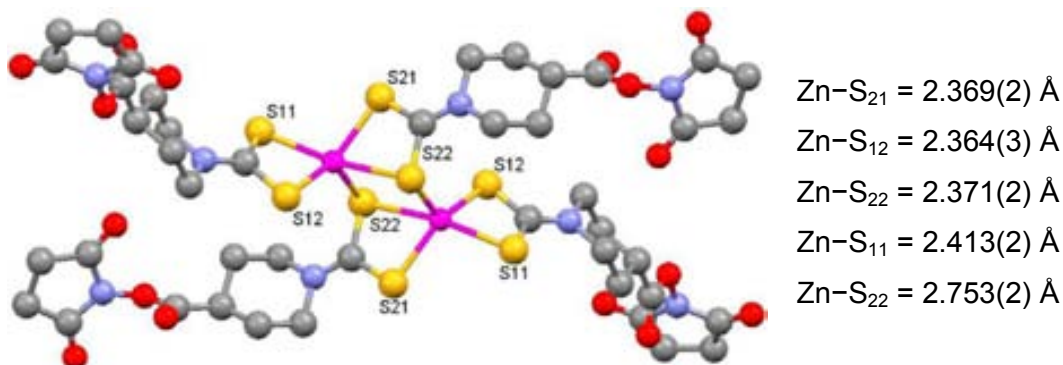
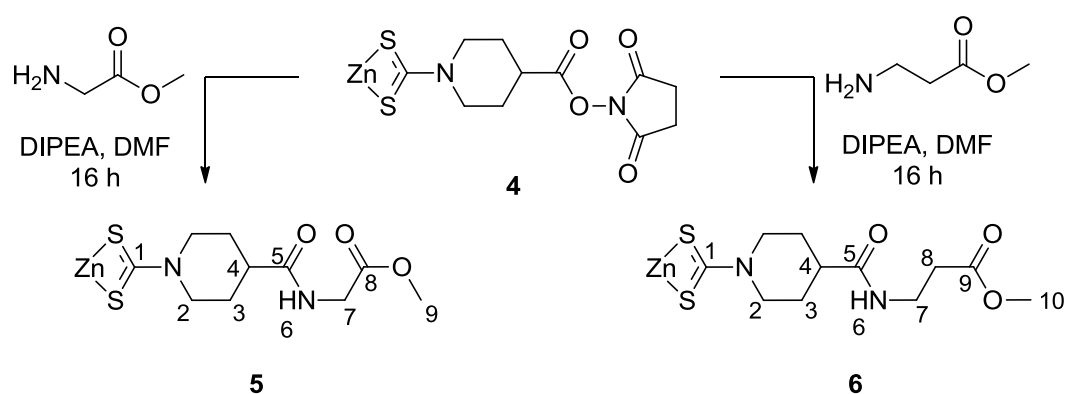


Figura 53. Estructura cristal·lina del compost **4**. Per a major claredat no es representen els àtoms d'hidrogen.

2.1.3. Reacció d'acoblament peptídica a través del grup Succinimidil èster

Les dues primeres amines assajades per a la reacció d'acoblament peptídica, foren escollides com a model per a estudiar la reacció de bioconjugació entre el complex **4** i biomolècules que continguin un grup funcional amina. Per la seva simplicitat, es van estudiar els èsters metilats de la glicina i la β -alanina.



Esquema 28. Bioconjugació del complex **4** per a la preparació dels complexos **5** i **6** mitjançant la formació d'un enllaç amida.

Per a realitzar l'acoblament peptídic es va emprar novament DMF anhidre com a dissolvent. En ambdós casos es va afegir DIPEA com a base impedida no nucleòfila per desprotonar les dues amines ja que aquestes es comercialitzen en forma de clorhidrat. Per tal que la reacció fos completa totalment i que no quedés reactiu de zinc inicial, ja que el procés de purificació hagués estat tediós, es va deixar reaccionar a temperatura ambient durant 16 hores i amb excés de reactiu. Novament, l'addició d'una mescla etanol:aigua (1:1, v/v) va resultar la millor estratègia per a l'obtenció dels compostos **5** i **6** purs. Com en els cas anterior, la mescla va fer precipitar el producte desitjat mentre els altres subproductes (DMF, amina no reaccionant, etc.) quedaven en solució. En analitzar mitjançant RMN els sòlids blancs precipitats no es va observar la presència de cap traça del complex **4**. Aquest fet indica que la reacció és completa malgrat que els rendiments finals són de l'ordre del 60%. Això segurament és degut a que part del producte queda en solució.

L'obtenció dels dos complexos de zinc bioconjugats (**5,6**) es va poder confirmar mitjançant les habituals tècniques de caracterització. En tots dos casos es va poder observar per $^1\text{H-RMN}$ el senyal de protó del nou grup amida format (δ 8.40 per **5** i δ 8.00 per **6**) i el desplaçament cap a camps més alts del protó 4 (δ 2.53 per **5** i δ 2.45 per **6**). D'altra banda, la incorporació del nou grup amida no va suposar un canvi important en la resta de senyals del espectre. En la Figura 54 es mostra l'espectre de protó del complex de **5**.

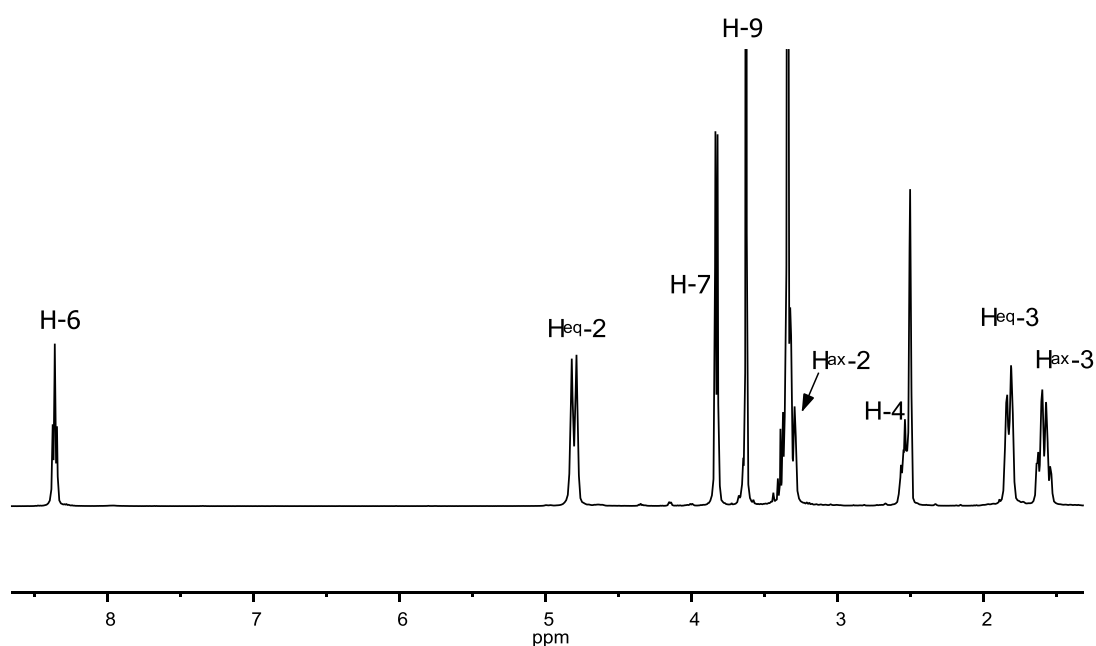


Figura 54. Espectre de $^1\text{H-RMN}$ en DMSO-d_6 del complex **5**.

Pel que respecte al espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN el senyal del grup ditiocarbamat ($\delta \approx 203$ en tots dos casos) no va presentar grans canvis respecte els complex sintetitzats anteriorment. Això semblaria indicar que la bioconjugació del complex probablement afecta molt poc a l'entorn metàl·lic i que per tant, aquest hauria de tenir una estructura semblant als compostos **3** i **4**. El canvi més important respecte del compost de partida (**4**) es troba en l'àtom de carboni C-5 el qual pateix un desplaçament a camps més baixos de aproximadament 5 ppm en tots dos casos. Aquest desplaçament és consistent amb la formació d'un enllaç peptídic. Un canvi similar però en menor grau també el trobem en C-4. D'altra banda, la resta de senyals de carboni de l'anell no es veuen afectades significativament per la incorporació del grup amida.

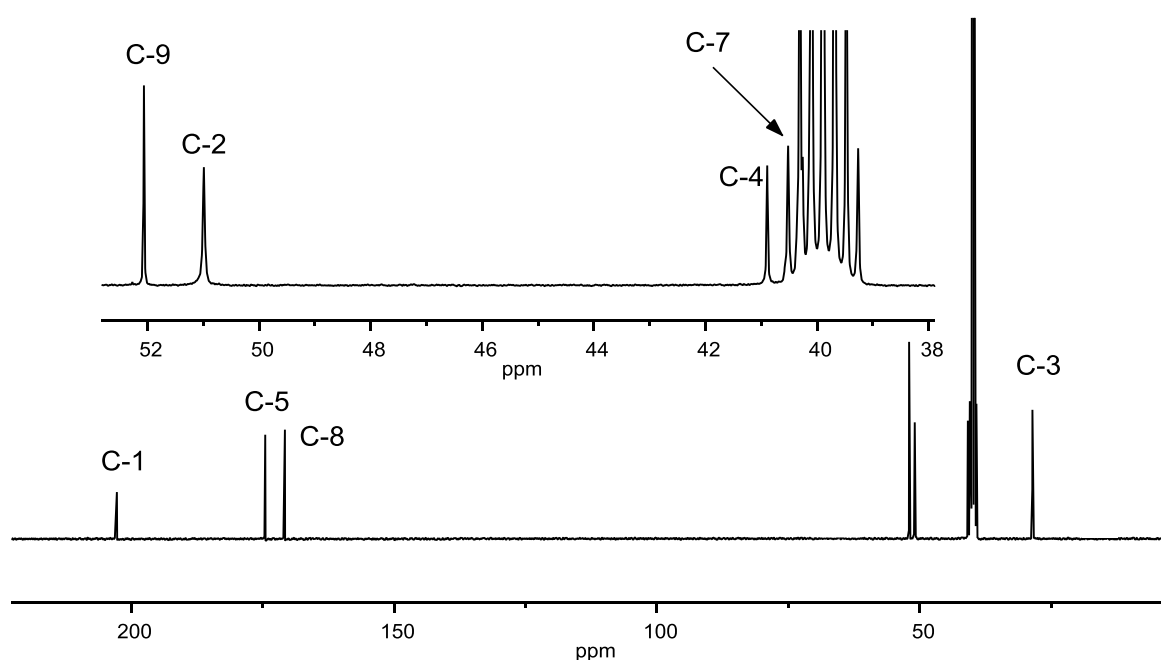


Figura 55. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en DMSO- d_6 del complex **5**.

2.1.3.1. Síntesi i caracterització de complexos de zinc amb els fragments 1-(2-metoxifenil)piperazina i D-(+)-glucosamina via acoblament peptídic

Un cop trobades unes bones condicions per a la preparació de nous complexos bioconjugats via acoblament peptídic, es va realitzar una cerca de biomolècules que continguessin un grup funcional amina i que poguessin ser emprades com a radiofàrmacs de segona generació.

La primera biomolècula escollida per assajar la reacció d'acoblament va ser la 1-(2-metoxifenil)piperazina.

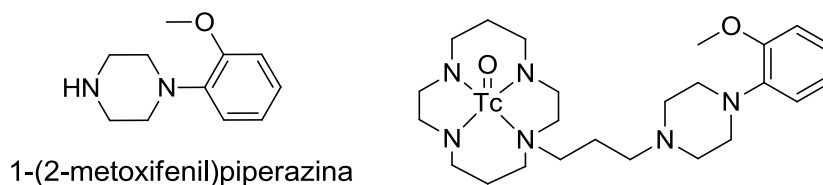
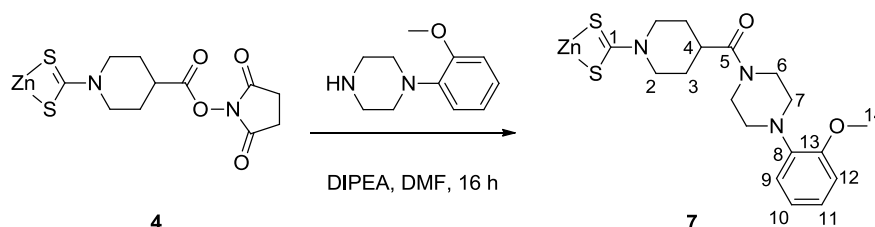


Figura 56. Fragment 1-(2-metoxifenil)piperazina i radiofàrmac experimental de tecneci amb el lligand N-[3-[4-(2-metoxifenil)piperazina-1-il]propil]ciclám.¹⁰⁸

Aquesta amina conté un fragment arilpiperazina, del qual es coneix la seva forta afinitat per el neuroreceptor 5-HT_{1A}.¹⁰⁹ El receptor 5-HT_{1A} és àmpliament estudiat degut a l'important rol que té en nombrosos desordres neuropsiquiàtrics¹¹⁰ tals com: alzheimer, depressió, ansietat, entre d'altres. És per tant de gran interès, el desenvolupament de radiocompostos amb aquest fragment que presentin gran selectivitat i afinitat amb el receptor 5-HT_{1A}, ja que permetria obtenir nous radiofàrmacs de diagnosi cerebral per imatge. A més a més, com que es tracte d'una amina secundària, l'obtenció del producte d'acoblament amb aquesta molècula ampliaria les possibilitats d'utilitzar el nou compost **4** en la preparació de derivats de zinc amb que continguessin aquest tipus d'amines.



Esquema 29. Preparació del complex **7** a partir d'una reacció d'acoblament peptídica.

En la síntesi del nou complex amb el fragment 1-(2-metoxifenil)piperazina es varen emprar les mateixes condicions de reacció que amb les dues amines model. Després de deixar la reacció en DMF a temperatura ambient i 5 equivalents de DIPEA, a la solució taronja resultant se l'hi va afegir una mescla d'aigua etanol (1:1, v/v) gota a

¹⁰⁸ Wang, F.; Wang, X.; Yang, S.; Liu, J.; Zhang, X. *J. Label Compd. Radiopharm*, **2008**, 51 347.

¹⁰⁹ Czopek, A.; Byrtus, H.; Kolaczowski, M.; Pawlowski, M.; Dybala, M.; Nowak, G.; Tatarczynska, E.; Wesolowska, A.; Chojnacka-Wójcik, E. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 45, 1295.

¹¹⁰ Borg, J. *Behavioural Brain Research* **2008**, 195, 103.

gota. El complex **7** va precipitar en forma de sòlid blanc amb un rendiment del 71%. Com en els casos anteriors, no es va observar la presència de cap senyal del complex de partida **4** en el sòlid precipitat. Això semblaria indicar que la reacció d'acoblament peptídic és quantitativa, i que el rendiment final de la reacció és degut a que part del nou compost format (**7**) roman en solució. Aquest excel·lent resultat ens mostra que és favorable ampliar l'ús del complex **4** per la bioconjugació amb biomolècules que continguin amines secundàries.

Com en els complexos anteriors, es pot observar en l'espectre de ^1H -RMN la formació del enllaç amida, ja que s'observa un desplaçament químic del protó 4 cap a camps més alts. No obstant, en aquest cas el seu desplaçament químic és menor (≈ 3.1 ppm) al de les amides prèviament sintetitzades. Aquesta diferència en la posició pot atribuir-se a que es tracte d'una amida terciària. També en l'espectre de protó es poden observar els nous senyals dels protons aromàtics del fragment fenilpiperazina a $\delta \approx 7$ ppm.

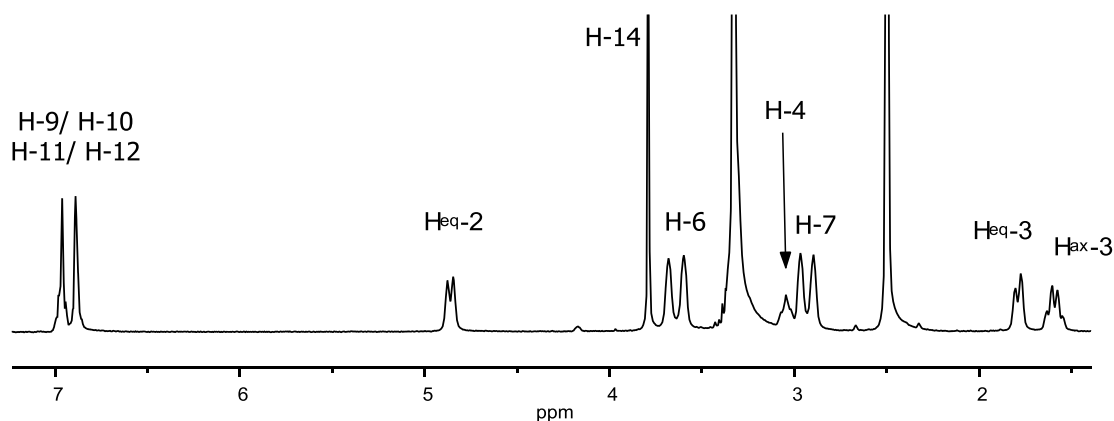


Figura 57. Espectre de ^1H -RMN en DMSO-d_6 del complex **7**.

En analitzar l'espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex **7** es pot observar que el senyal del grup ditiocarbamat ($\delta \approx 203$) no va presentar grans canvis respecte del complex **4**, això semblaria indicar novament que la bioconjugació del complex afectaria poc a l'entorn metàl·lic. D'altra banda, tot i que el desplaçament químic de C-5 és comparable al de les altres amides prèviament caracteritzades ($\delta \approx 172$), la posició del senyal de C-4 ($\delta \approx 36$), sensiblement inferior, podria ser atribuïble al fet que es tracti d'una amida terciària. És probablement per aquest motiu, que els senyals dels carbonis C-6 i C-7, es presenten desdoblats, ja que el gir de l'enllaç carboni nitrogen del grup

amida possiblement està impedit pel caràcter parcial de doble enllaç i, en conseqüència, es generen dos diastereoisòmers en solució.

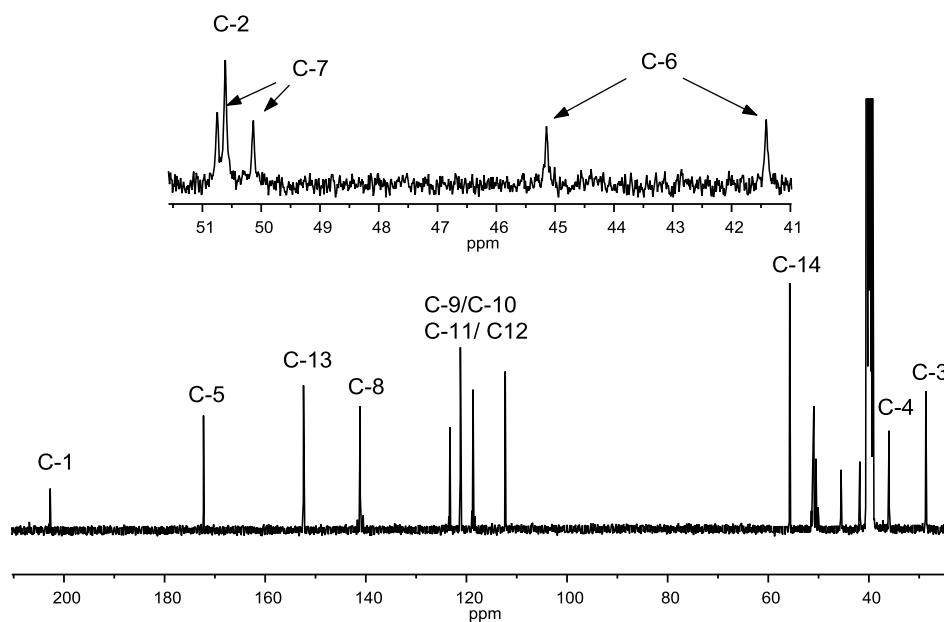


Figura 58. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en DMSO- d_6 del complex 7.

Per a la preparació de l'últim dels nous compostos de zinc sintetitzats, es va escollir l'amina D-(+)-glucosamina (Figura 59). Es tracta d'una biomolècula anàloga a la molècula de D-glucosa, on en la posició C-2 del anell el grup funcional hidroxil ha estat substituït per un grup amina. La preparació d'un compost de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucosa 111 ha estat objecte d'estudi de gran interès ja que podria suposar una alternativa més econòmica i tindria una major disponibilitat que no pas el radiocompost de fluor-18 ^{18}F -2-Desoxi-2-fluoro-D-glucopiranososa (FDG), el qual a dia d'avui s'utilitza majoritàriament per la detecció de tumors mitjançant la tècnica d'emissió PET (veure apartat 1.2.1 del capítol I).

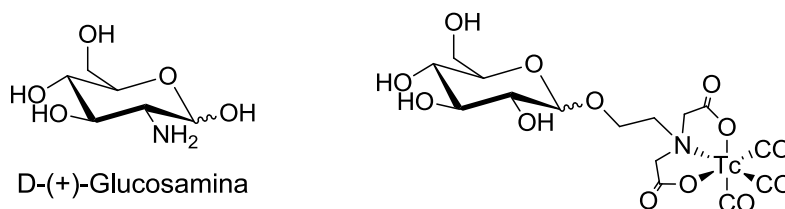
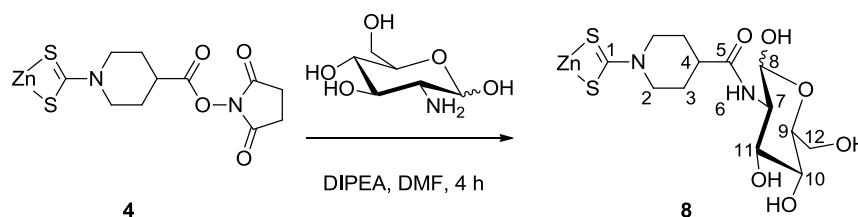


Figura 59. Molècula de glucosamina i exemple de radiofàrmac experimental de tecneci derivatitzat amb la molècula de glucosa.

¹¹¹ Petrig, J.; Schibli, R.; Dumas, C.; Alberto, R.; Schubiger, P. A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1868.

El procediment experimental per a l'obtenció del compost funcionalitzat amb la molècula de glucosa es va modificar lleugerament respecte de l'emprat en la síntesi dels complexos anteriors.



Esquema 30. Preparació del complex **8** mitjançant una reacció d'acoblament peptídic.

El temps de reacció es va disminuir fins a les 4 hores i també es va eliminar l'excés de base per evitar el procés d'epimerització de l'àtom de C-7. Està descrit en la bibliografia que en condicions fortament bàsiques els monosacàrids poden perdre la configuració d'un dels seus centre estereogènics, donant lloc a una mescla dels dos diastereoisòmers. En aquest cas concret contindria les formes de glucosamina i manosamina.

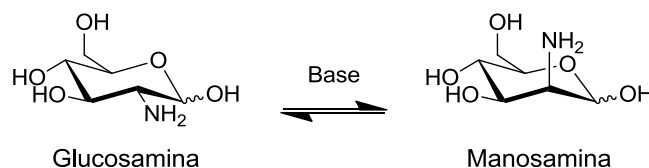


Figura 60. Equilibri en medi bàsic de les formes glucosamina i manosamina.

D'altra banda, es va decidir emprar el metanol anhidre com a dissolvent per a precipitar el producte ja que els rendiments amb l'ús de la mescla d'aigua etanol (1:1, v/v) eren sensiblement més baixos que en els altres compostos descrits anteriorment. Aquest fet pot estar directament relacionat amb la presumible major solubilitat causada per l'elevat nombre de grups alcohol que conté la molècula.

L'espectre de $^1\text{H-RMN}$ presentava un senyal nou ($\delta \approx 7.5$) que gràcies als estudis previs amb els complexos **5** i **6**, es va poder assignar al protó del nou grup amida format. Degut a l'equilibri que existeix en solució entre les formes alfa i beta de la glucosamina¹¹² algunes de les senyals del compost surten duplicades. A més a més, l'enorme

¹¹² Lewis, B. E.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1327.

superposició de les bandes dificultava la seva interpretació (Figura 61.A). Per aquest motiu es va decidir emprar la tècnica **TOCSY selectiu** (*Total Correlated Spectroscopy*). Aquesta tècnica consisteix en irradiar un dels senyals de protó, fet que donarà lloc a un increment de la intensitat del multiplet dels protons acoblats al irradiat. D'aquesta manera és possible determinar la seqüència en que es troben disposats els protons en la molècula i, per tant, assignar-los en l'espectre.

Així doncs, es van escollir els senyals a $\delta \approx 7.69$ i $\delta \approx 1.60$ corresponents als protons H-6 i H-3_{ax} respectivament, ja que aquests es troben separats de la resta dels senyals i es possible irradiar-los selectivament. Primerament es va irradiar el protó H-6 corresponent al grup amida. El temps es va fixar amb 100 milisegons per tal de poder observar en el nou espectre tots els senyals del anell de glucosamina (Figura 61.B). L'assignació dels senyals resultants es va fer d'acord amb les dades publicades en la bibliografia.¹¹³ D'altra banda, per tal de poder observar els senyals de l'anell de piperidina es va irradiar el senyal de protó H-3_{ax}. En aquest cas amb un temps inferior (40 milisegons) ja que els protons que es volen visualitzar estan allunyats per només 3 enllaços. Pel que fa a la posició del senyal del protó 4, en el nou espectre obtingut va coincidir amb la de les amides model prèviament sintetitzades.

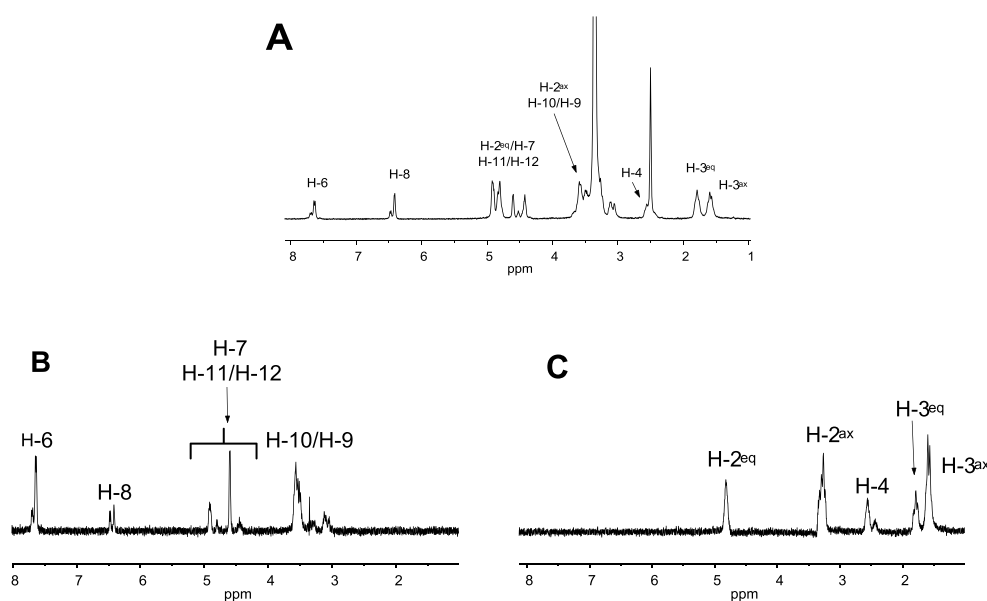


Figura 61. Espectre de ^1H -RMN en DMSO- d_6 del complex **8**. (A) Espectre complet, (B) irradiant a H-6, (C) irradiant a H-3_{ax}.

¹¹³ Guo, J.; Ma, L.; Liu, P. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2010**, 185, 2348.

L'assignació dels senyals de carboni en l'espectre $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN es va fer d'acord amb les dades bibliogràfiques.¹¹³ En l'espectre de carboni es poden observar alguns senyals duplicats, fet que es relaciona amb l'equilibri entre les formes alfa i beta de la molècula de glucosamina. La posició a $\delta \approx 175$ del carboni C-5 confirma la reacció d'acoblament peptídic, ja que aquest desplaçament químic és molt similar al que s'observa en les amides model **5** i **6** prèviament caracteritzades. Com en els casos anteriors, la resta dels senyals de l'anell de piperidina no presenten canvis importants respecte del complex **4**. D'altra banda, la posició dels senyals de l'anell de glucosamina i la presència d'un únic senyal entre 180 i 160 ppm indica que no hi havia hagut la formació d'un enllaç èster entre el carboni C-5 del compost **4** i algun dels grups hidroxils de la biomolècula. És important destacar aquest resultat ja que demostra que aquesta reacció està afavorida enfront de qualsevol altre i, en conseqüència, seria possible emprar-la en altres biomolècules que continguessin diferents grups funcionals.

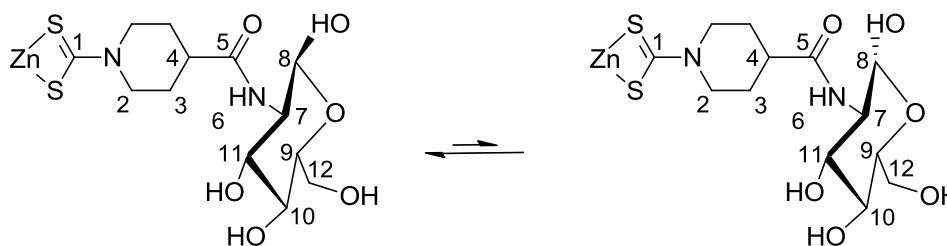


Figura 62. Equilibri entre les formes alfa i beta de l'anell de glucosamina en el complex **8**.

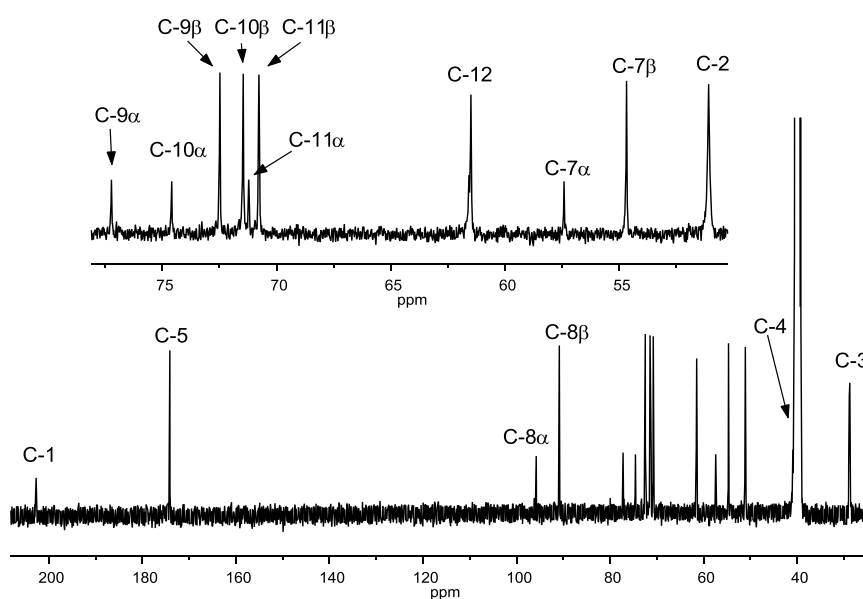


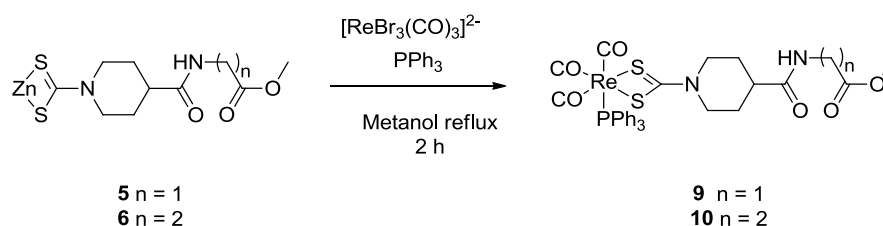
Figura 63. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en DMSO- d_6 del complex **8**.

2.2. Síntesi i caracterització dels complexos de reni carbonil via transmetal·lació de complexos de Zn

Un cop preparats tots els complexos de zinc es va procedir a assajar la reacció de transmetal·lació amb el metall reni. Per a tal propòsit es va utilitzar com a precursor en tots els casos el complex de reni $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$, la síntesi del qual està descrita en la bibliografia.¹¹⁴ Per tal de completar la coordinació del reni es va emprar en tots els casos trifenilfosfina (PPh_3) com a lligand monodentat. D'aquesta manera es pretén formar complexos metàl·lics amb el set coordinatiu $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$.

Primerament es van utilitzar els complexos de zinc bioconjugats amb les amines model, glicina i β -alanina, per tal de trobar les condicions de síntesi i posteriorment, emprar-les en l'obtenció dels complexos de reni amb els fragments 1-(2-metoxifenil)piperazina i D-(+)-glucosamina.

2.2.1. Síntesi i caracterització dels complexos de Re carbonil amb les amides model



Esquema 31. Preparació de complexos reni carbonil mitjançant una reacció de transmetal·lació.

Es va realitzar un reflux en metanol del complex de zinc corresponent (**5,6**) en presència del precursor de reni carbonil $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$. Tot i que inicialment els compostos de zinc es troben en suspensió, en el transcurs de la reacció es va observar la completa solubilització dels complexos i un lleuger canvi de color de la solució de incolora a verd pàl·lid. Després d'una hora de reacció s'afegeix, en forma sòlida, la quantitat adequada de trifenilfosfina i es deixa reaccionar durant una hora més. Es va

¹¹⁴ Alberto, R.; Egli, A.; Abram, U.; Hegetschweiler, K.; Gramlich, V.; Schubiger, P. A. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 19 2815.

decidir afegir la trifenilfosfina en segon lloc per evitar la formació d'altres espècies, com per exemple aquelles que només contindrien trifenilfosfina coordinada.

Tots dos productes es van poder caracteritzar per les tècniques habituals. A continuació i a mode d'exemple es presenten els espectres de ressonància pel complex **10**.

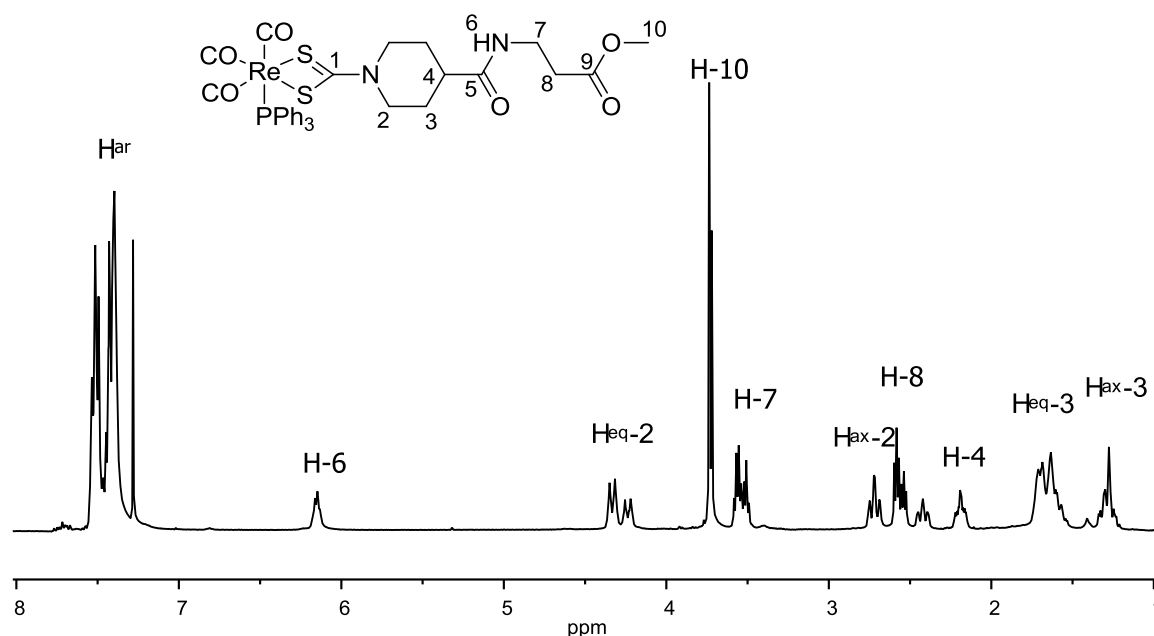


Figura 64. Espectre de ^1H -RMN en cloroform-d del complex **10**.

En el espectre de ^1H -RMN del complex **10** es mostren els senyals dels protons tant del lligand ditiocarbamat com els protons aromàtics de la trifenilfosfina. Un fet important a destacar, és que alguns dels senyals apareixen duplicats en l'espectre i separats entre 0.4-0.6 ppm. Aquest fenomen semblava indicar l'existència de dues espècies en solució. Tot i això, no es va poder observar tant per EM com posteriorment per HPLC cap altre complex de reni o molècula diferent. La falta d'evidències d'un segon compost, va suggerir la presència de dos diastereoisòmers en solució. Quan es van enregistrar els espectres de protó a diferents temperatures (Figura 65) es va poder observar un comportament en els senyals de protó (coalescència dels senyals) que estaria d'acord amb la presència d'un equilibri entre dues espècies en solució.

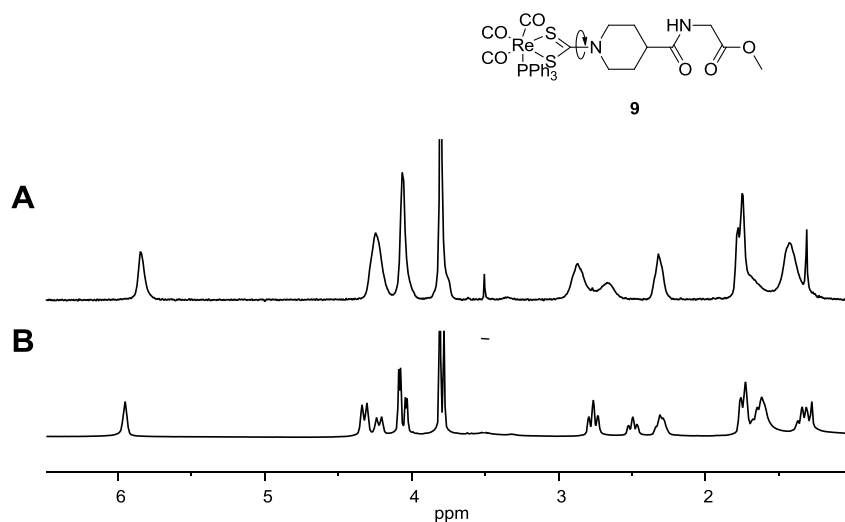


Figura 65. Espectres de ^1H -RMN en cloroform-d del complex **9** enregistrats a (A) 55 °C i (B) 25 °C.

L'equilibri entre els dos diastereoisòmers podria venir donat a través de la rotació de l'enllaç C-N. Aquesta es trobaria parcialment impedita a temperatura ambient, generant dues espècies amb una disposició dels àtoms diferent en l'espai. Aquest fenomen s'ha observat en altres complexos metàl·lics amb grups ditiocarbamat $\{\text{Ir}(\text{PPh}_3)_2(\text{CO})(\text{Et}_2\text{dtc})^{115}$ i $\text{Ir}(\text{PH}_3)_2(\text{CO})(\text{H}_2\text{dtc})^{116}\}$.

L'espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN dels complexos metàl·lics de reni mostra un desplaçament del senyal del carboni del grup ditiocarbamat ($\delta \approx 210$) respecte dels complexos de zinc (≈ 203 ppm). Els altres senyals de carboni del fragment de β -alanina, no presenten un desplaçament químic important en comparació amb el complex **6**. Aquest resultat indica que el intercanvi del metall zinc pel fragment organometàl·lic reni tricarbonyl no comporta grans canvis en l'estructura de la biomolècula acoblada. Com a conseqüència de la rotació del enllaç C-N del grup ditiocarbamat abans esmentada, novament alguns dels senyals presentaven cert desdoblament molt acusat en el cas de C-4.

¹¹⁵ Suardi, G.; Cleary, B. P.; Duckett, S. B.; Sleight, C.; Rau, M.; Reed, E. W.; Lohman, J. A. B.; Eisenberg R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7716.

¹¹⁶ Ariafard, A.; Amini, M. M.; Fazaeli, R.; Aghabozorg, H. R. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2004**, 672, 141.

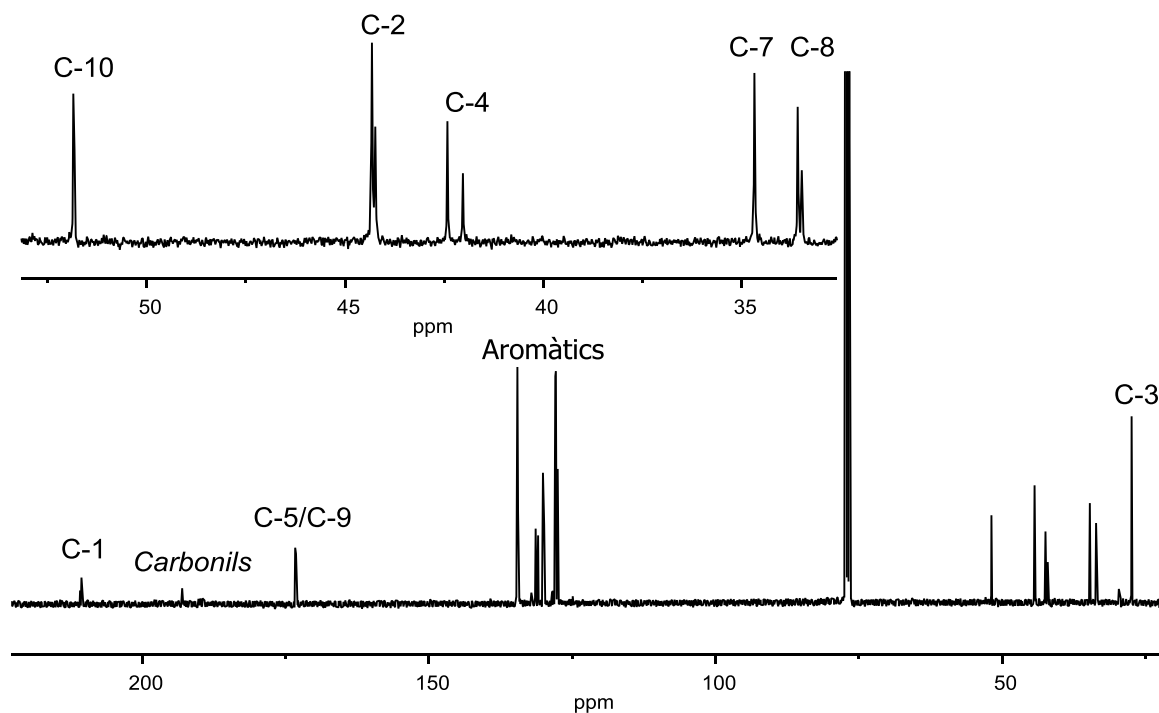


Figura 66. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en cloroform-d del complex **10**.

. La posició del senyal l'àtom de fòsfor en l'espectre de ressonància magnètica nuclear de fòsfor (^{31}P -RMN), va confirmar la coordinació de la trifenilfosfina al fragment metàl·lic $\text{Re}(\text{CO})_3$. A més a més, va permetre confirmar l'absència d'altres complexos metàl·lics amb PPh_3 coordinada així com de trifenilfosfina lliure.

La resolució de l'estructura del complex **10** mitjançant difracció de raig X va confirmar l'estructura proposada. Les distàncies d'enllaç i els angles entre el metall i els diferents àtoms, són similars a altres complexos de reni amb el set coordinatiu $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$.^{117,118} La geometria al voltant del metall consisteix en un octaedre distorsionat amb angles propers a 90° excepte l'angle SReS , el qual és notablement inferior ($\approx 70^\circ$). Aquest valor és freqüent en complexos octaèdrics degut al menor angle de mossegada (*bite angle*) del grup ditiocarbamat.¹¹⁹

¹¹⁷ Herrick, R. S.; Ziegler, C. J.; Sripathongnak, S.; Barone, N.; Costa, R.; Cupelo, W.; Gambella, A. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3929.

¹¹⁸ Riondato, M.; Camporese, D.; Martín, D.; Suades, J.; Alvarez-Larena, A.; Mazzi, U. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4048.

¹¹⁹ Silaghi-Dumitrescu, L.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Haiduc, I.; Toscano, R.-A.; Garcia-Montalvo, V.; Cae-Olivares, R.; Z. *Anorg. Allg. Chem.* **1999**, 625, 347.

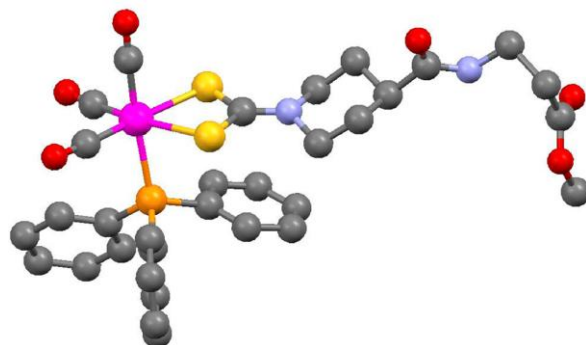
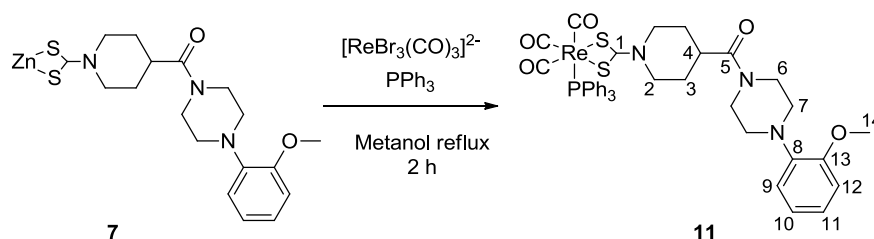


Figura 67. Estructura cristal·lina del complex **10**. Per major claredat no es representen els àtoms d'hidrogen.

Un cop provada la reacció de transmetal·lació amb les dues molècules model, es va provar la síntesi dels dos complexos de reni bioconjugats amb les biomolècules 1-(2-metoxifenil)piperazina i D-(+)-glucosamina. Novament les proves prèvies realitzades amb els complexos de zinc model (**5,6**) van facilitar tant la síntesi com la caracterització dels nous complexos de reni bioconjugats.

2.2.2. Síntesi i caracterització del complex de reni carbonil amb el complex de zinc bioconjugat amb el fragment 1-(2-metoxifenil)piperazina, **11**



Esquema 32. Preparació del complex **11** mitjançant una reacció de transmetal·lació.

La reacció es porta a terme amb les mateixes condicions emprades en les síntesis dels complexos **5** i **6**, els quals s'havien pogut poder obtenir purs i amb rendiments acceptables. Com en els casos anteriors el producte cristal·lí va precipitar en deixar refredar la solució obtenint un rendiment del 58%. Per a la caracterització del producte es van emprar novament totes les tècniques habituals.

L'espectre $^1\text{H-RMN}$ del complex **11** va mostrar novament el desdoblament dels senyals d'alguns dels protons, a causa de la rotació parcialment impedita del enllaç C-N del grup ditiocarbamat i amb una separació similar als casos anteriors. La posició dels

senyals de l'anell de piperidina en l'espectre és comparable en tots casos als complexos de reni model caracteritzats anteriorment a excepció de H-4 el qual es troba a camps més baixos com a conseqüència que es tracta d'una amida terciària.

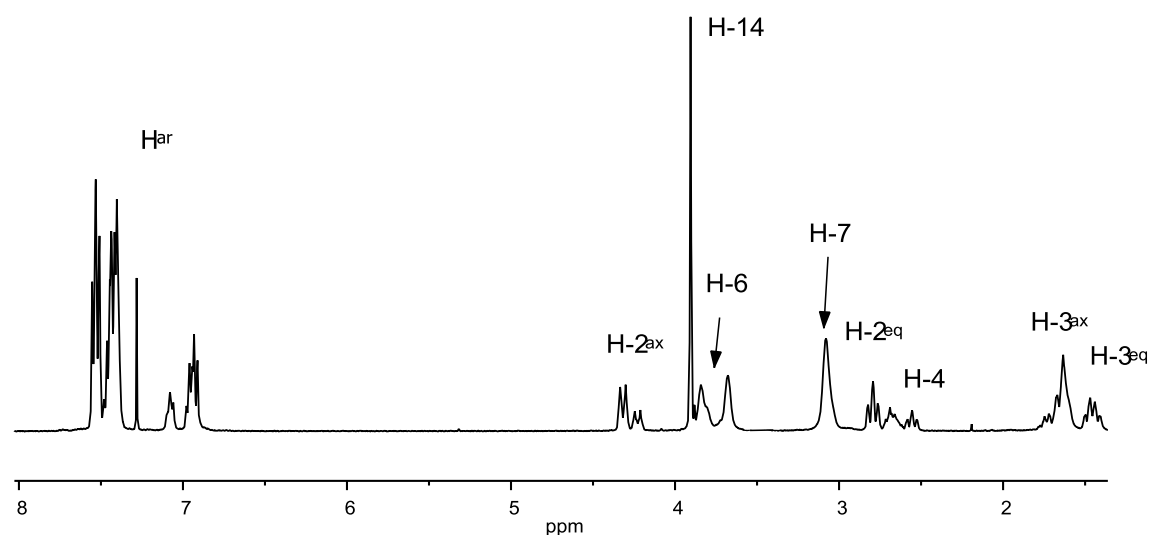


Figura 68. Espectre de ^1H -RMN en cloroform-d del complex **11**.

L'espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex **11** mostrava un desplaçament químic de 211 ppm per C-1, la qual cosa semblava indicar la presència del metall reni unit al grup ditiocarbamat igual que en els complexos **9** i **10**. Els altres senyals de carboni del fragment bioconjugat no presentaven diferències importants en les posicions dels senyals en comparació amb el complex de zinc **7**. Aquest resultat sembla indicar novament que el intercanvi del metall zinc pel fragment organometàl·lic reni tricarbonil no implica grans canvis en l'estructura de la biomolècula acoblada. Novament, i com a conseqüència de la rotació parcial dels enllaços C-N tant del grup ditiocarbamat com de l'amida terciària,¹²⁰ alguns dels senyals (C-2, C-4, C-6, C-7) presentaven cert desdoblament.

¹²⁰ Bisceglia, J. A.; Mollo, M. C.; Orelli, L. R. *J Mol. Struct.* **2010**, 966, 79.

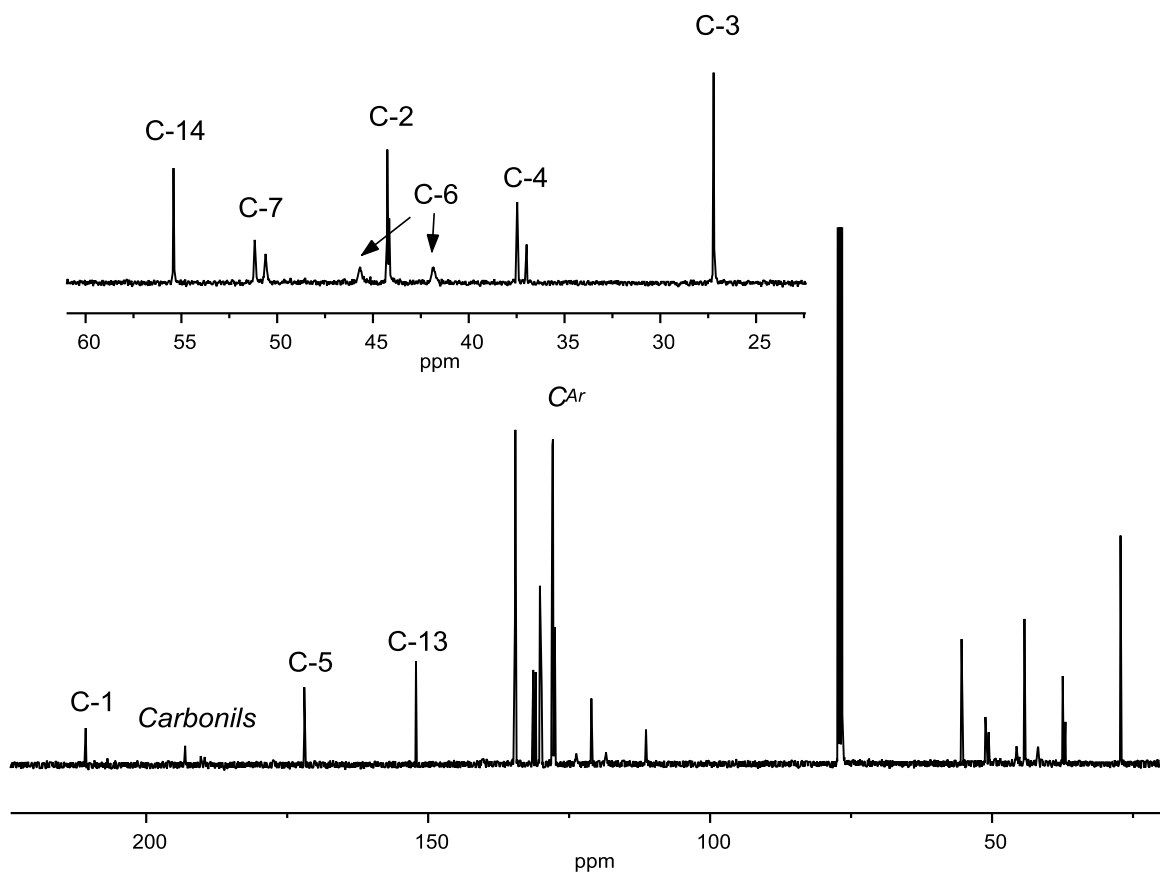
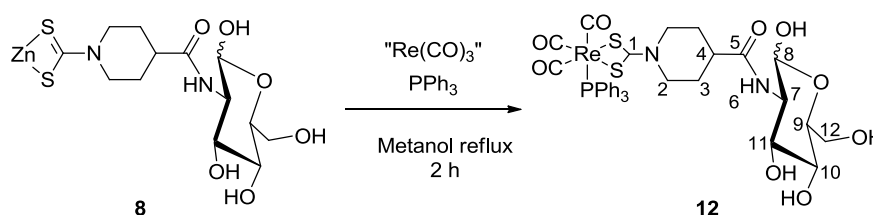


Figura 69. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en cloroform-d del complex 11.

2.2.3. Síntesi i caracterització del complex de reni carbonil amb la biomolècula D-(+)-glucosamina, 12



Esquema 33. Preparació del complex 12 mitjançant una reacció de transmetal·lació.

La reacció amb el derivat de zinc que conté el fragment de glucosamina (**8**), es porta a terme amb les mateixes condicions emprades per la preparació dels complexos **9-11**. Com s'ha comentat anteriorment, aquestes condicions consisteixen en preparar

una suspensió del complex de zinc **8** i sobre aquesta, suspensió s'afegeixen consecutivament els reactius $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ i PPh_3 .

En l'espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex **12** es pot observar el canvi de posició dels senyals dels carbonis C-1 ($\delta \approx 210$) i C-2 ($\delta \approx 45$), resultat que, com en els casos anteriors, és coherent amb la coordinació del reni al grup ditiocarbamat. Pel que respecta als senyals dels carbonis de l'anell de glucosamina, aquests no presenten una variació important respecte del complex de zinc **8**. Aquest resultat indica, que no hi ha interaccions significatives entre els grups hidroxils i el fragment de reni carbonil i, per tant, la reacció de transmetal·lació (formació enllaç Re-S) està afavorida termodinàmicament respecte altres reaccions de complexació (formació enllaç Re-O). Novament, aquest fet ens mostra la compatibilitat d'aquest tipus de reacció amb biomolècules que continguin altres grups funcionals.

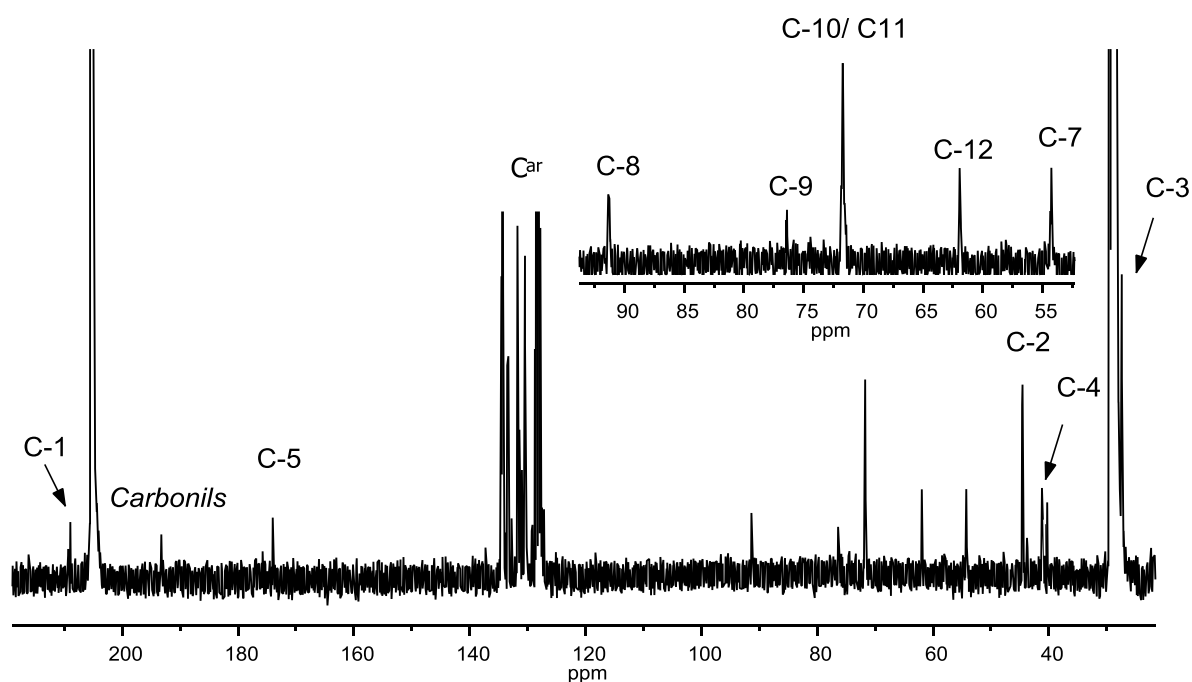


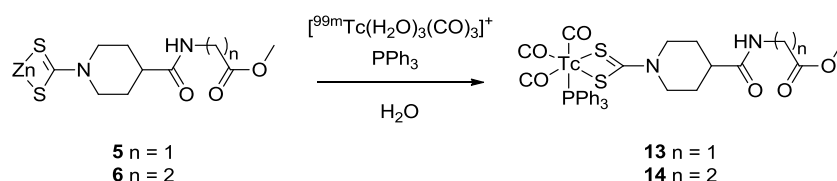
Figura 70. Espectre de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN en acetona- d_6 del complex **12**.

2.3. Síntesi i caracterització dels complexos de tecneci-99m via transmetal·lació de complexos de zinc

Com ja s'ha comentat amb anterioritat (apartat 1.3.3. del capítol I), a causa de les baixes concentracions de tecneci (10^{-7} - 10^{-8} M) emprades en la preparació i administració de radiofàrmacs, no és possible la caracterització dels radiocompostos per les tècniques habituals (RMN, IR,...). Per aquest motiu, la metodologia de treball per estudiar i caracteritzar aquests complexos és la següent: (a) un cop realitzada la síntesi del radiocomplex de tecneci s'analitza la solució resultant mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió amb radiodetecció (RHPLC); i (b) es comparen els temps de retenció de cadascun dels radiocompostos amb els dels complexos de reni homòlegs prèviament caracteritzats. Com ja s'ha comentat anteriorment, si els temps de retenció d'ambdós complexos coincideix podem afirmar que tenen la mateixa estructura.

Per a l'obtenció dels radiocromatogrames es farà servir sempre una columna de fase reversa. Per tal que els complexos bioconjugats surtin a temps de retenció superiors al precursor de tecneci carbonil, és força comú treballar amb gradients i amb dues fases mòbils. Aquestes dues fases mòbils consisteixen en una fase aquosa i una orgànica (metanol, acetonitril,...). Variant els percentatges de cada dissolvent en la fase mòbil, és possible eluir primer el precursor de tecneci carbonil, ja que aquest té un caràcter polar més elevat a causa de la càrrega del complex. Posteriorment, en augmentar el percentatge de fase mòbil orgànica s'elueixen els complexos de tecneci bioconjugats, que com a conseqüència del seu caràcter més lipofílic, havien quedat retinguts prèviament en la columna. A més a més, l'ús d'un augment progressiu en el percentatge de solvent orgànic de la fase mòbil fa possible una separació de les diferents espècies que es puguin formar entre el precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, i els reactius emprats (complex de zinc, trifenilfosfina).

2.3.1. Síntesi i caracterització dels complexos de tecneci-99m carbonil bioconjugats amb les amines model



Esquema 34. Preparació de complexos de tecneci-99m carbonil mitjançant una reacció de transmetal·lació.

Novament per a posar a punt la reacció de transmetal·lació amb el fragment de tecneci carbonil es van provar en primer lloc els complexos de zinc bioconjugats amb les amines model glicina, **5**, i β -alanina, **6**. Els assajos es van realitzar sempre en aigua ja que és l'únic dissolvent permès en la preparació de radiofàrmacs.

Per tal d'obtenir els complexos de tecneci es va decidir primerament sintetitzar els radiocompostos en dos passos de reacció, sempre afegint el ditiocarbamat en primer lloc i després la trifenilfosfina. Aquesta metodologia és anàloga a la emprada en la síntesi dels complexos de reni. Amb aquestes condicions els paràmetres avaluats foren: el pH, la temperatura i els equivalents de PPh_3 . Prèviament a l'estudi de marcatge, és important poder identificar cadascuna de les espècies que puguin aparèixer en els radiocromatogrames. Per aquest motiu, primerament es va estudiar la reacció entre el precursor de tecneci i els diferents reactius per separat. D'aquesta manera, es va poder identificar els pics que contenien espècies de tecneci-ditiocarbamat i tecneci-trifenilfosfina.

Abans de començar amb l'anàlisi dels diferents paràmetres estudiats, és important destacar que com a conseqüència de la baixa solubilitat dels complexos de zinc en aigua, les suspensions dels compostos de zinc es col·locaven durant 5 minuts en un bany d'ultrasons per disminuir la mida de partícula, i afavorir així la seva posterior solubilització durant la reacció de transmetal·lació.

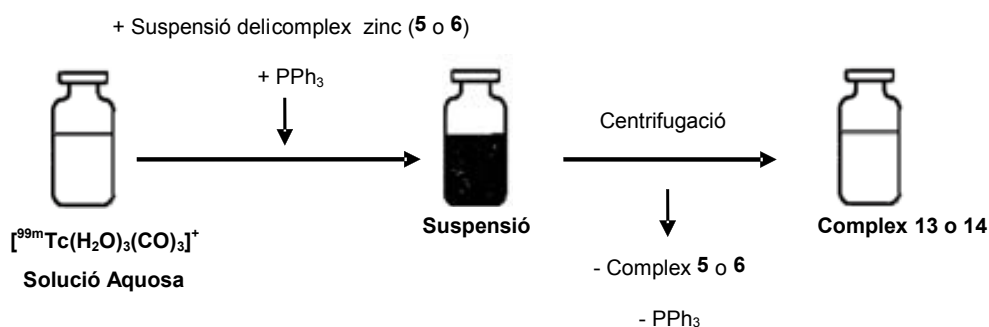


Figura 71. Esquema de preparació dels complexos de tecneci-99m **13** i **14**.

L'estudi sobre la influència del pH va demostrar que el rang de pH òptim es troba entre 6-7.5. Es va observar que per sota de 6 els ditiocarbamats de zinc no eren estables ja que els complexos es dissolien instantàneament i la solució adquiria una coloració groguenca. A més a més, la solució desprenia un fort olor a sofre, fet que semblava indicar la descomposició del grup funcional ditiocarbamat. D'altra banda, tot i que la reacció de transmetal·lació funcionava bé a pH superiors a 7.5, es va observar una disminució en el temps de retenció del senyal corresponent al complex intermedi de tecneci-ditiocarbamat, fet que estaria d'acord amb una lleugera disminució de la lipofilitat del compost provocada per la hidroxilació del grup èster. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, es va fer reaccionar els complexos de reni amb NaOH i es va observar la formació d'una única espècie amb temps de retenció inferior al complex de reni original i igual a l'obtingut amb tecneci en condicions bàsiques.

Les temperatures de treball van estar compreses entre 35 i 80 °C. A temperatures baixes (35 °C) la reacció de transmetal·lació no era completa i quedava sempre restes de tecneci carbonil sense reaccionar. Per contra, a temperatures molt elevades (80 °C) s'observava la formació d'un intermedi de reacció desconegut el qual no reaccionava completament amb la trifenilfosfina addicionada posteriorment i, per tant, no s'obtenia únicament el complex desitjat.

Per avaluar la concentració de trifenilfosfina en el medi de reacció es va preparar una solució 10^{-3} M de PPh_3 en etanol i es van afegir entre 1 i 20 μ L d'aquesta solució. Amb aquest volums addicionats la concentració de trifenilfosfina quedava compresa entre 10^{-6} i 10^{-5} M. Es va decidir emprar com a solvent l'etanol, ja que en aigua no hagués estat possible preparar una solució de concentració perfectament coneguda a causa de la baixa solubilitat de la trifenilfosfina en aquest solvent. Cal destacar que, en la preparació de radiofàrmacs de tecneci està permès l'ús d'etanol com a dissolvent sempre i quan, un cop preparat el radiocompost la concentració d'etanol en solució no superi el 5%. En el nostre cas el major percentatge d'etanol era aproximadament del 3% en addicionar 20 μ L de la solució amb PPh_3 .

Amb aquest procediment experimental, fent reaccionar primerament el ditiocarbamat amb el tecneci carbonil durant 10 minuts, afegint-hi després la trifenilfosfina, i deixant reaccionar 30 minuts més, només es varen poder obtenir rendiments pròxims al 85% en el millor dels casos. Les condicions van ser de pH 6.5, temperatura de 45 °C i 20 μ L de la solució de PPh_3 . El 15% restant de radiació corresponia a un complex intermedi estable no identificat, format entre el ditiocarbamat i

el carbonil de tecneci. La identificació d'aquest pic, va ser possible gràcies als estudis previs realitzats on es feien reaccionar cadascun dels reactius per separat amb el complex tecneci carbonil. Tot i que no es té cap dada estructural d'aquest compost, ja que no s'ha pogut comparar el seu temps de retenció amb cap homòleg de reni, podria tractar-se d'un dímer de tecneci (Figura 72) amb dos lligands ditiocarbamat fent de pont. Aquest tipus de compostos ja han estat descrits en la bibliografia i se'n coneix perfectament l'estructura.¹²¹ Amb la finalitat d'evitar la formació d'aquest subproducte de reacció, es va decidir realitzar la síntesi dels radiocompostos de tecneci en un sol pas de reacció.

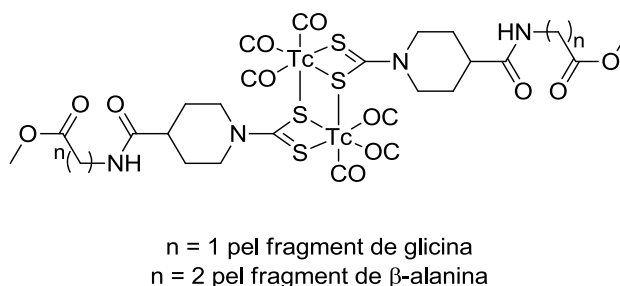


Figura 72. Estructura proposada pel subproducte obtingut entre el tecneci carbonil i el corresponent ditiocarbamat.

Amb aquest nou procediment experimental i emprant les millors condicions de reacció trobades anteriorment, es varen poder obtenir els productes desitjats **13** i **14** amb pureses superiors al 97% (Figura 73). Cal remarcar que aquests elevats graus de puresa s'obtenen tot i que la concentració dels reactius de partida, complexos **5** i **6**, és del ordre de 10^{-5} M. Aquestes concentracions es varen determinar mitjançant la tècnica de plasma d'inducció acoblada (ICP), mesurant mostres de complexos saturades a 45 °C i microfiltrades a temperatura ambient. Amb aquests valors de concentració i tenint en compte que $[^{99m}\text{Tc}] \approx 10^{-7}$ M, el valor calculat de la relació [biomolècula marcada] / [biomolècula no marcada] és de 10^{-2} . Un ordre de magnitud superior als procediments emprats avui dia. Aquest excel·lent resultat confirma la hipòtesi de partida i fa possible la preparació de radiofàrmacs d'elevada activitat específica, ja que disminueix la competència entre les molècules marcades i les no marcades pel seu receptor diana (Figura 43, pàg. 57).

¹²¹ Miroslavov, A. E.; Sidorenko, G. V.; Suglobov, D. N.; Lumpov, A. A.; Gurzhiy, V. V.; Grigorev, M.S.; Mikhalev, V. A. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 1098.

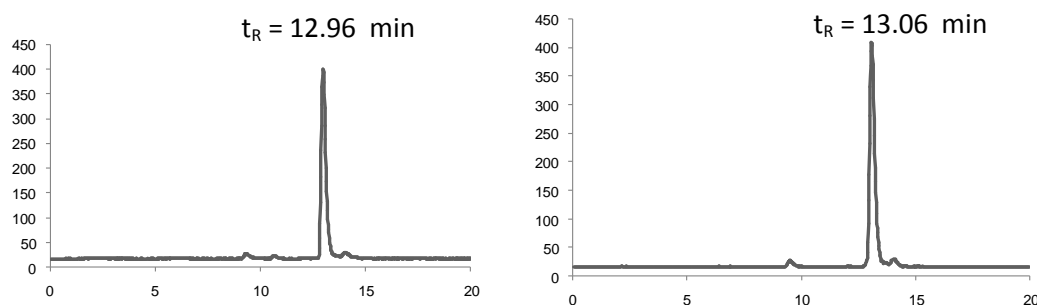


Figura 73. Cromatogrames dels complexos **13** (t_R 12.96 min) i **14** (t_R 13.06 min). Temps de retenció dels homòlegs de reni: **9** (t_R 12.57 min) i **10** (t_R 12.66 min).

Abans de procedir a la síntesi dels dos complexos de tecneci restants es va realitzar un estudi d'estabilitat d'un dels complexos de tecneci (**13**) per a determinar la viabilitat del set coordinatiu $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ (SS = ditiocarbamat, P = fosfina) com a radiofàrmac. Per a tal fi, es varen realitzar una sèrie de proves com són: (a) estabilitat enfront la dilució, (b) estabilitat enfront de cisteïna i; (c) unió a proteïna sèrica.

2.3.2. Estabilitat enfront la dilució del complex 13

El que es pretén avaluar en aquesta prova és l'estabilitat del compost un cop injectat en sang. Cal tenir present que el volum de sang d'una persona adulta d'uns 70 kg de pes és aproximadament 5 litres, per tant, un cop injectat el radiofàrmac aquest es dilueix ràpidament en el torrent sanguini. Per a realitzar aquesta prova es varen preparar una sèrie de dilucions: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 del radiocompost en solució salina (0.9%) i 0.1M de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH = 7. Les solucions es varen incubar a temperatura ambient i es varen analitzar mitjançant HPLC en diferents intervals de temps: 3, 6 i 24 h.

Test d'estabilitat enfront dilució

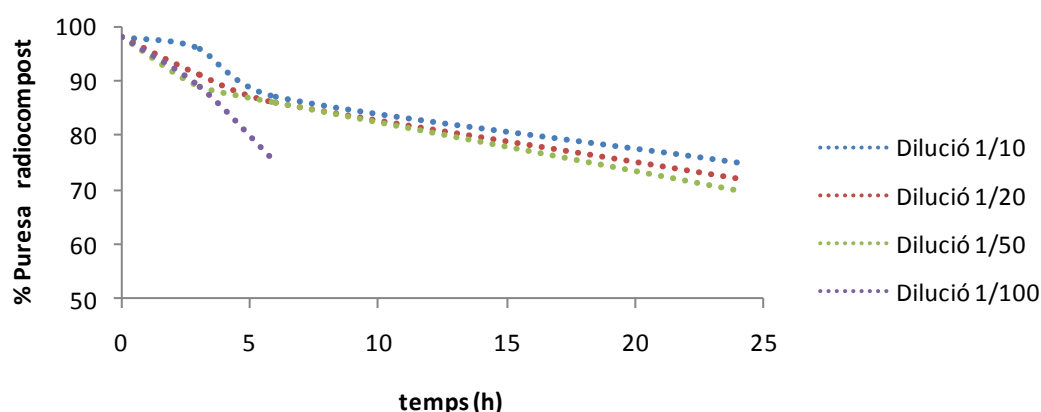


Figura 74. Variació del percentatge de puresa de cadascuna de les dilucions amb el temps.

En els resultats obtinguts presentats en el Figura 74 es pot observar que el complex **13** presenta una bona estabilitat enfront de la dilució fins a un temps de 3 hores, temps en el qual la puresa del compost és en tots els casos pròxima al 90%. A partir d'aquest temps la puresa del radiocompost pateix una forta davallada i cau fins al 75% en 6 hores en el pitjor dels casos (dilució 1/100) .

2.3.3. Estabilitat del compost 13 en cisteïna

La finalitat d'aquesta prova és avaluar l'estabilitat del radiocompost en presència d'un lligand fortament coordinant com és la cisteïna, la qual es troba present formant part de nombroses proteïnes de la sang. Aquest experiment servirà per determinar si un cop injectat en sang, el radiocompost manté la seva estructura estable o per contra algun dels lligands es reemplaça per una o varies cisteïnes.

Es varen preparar tres solucions del radiocompost **13** en presència de l'aminoàcid cisteïna a diferents relacions molars: 1:5, 1:50, 1:500 en 0.1 M PBS pH = 7. Aquestes tres solucions es varen incubar durant 1 hora a 37 °C i posteriorment es varen analitzar per HPLC (Figura 75).

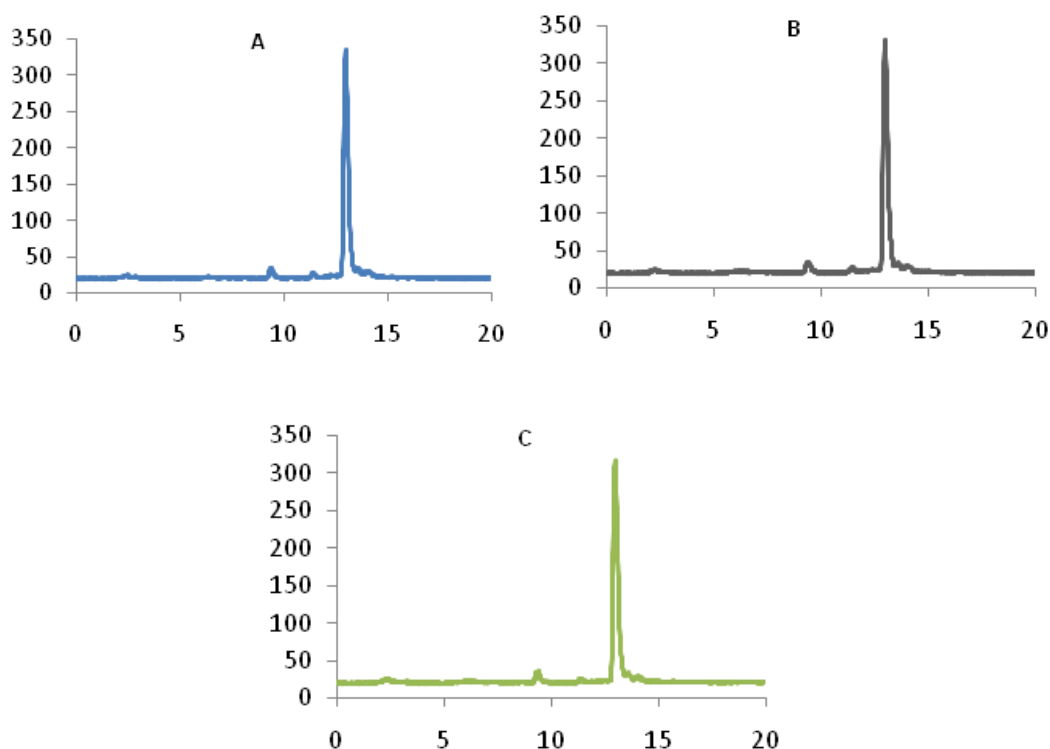


Figura 75. Cromatogrames compost **13** en cisteïna PBS 0.1 M pH=7 A) 1:5 B) 1:50 C) 1:500

Com es pot observar en els cromatogrames en tots tres casos el complex **13** no es va veure afectat per la presència de cisteïna fet que demostra que el set coordinatiu $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ és prou estable i adient per a una futura aplicació en radiofarmàcia.

2.3.4. Unió a proteïna sèrica

Aquest test pretén donar una idea de quin serà el comportament del radiofàrmac en sang. És una primera aproximació per a poder avaluar la farmacocinètica del complex. Una forta unió a les proteïnes de la sang impediria que el radiofàrmac pugui interaccionar amb el receptor diana i tard o d'hora acabar sent destruït al fetge. Per a duu a terme aquest experiment, es va preparar una solució del radiocompost **13** en sèrum humà. Aquesta solució es va incubar a 37 °C durant 1 hora i es va seguir l'evolució per HPLC amb una columna d'exclusió molecular. Una unió forta del complex a les proteïnes de la sang es traduirà en un radiocromatograma amb un únic pic a temps de retenció curt, ja que el radiocomplex es trobarà adsorbit sobre les proteïnes i com que aquestes tenen valors molt alts de pes molecular no quedaran retingudes en la columna. Per tal

d'identificar els pics primerament es cromatografiaren per separat les proteïnes sense el complex de tecneci (HPLC/UV-Vis. Figura 76.B).

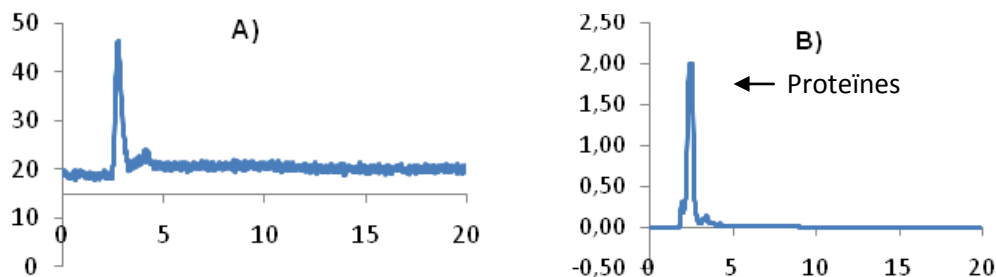
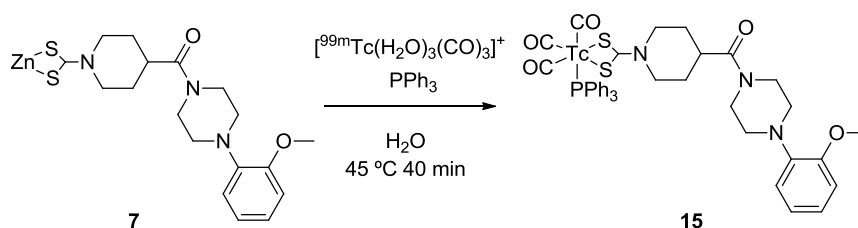


Figura 76. Cromatogrames a 1 hora A) detector de radioactivitat B) UV-Vis a 265 nm.

Com es pot observar en el radiocromatograma (Figura 76.A) obtingut després d'una hora d'incubació, el compost **13** es troba totalment unit a les proteïnes de la sang. Per aquest motiu, es va decidir interrompre l'anàlisi. Es va concloure que el compost **13** presenta una forta interacció amb les proteïnes de la sang, probablement atribuïble al fort caràcter hidrofòbic dels anells aromàtics de la trifenilfosfina. Això fa replantejar l'ús de la trifenilfosfina com a lligand monodentat per modificar la farmacocinètica del complex. Com s'ha comentat anteriorment (Apartat 1.1.3.2. del capítol III), aquest canvi no implica en cap cas haver de modificar el ditiocarbamat (aproximació $[2_B+1]$).

Amb tots els resultats obtinguts en la preparació dels complexos de tecneci i l'avaluació del set coordinatiu $[Tc(CO)_3(SS)(P)]$, es va decidir procedir en la síntesi dels dos últims complexos de tecneci amb els fragments amines 1-(2-metoxifenil)piperazina i D-(+)-glucosamina emprant les mateixes condicions de reacció.

Malauradament, per culpa d'un canvi administratiu (relacionat amb la manipulació de material radioactiu) al centre on s'estaven realitzant els estudis de marcatge amb tecneci-99m, no es van poder completar aquests estudis. Per aquest motiu, el treball de marcatge de les biomolècules ha quedat inacabat. A continuació es presenta l'única prova que es va poder realitzar. Es tracte de la reacció de transmetal·lació amb el complex de zinc **7**. Es va procedir al marcatge del fragment de 1-(2-metoxifenil)piperazina, utilitzant les mateixes condicions (temperatura, temps, etc.) emprades en la preparació dels complexos anteriors i amb un sol pas de reacció.



Esquema 35. Preparació del complex de tecneci-99m carbonil **15** mitjançant una reacció de transmetal·lació.

En analitzar la solució resultat mitjançant RHPLC (Figura 77) es va poder observar la formació majoritària (>75%) del producte desitjat ($t_R = 12.86$ min), junt amb un segon pic amb un temps de retenció superior (14.20 min) el qual no es va poder determinar de quin compost es tractava. Cal destacar que, com que es tracta d'un complex de zinc molt diferent als estudiats anteriorment (**5**, **6**), no és un fet sorprenent que s'hagi de fer lleugeres modificacions en les variables de reacció, per tal d'obtenir alts rendiment radioquímics. No obstant, el resultat obtingut en aquest primer assaig fa pensar que la metodologia dissenyada en la preparació de radiofàrmacs de tecneci de segona generació pot ser aplicable a diferents biomolècules.

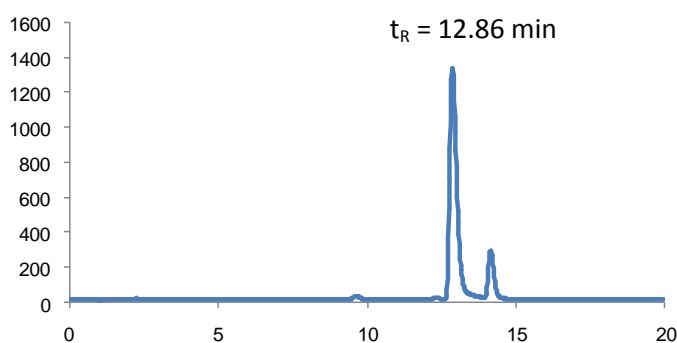


Figura 77. Cromatograma del complex **15** (t_R 12.86 min). Temps de retenció del homòleg de reni: **11** (t_R 12.47 min).

3. CONCLUSIONS

S'han sintetitzat i caracteritzat els complexos de zinc **3** i **4**. La nova metodologia sintètica portada a terme per la preparació d'aquest dos nous ditiocarbamats de zinc (II), ha permès obtenir els dos complexos amb rendiments elevats. En el cas del complex **4**,

l'ús del agent d'acoblament TSTU ha resultat ser clau per aconseguir una alta puresa del producte sense emprar tècniques de purificació tedioses.

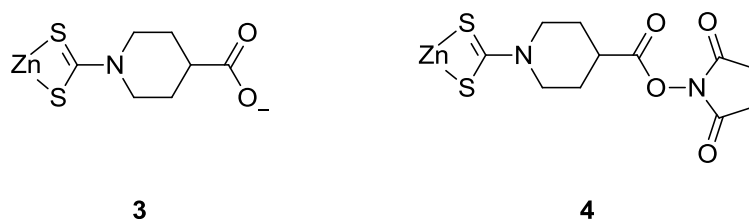


Figura 78. Complexos de Zn (II) ditiocarbamat **3** i **4**.

S'ha provat la reacció de bioconjugació entre el complex **4** i diferents tipus d'amines. En tots el casos el rendiments de la reacció han estat quantitius ja que no s'ha detectat mai la presència del complex de partida en els productes finals i tampoc l'existència d'altres subproductes de la reacció. A més a més, la metodologia emprada (precipitació del producte en el si de la solució) ha permès l'obtenció dels productes **5-8** purs i sense haver de recristal·litzar-los. Els excel·lents resultats obtinguts amb diferents tipus d'amines amb o sense la presència d'altres substituents mostren que el complex **4** pot ser un excel·lent "synthon" per a la preparació d'un ampli ventall de complexos de zinc bioconjugats.

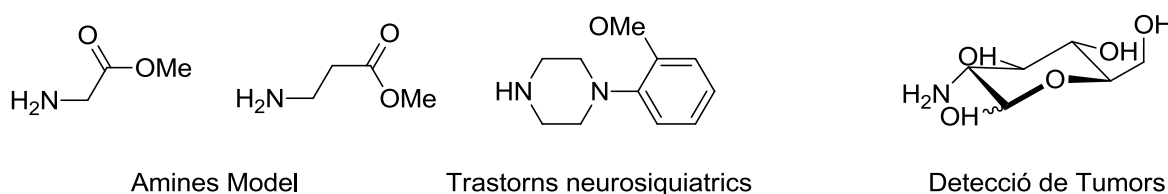
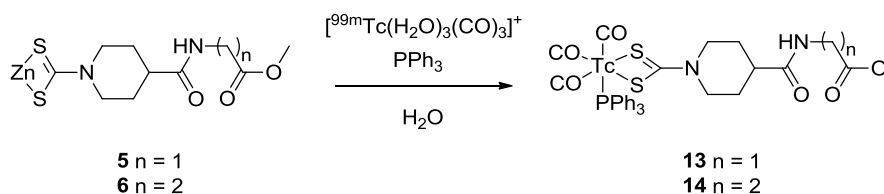


Figura 79. Amines assajades en la reacció de bioconjugació.

L'estudi de la reacció de transmetal·lació amb el precursor de $[\text{Re}(\text{Br})_3(\text{CO})_3]^{2-}$ en presència de trifenilfosfina ha donat lloc als complexos **9-12**. Les dades espectroscòpiques, espectromètriques i la difracció de raig X del complex **10** confirmen la presència del set coordinatiu $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ en tots ells. Aquests complexos serviran com a compostos model per a la caracterització dels complexos homòlegs de tecneci.

S'ha posat a punt la reacció de transmetal·lació entre els complexos de zinc bioconjugats amb les amines model (**5** i **6**) i el radiocompost $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. S'han caracteritzat els radiocompostos de tecneci-99m **13** i **14** mitjançant la tècnica de RHPLC, comparant els temps de retenció d'aquests amb els dels complexos de reni homòlegs sintetitzats prèviament **9** i **10**. L'estabilitat del set coordinatiu $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ ha estat confirmada amb experiments *in vitro* (estabilitat enfront la dilució i estabilitat en presència de cisteïna).



Esquema 36. Preparació dels radiocompostos **13** i **14**.

La reacció de transmetal·lació, portada a terme en condicions de radiofarmàcia, ha resultat quantitativa en els casos estudiats i s'han pogut obtenir rendiments radioquímics superiors al 95%. Les mesures amb ICP-OES han demostrat que aquests rendiments són possibles amb concentracions dels complexos de zinc extremadament baixes ($\mathbf{5} \approx 4.7 \cdot 10^{-5} \text{M}$ i $\mathbf{4} \approx 1 \cdot 10^{-5} \text{M}$). Aquest resultat confirma la hipòtesi de partida, mostrant que aquest procediment permet marcar biomolècules amb una relació $[\text{biomolècula marcada}] / [\text{biomolècula no marcada}]$ molt superior a les obtingudes amb altres procediments.

Capítol IV

Estudi de la interacció de les Metal·lotioneïnes
de mamífer amb els fragments *fac*- $\{M(CO)_3\}$
(M=Re, Tc)



1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1. Introducció

1.1.1. Metal·loproteïnes

Metal·loproteïna és un terme genèric per anomenar proteïnes que contenen en la seva estructura un o varis ions metàl·lics. Aquests ions metàl·lics solen actuar en la majoria dels casos com a cofactors desenvolupant un rol important en els organismes (enzims, proteïnes de transport i/o emmagatzematge, etc...). Per a poder desenvolupar la seva funció en els organismes, els diferents ions metàl·lics es troben enllaçats i/o envoltats per diversos grups orgànics que els confereixen estabilitat *in vivo*. L'àtom metàl·lic sol estar enllaçat a la proteïna per àtoms de nitrogen, oxigen o sofre els quals poden provenir d'un lligand macrocíclic (anell de porfirina) o dels residus d'aminoàcids de la cadena polipeptídica (cisteïnes, histidines, etc.).



**Cofactors
Metàl·lics**

Figura 80. Metal·loproteïna on es mostren els ions metàl·lics en l'interior de l'estructura.

1.1.2. Metal·lotioneïnes

Les metal·lotioneïnes (MTs) són una família de proteïnes de cadena simple i baix pes molecular (entre 6000 i 7000 kDa) amb gran capacitat per enllaçar metalls pesants tant fisiològics¹²² (Zn, Cu, etc.) com xenobiòtics (Pb, Cd, Hg, etc.) (Figura 81) gràcies a l'elevat nombre de cisteïnes repartides uniformement al llarg de la cadena, les quals representen el 30% del total d'aminoàcids de la proteïna.

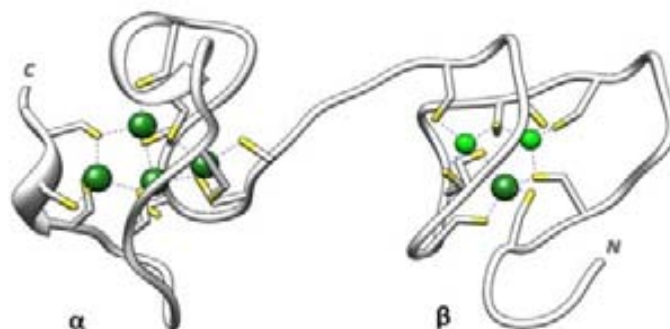


Figura 81. Estructura del complex Cd_5Zn_2 -MT de la isoforma MT2 de metal·lotioneïna de mamífer.

Tot i que les funcions de les MTs són encara matèria de debat és sabut que tenen una gran capacitat per complexar metalls de transició. En l'àmbit d'aquest treball, cal destacar que hi ha pocs treballs a la bibliografia dedicats a l'estudi de la seva interacció amb tecneci o reni i a les seves possibles aplicacions en radiofarmàcia. Entre els pocs treballs recollits en la bibliografia es poden diferenciar per una part: (a) estudis de reactivitat entre MTs i el fragment $\{TcO^{3+}\}$ ^{123,124} i (b) estudis preclínic amb MTs bioconjugades a altres proteïnes (estreptavidina,^{125,126} anticossos¹²⁷⁻¹²⁹). La bioconjugació de les MTs a altres proteïnes és possible mitjançant tècniques d'ADN recombinant, les quals suposen una bona alternativa als mètodes de síntesi més tradicionals. És

¹²² Cols, N.; Romero-Isart, N.; Capdevila, M.; Oliva, B.; González-Duarte, P.; González-Duarte, R.; Atrian, S. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 68, 157.

¹²³ Morelock, M. M.; Cormier, A. T.; Tolman, G. L. *Inorg. Chem.* **1988**, 28, 3137.

¹²⁴ Jones, W. B.; Elgren, T. E.; Morelock, M. M.; Elder, R. C.; Wilcox, D. E. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 5571.

¹²⁵ Virzi, F.; Winnard, P.; Fogarasi, M.; Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J. *Bioconjugated Chem.* **1995**, 6, 139.

¹²⁶ Sano, T.; Glazer, A. N.; Canton, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1534.

¹²⁷ Behr, T. M.; Becker, W. S.; Klein, M. W. *Cancer Res* **1995**, 55, 5786.

¹²⁸ Burchiel, S. W.; Hadian, R. A.; Hladik, W. B.; Drozynski, C. A.; Tolman, G. L.; Haber, S. B.; Gallagher, B. M. *J. Nucl. Med.* **1989**, 30, 1357.

¹²⁹ Pietersz, G. A.; Patrick, M. R.; Chester, K. A. *J. Nucl. Med.* **1998**, 39, 47.

precisament aquest últim punt el que fa tant atractiu l'ús de les metal·lotioneïnes com a BFCA's per a la preparació de radiofàrmacs de segona generació (Figura 82).

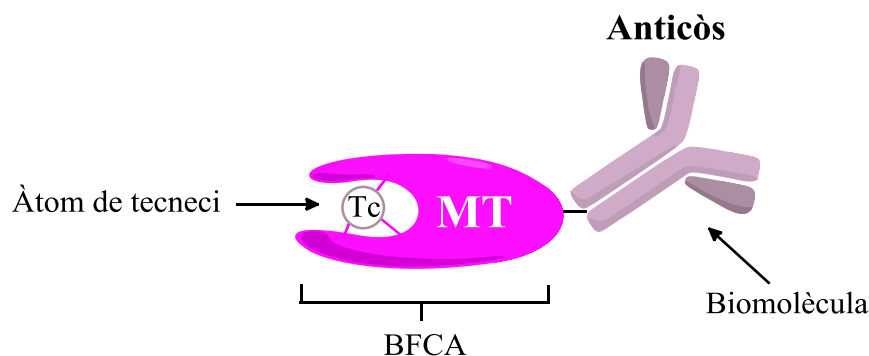


Figura 82. Representació d'un radiofàrmac de segona generació tipus Tc-MT-Anticòs.

1.1.2.1. Producció de les MTs

Una possible explicació als pocs estudis bibliogràfics existents sobre la interacció del tecneci amb les MTs podria ser que fins fa pocs anys no s'havia desenvolupat una metodologia que permetés obtenir aquestes metal·loproteïnes amb els graus de puresa i en les quantitats adequades com per dur a terme aquest estudis. D'ençà del seu descobriment per Margoshes i Valle l'any 1957,¹³⁰ les MTs natives havien estat produïdes mitjançant una prèvia inducció en els seus organismes hostes utilitzant un estímul extern (elevades concentracions de metalls, estrès oxidatiu, radiació UV, infeccions víriques, etc.), seguit del seu aïllament i purificació a partir dels òrgans on es sintetitzen en major quantitat. Són precisament aquests dos últims punts els que presentaven una major problemàtica alhora de purificar i obtenir la proteïna amb una qualitat i quantitat acceptable. La producció d'una proteïna a partir d'organismes nadius o d'òrgans aïllats és una tasca difícil i llarga que no sempre condueix a un bon resultat. Altres procediments com la síntesi de cadenes peptídiques¹³¹ sobre suport sòlid tampoc presentaven grans avantatges degut als llargs temps de preparació i als elevats costos de producció, així com a la facilitat d'oxidació del seu elevat nombre de residus cisteïnics.

¹³⁰ Margoshes, M.; Valle, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4813.

¹³¹ Federigos, N.; Zikos, C. *Essays Contemp. Pep. Sci.* **2011**, *19*.

Aquests problemes es varen poder solucionar a mesura que es van anar implementant les tècniques de l'Enginyeria Genètica, ja que aquesta permet la bioproducció de MTs recombinants a partir de microorganismes modificats genèticament. La metodologia de l'enginyeria genètica o de l'ADN recombinant permet utilitzar cèl·lules bacterianes, de llevat o de mamífer, per a sintetitzar productes heteròlegs. És a dir, propis d'una altre espècie. Així, per sintetitzar una MT recombinant s'introdueix a una cèl·lula hoste el gen que conté la informació genètica tant per produir com per induir la producció d'una molècula heteròloga. Un cop la cèl·lula hoste té incorporat el material genètic (ADN vector), aquesta es fa créixer en un medi de cultiu ric tant en els nutrients essencials com en els factors que indueixen la producció de la proteïna. En acabar la producció, es lisa la paret cel·lular de la cèl·lula hoste alliberant la proteïna al medi extracel·lular i aquesta es separa de la resta de material mitjançant cromatografia d'afinitat. El resultat final és una solució aquosa que conté única i exclusivament la proteïna d'interès.

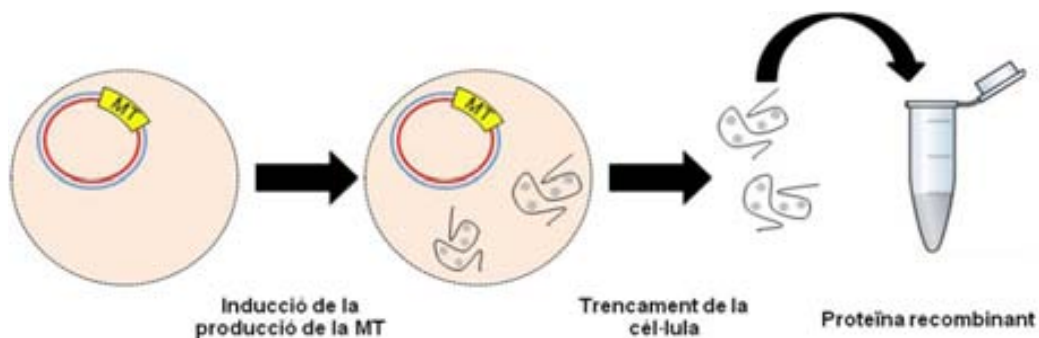


Figura 83. Esquema de la síntesi i purificació de les MTs obtingudes mitjançant Enginyeria Genètica.

1.1.2.2. MTs de mamífer

Les diferents isoformes de MTs de mamífer¹³²⁻¹³⁴ han estat força estudiades i actualment es coneixen molts aspectes d'aquestes proteïnes, tant a nivell biològic (expressió gènica, situació en els diferents òrgans i teixits,...) com químic (capacitat coordinant envers metalls, tipus d'agregats metàl·lics, estructura,...).

¹³² Bell, S. G.; Vallee, B. L. *Chem. Bio. Chem.* **2009**, 10, 55.

¹³³ Lia, Y.; Maret, W. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 1055.

¹³⁴ Faller, P.; *FEBS. J.* **2010**, 277, 2921 (and references therein).

L'evolució de les espècies ha dotat als mamífers amb quatre isoformes de MTs diferents (MT1, MT2, MT3 i MT4), les quals es troben a diferents òrgans o teixits. De les quatre isoformes existents en mamífers, MT1 i MT2 es sintetitzen durant tot el desenvolupament i en tot tipus de cèl·lules. MT3 es troba en el sistema nerviós central, la glia, el pàncrees i en els òrgans reproductors masculins. Finalment, MT4 es troba únicament en l'epiteli estratificat escamós diferenciat (pell, llengua, esòfag) i durant el desenvolupament embrionari.

Totes les MTs de mamífer emprades en la present tesi doctoral consisteixen en una cadena polipeptídica, d'entre 61 i 68 aminoàcids. L'estructura tridimensional dels complexos d'aquestes MTs amb metalls divalents es sap que és del tipus "dumbbel like" o de pesa, amb dos dominis globulars (α i β) capaços d'unir fins a 7 ions metàl·lics divalents (3 en el domini β i 4 en el α). Les quatre MTs de mamífer que s'han utilitzat en aquest treball (Figura 84) contenen 20 residus de cisteïna (C) distribuïts uniformement al llarg de la seva seqüència peptídica amb una elevada homologia. Així, les diferències estructurals entre aquestes isoformes no es troben en la posició dels seus residus de cisteïna sinó, la resta de residus coordinants. Addicionalment, MT3 mostra una inserció de 6 aminoàcids en el seu domini α .

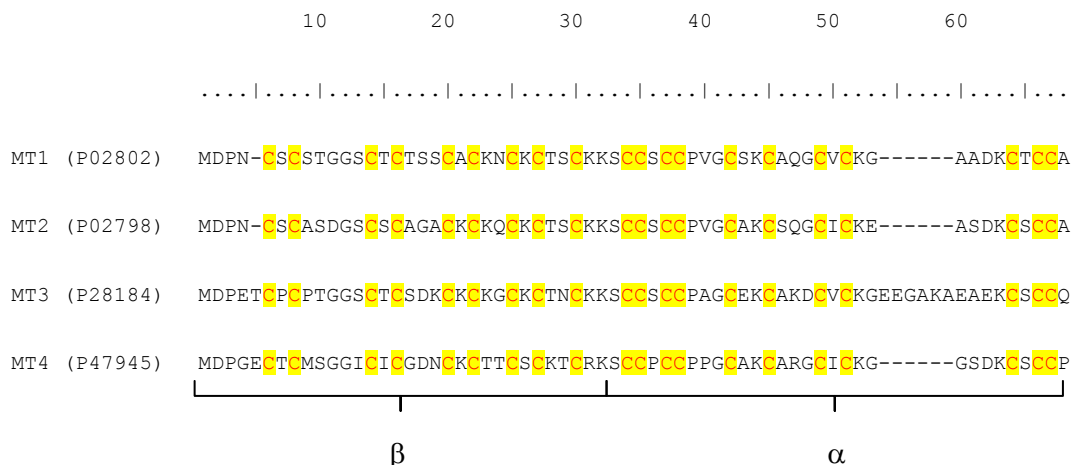


Figura 84. Seqüència d'aminoàcids de les quatre isoformes de MT de ratolí emprades en la present tesi doctoral. Les seqüències han estat extretes de la base de dades uniprot. [www.uniprot.org]

1.1.2.3. Classificació

D'ençà del seu descobriment, les MTs han estat classificades de diferents maneres. Les primeres classificacions, MTs de classe 1, 2 o 3, estaven basades en les similituds o diferències de l'estructura primària de les proteïnes conegudes envers la primera MT descoberta, la isoforma MT1 de cavall (Fowel et al,¹³⁵ 1987). Més tard es varen agrupar en funció de la seva filogènia (Binz i Kagi,¹³⁶ 2001), cosa que va donar lloc a pràcticament tants tipus de MTs com d'espècies conegudes. No obstant, cap d'aquestes dues classificacions tenien en compte les capacitats coordinants de les proteïnes, i per tant, resultaven poc útils per a l'estudi de la seva reactivitat envers els metalls pesants. Per aquest motiu, a inicis de la dècada dels 2000, el grup de recerca en el que s'emmarca aquesta tesi doctoral, va proposar un nou tipus de classificació basat en el seu caràcter de **Zn-tioneïna** o **Cu-tioneïna**.¹³⁷⁻¹³⁹ La definició d'aquest caràcter ve donat per: (a) la tendència d'aquestes proteïnes a formar *in vivo* una única espècia homometàl·lica, en presència dels metalls zinc o coure i; (b) la capacitat de bescanvi d'aquests per altres metalls. Amb aquesta nova classificació, les metal·lotioneïnes de mamífer ja no cauen totes dins del mateix bloc, com passava amb les classificacions antigues, sinó que es reparteixen gradualment en una escala que va des de les MTs de caràcter Zn-tioneïnes extremes fins a les que són Cu-tioneïnes genuïnes. Així doncs, MT1 i MT2, les quals formen espècies estables amb 7 zincs enllaçats són definides com a Zn-tioneïnes, mentre que MT3 que no es capaç de formar una única espècie en presència de Zn²⁺ tindria caràcter de Cu-tioneïna. D'altra banda MT4 es trobaria en una posició intermèdia entre MT1 i MT3 en aquesta classificació ja que tot i formar una única espècie en presència del metall zinc, el clúster format no és tant estable ni estructurat com el de MT2 i MT1, bescanviant amb relativa facilitat els ions zinc per altres metalls com poden ser Cd i Cu. Seguint amb aquest raonament, MT3 i MT4 donen lloc a espècies pures homometàl·liques, Cu-MT, quan s'obtenen en medis rics en Cu, mentre MT1 i MT2 generen mesclades d'espècies heteronuclears, (Cu,Zn)-MT, en les mateixes condicions.

¹³⁵ Fowler, B. A.; Hildebran, C. F.; Kojima, Y.; Webb, M. *Methalothioneins II* Kagi, J. H. R.; Kojima, Y. (eds) 52 Birkhäuser Basel, **1987**, 19.

¹³⁶ Kagi, J. H.R.; Valle, B. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 3460.

¹³⁷ Valls, M.; Bofill, R.; Gonzalez-Duarte, R.; Gonzalez-Duarte, P.; Capdevila, M.; Atrian, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 32835.

¹³⁸ Bofill, R.; Capdevila, M.; Atrian, S. *Metallomics* **2009**, 1, 229.

¹³⁹ Palacios, O.; Atrian, S.; Capdevila, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 991.

1.2. Objectius

El principal objectiu plantejat en aquest capítol és avaluar la capacitat coordinant de les quatre isoformes de metal·lotioneïna de mamífer (MT1, MT2, MT3 i MT4) enfront el fragment organometàl·lic $fac\{-Tc(CO)_3\}$. És important destacar que en la bibliografia no hi ha cap estudi disponible sobre la interacció de metal·lotioneïnes amb fragments organometàl·lics com el $fac\{M(CO)_3\}$ ($M = Re, Tc$). Així, aquest objectiu té un component novedós ja que és el primer estudi del comportament d'una metal·lotioneïna amb una espècie metàl·lica que té bloquejats tres dels sis punts de coordinació del metall

Per assolir aquest objectiu s'ha dissenyat la següent metodologia:

(A) Estudiar la interacció del fragment de reni carbonil com a substitut del tecneci mitjançant tècniques espectroscòpiques (DC i UV-Vis), les quals aporten informació sobre el trencament i la formació d'enllaços metall-tiolat, o espectromètriques (EM), que ens permetran determinar les espècies presents en solució. El procediment constarà de l'addició de diferents equivalents d'una solució estandarditzada de reni a una mostra de MT de concentració coneguda en la seva forma Zn-MT.

(B) Un cop completat l'estudi amb reni es repetirà la mateixa metodologia amb tecneci-99. Per a poder disposar d'una solució enriquida amb tecneci-99 es deixarà decaure un generador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$ durant un llarg període. Això ens proporcionarà solucions aquoses del isòtop ^{99}Tc amb concentracions variis ordres de magnitud superiors als preparats radiofarmacèutics.

Finalment, es compararan els resultats obtinguts amb les dades bibliogràfiques disponibles amb altres metalls i s'intentarà establir una relació entre la capacitat de cada isoforma de MT per enllaçar els fragments $fac\{M(CO)_3\}$ i el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïna.

2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Abans de començar amb la discussió dels resultats obtinguts, és important comentar que la producció de totes i cadascuna de les metal·loproteïnes utilitzades ha estat portada a terme pel grup que dirigeix la Dra. Sílvia Atrian del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona mitjançant tècniques d'ADN recombinant, les

quals han permès obtenir solucions concentrades de les metal·loproteïnes desitjades en medi aquós i alt grau de puresa. Totes les metal·lotioneïnes estudiades es trobaven inicialment carregades de Zn, la majoria d'elles en forma de Zn₇-MT.

2.1. Estudi de la interacció de les metal·lotioneïnes de mamífer amb el fragment organometàl·lic *fac*-{Re(CO)₃}

2.1.1. Estudi preliminar per espectroscòpies de dicroisme circular i ultraviolat visible

Abans de realitzar l'estudi de marcatge amb tecneci de les metal·loproteïnes es va avaluar el comportament d'aquestes en front del metall reni, com a substitut del tecneci (química freda del reni). Les metal·lotioneïnes a estudiar van ser les quatre isoformes de mamífer esmentades en l'apartat de la introducció d'aquest capítol.

Una de les metodologies més habituals per a l'estudi del intercanvi de metalls en les metal·lotioneïnes és l'ús de les tècniques espectroscòpiques de dicroisme circular (DC) i ultraviolat-Visible (UV-Vis).¹³⁹ L'ús en paral·lel d'aquestes dues tècniques aporta informació referent a la formació o trencament d'enllaços tipus metall-tiolat (M-S) i a l'estructuració de la proteïna entorn el metall. La variació dels espectres en afegir cada equivalent de metall permet conèixer si hi ha un intercanvi de metalls en la proteïna. Per a portar a terme aquesta metodologia és imperatiu disposar d'una solució estandarditzada del metall, que permeti l'addició de quantitats controlades d'aquest. Per a realitzar els estudis de DC i UV-Vis es va triar el precursor [Re(CO)₅O₃SCF₃], que, com ja s'ha explicat a l'apartat 2.3.1. del capítol II, mitjançant un reflux en aigua permet obtenir solucions aquoses del compost [Re(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Malgrat els equilibris àcid-base explicats anteriorment (veure apartat 2.3.1. del capítol II), es coneix que el complex reni tricarbonil és estable en medis àcids i per tant, és possible l'estandardització d'una solució d'aquest en medi aquós. Així doncs, es va preparar una solució del complex [Re(H₂O)₃(CO)₃]⁺ i es va determinar la seva concentració mitjançant la tècnica de plasma d'inducció acoblada amb detecció per espectroscòpia d'emissió òptica (ICP-OES).

En un primer estudi es va decidir seguir l'evolució dels espectres de DC i UV-Vis de la proteïna MT1, Zn₇-MT1, en afegir quantitats conegudes del complex [Re(H₂O)₃(CO)₃]⁺. L'espectre de DC inicial de Zn₇-MT1 ([MT1]= 10 μM pH 7) presenta

una banda (*exciton coupling*) característica a 240 nm, que correspon als cromòfors Zn(SCys)₄.

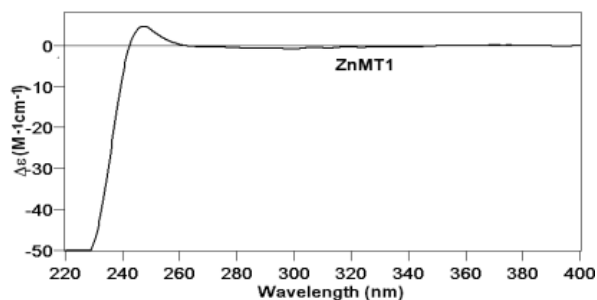


Figura 85. Espectre de DC de Zn₇-MT1. “Exciton coupling” característic a 240 nm.

En addicionar fins a 5 equivalents del complex de reni tricarbonil a aquesta preparació, l'absorció Zn(SCys)₄ no va experimentar cap canvi substancial. Per aquest motiu, és va decidir augmentar la temperatura i així afavorir el intercanvi dels zincs inicialment coordinats per reni. Aquest comportament és coherent amb la química de reni (veure apartat 1.3.3. Capítol I), ja que es tracta d'un element força inert en les reaccions de bescanvi de lligands. La bona estabilitat tèrmica de totes les MTs permet l'augment de la temperatura de la solució sense perill de desnaturalitzar-les. En arribar a 70 °C (Figura 86) es va observar un fort decreixement de la banda a 240 nm corresponent al cromòfor Zn(SCys)₄. No obstant, no es va observar l'augment de cap altra absorció en l'espectre i, per tant, no es va poder afirmar que el fragment organometàl·lic reni carbonil, estigues sent enllaçat per la MT. Cal destacar que, el decreixement de la banda a 240 nm va romandre en refredar novament la solució, fet que es pot explicar-se, si té lloc una substitució parcial dels àtoms de zinc inicialment enllaçats a la proteïna. Un cop acabat l'estudi amb MT1, es va procedir a realitzar els mateixos experiments amb les altres isoformes de MT de mamífer. Malauradament, com que la resta de MTs no presenten una absorció tant marcada en el seu espectre de DC inicial, no es va poder observar cap canvi i per tant no es va poder extreure cap conclusió.

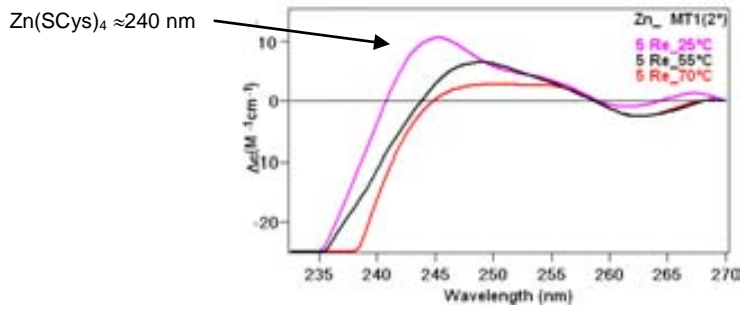


Figura 86. Espectres de DC. Evolució de Zn-MT1 amb temperatura i 5 equivalents de reni.

D’altre banda, l’ús de l’espectroscòpia d’UV-Vis va resultar estèril ja que l’espècie de reni $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ absorbeix en la zona de l’espectre a estudiar, fent impossible una correcta interpretació d’aquest (Figura 87). Això es va corroborar en enregistrar l’espectre de UV-Vis d’una mostra que només contenia el complex $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ i observar que la banda màxima d’absorció coincidia amb la dels cromòfors $\text{Zn}(\text{SCys})_4$ de les MTs.

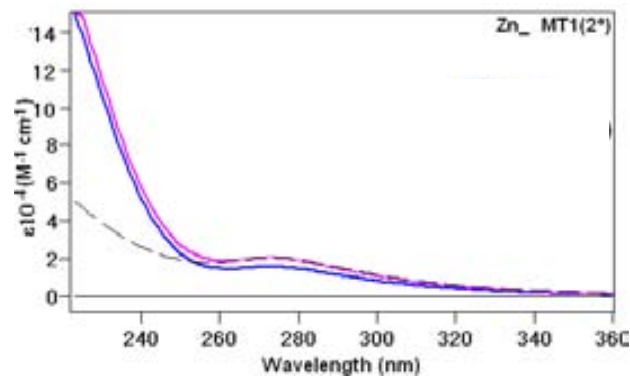


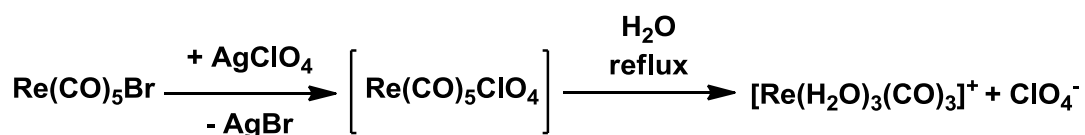
Figura 87. Espectres de UV-Vis. (Blau = $\text{Zn}_7\text{-MT1} + 4 [\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$), (rosa = $\text{Zn}_7\text{-MT1} + 5 [\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$), (línea puntejada = $4 [\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$).

En vista dels resultats obtinguts, es va desestimar l’ús de les tècniques espectroscòpiques i es va procedir a realitzar l’estudi emprant espectrometria de masses per analitzar les mostres i així determinar les espècies presents en solució.

2.1.2. Estudi per espectrometria de masses

Les primeres proves realitzades es varen duu a terme emprant com a precursor de reni estandarditzat el complex habitual $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3][\text{O}_3\text{SCF}_3]$. Amb aquest compost no es va poder obtenir cap tipus d’informació per EM. Aquest resultat es pot

relacionar amb la presència del contraió triflat, el qual possiblement interfereix en els anàlisis de masses no deixant ionitzar correctament les proteïnes. Per aquest motiu, es va haver de preparar un nou precursor de reni que contingues com a contraió l'anió perclorat ($[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3][\text{ClO}_4]$). La síntesi d'aquest nou compost es va aconseguir fent servir un mètode anàleg al emprat pel precursor amb triflat (Esquema 37), on el complex de partida $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$,¹⁴⁰ preparat d'acord amb la literatura, es fa reaccionar amb perclorat de plata. La baixa solubilitat del AgBr format desplaça la reacció i permet l'obtenció del producte amb bons rendiments de reacció (reacció quantitativa). Per aquest motiu, no es necessari aïllar el producte intermedi i es pot fer reaccionar directament amb aigua. Posteriorment aquesta solució es va estandarditzar per ICP-OES com en el cas del compost anterior.



Esquema 37. Preparació del complex $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3][\text{ClO}_4]$ en aigua.

Els experiments van consistir en l'addició de diferents equivalents del complex organometàl·lic de reni a cadascuna de les metal·loproteïnes considerades, inicialment carregades amb zinc. En vista però, dels resultats previs observats en l'espectre de DC, es va decidir augmentar la temperatura a 70°C en cadascuna de les addicions de metall ja que semblava que aquesta era una variable clau per obtenir el bescanvi del zinc per reni. A diferència dels experiments anteriors, es va creure convenient addicionar només fins a 3 equivalents de reni, ja que les baixes concentracions de metall emprades en radiofarmàcia fan que el metall no pugui estar mai en excés respecte la proteïna.

A fi de centrar la discussió en els aspectes més rellevants, només es comentaran les dades més importants de cadascuna de les MTs enfront els equivalents de reni carbonil. Tots els espectres de masses obtinguts es poden consultar al capítol VII.

La isoforma MT3 va ser la que va presentar una major afinitat pel fragment reni carbonil ja que, a diferència de les altres MTs, amb el primer equivalent de reni ja es pot observar la formació d'una espècie heterometàl·lica $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}\text{-Zn}_6\text{-MT3}$ en quantitats

¹⁴⁰ Schmidt, S.P.; Troglor, W. C.; Basolo, F. *Inorg. Synth.* **1985**, 23, 41.

apreciables (Figura 88.A). En agregar fins a 3 equivalents es va poder constatar l'afinitat d'aquesta proteïna pel fragment $fac\{-ReCO_3\}$ ja que el nombre d'espècies mixtes i el contingut de reni van augmentar notablement (Figura 88.B).

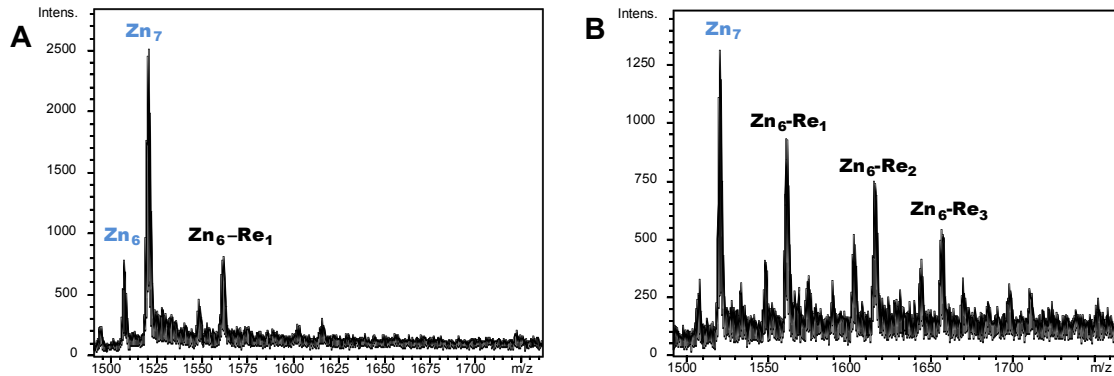


Figura 88. Espectres ESI-MS de Zn-MT3 amb (A) 1 i (B) 3 equivalent(s) del fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$.

Per contra, MT4 mostra molta menys afinitat pel fragment organometàl·lic ja que, tot i l'addició de 3 equivalents de reni, s'observen molt poca quantitat d'espècies mixtes $\{Re(CO)_3\}_2\text{-Zn}_6\text{-MT4}$ i $\{Re(CO)_3\}\text{-Zn}_6\text{-MT4}$ (Figura 89.A), sent l'espècie inicial $\text{Zn}_7\text{-MT}_4$ la majoritària en l'espectre. Un comportament paral·lel a MT4 és el que presentava la isoforma MT2, la qual pràcticament no enllaçava reni fins al tercer equivalent, formant una espècie minoritària que correspon a la substitució d'un àtom de zinc per un fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$ (Figura 89.B).

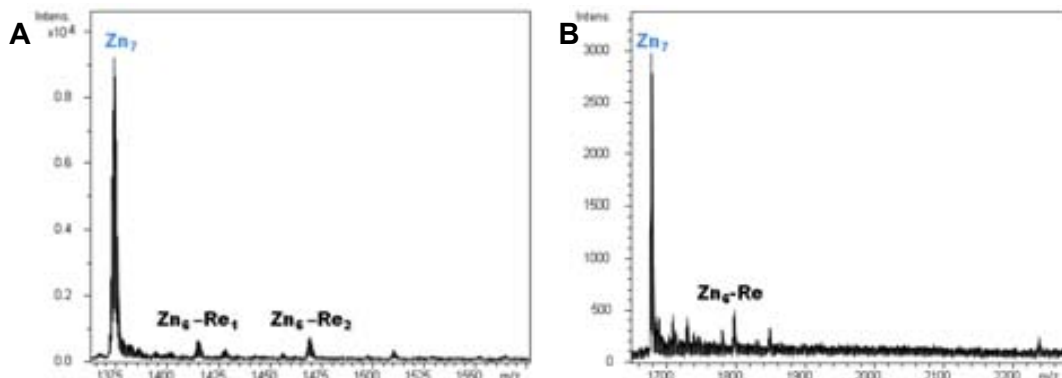


Figura 89. Espectres ESI-MS de 3 equivalents del fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$ amb (A) $\text{Zn}_7\text{-MT}_4$ i (B) $\text{Zn}_7\text{-MT}_2$.

Finalment, pel que respecta a MT1, aquesta mostra un comportament intermediari entre MT3 i MT2/MT4 ja que és capaç d'enllaçar el fragment de reni carbonil en el primer

equivalent (Figura 90.A), però tot i això, en agregar fins a 3 equivalent de *fac*-{Re(CO)₃}, les quantitats d'espècies mixtes formades van ser menors que amb MT3 (Figura 90.B).

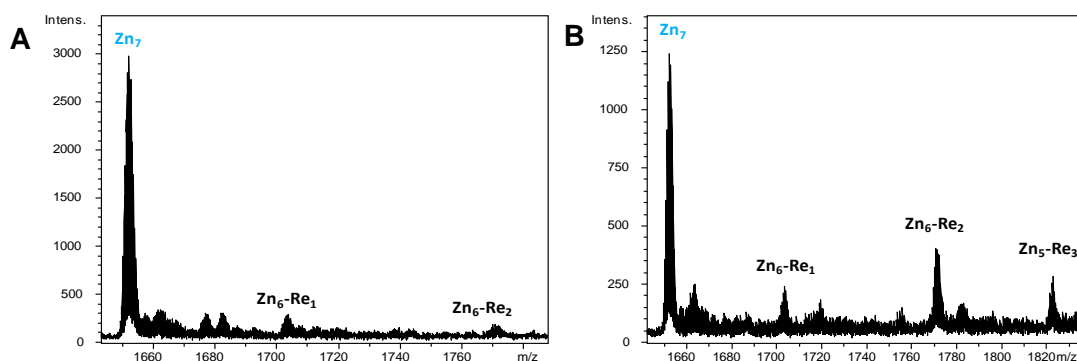


Figura 90. Espectres ESI-MS de Zn₇-MT1 amb (A) 1 equivalent i (B) 3 equivalent(s) del fragment *fac*-{Re(CO)₃}.

Si comparem aquests resultats amb la classificació feta d'aquestes isoformes com a Zn o Cu-tioneïna, s'observa que aquelles que estan clarament classificades com a Zn o Cu-tioneïna manifesten la seva poca o elevada afinitat pel zinc. Seguint amb aquest raonament, MT3 que és clarament la més Cu-tioneïna de les quatre isoformes, perd els zinc coordinats amb molta facilitat, els quals són parcialment substituïts per fragments organometàl·lics *fac*-{Re(CO)₃}. En l'altra extrem, una clara Zn-tioneïna com és MT2, presenta una clara reticència al intercanvi del zinc per reni i només s'observa la formació d'espècies heterometàl·liques molt minoritàries. Els resultats obtinguts amb MT1 i MT4 es desvien lleugerament del que sèrie previsible en base aquesta classificació. Així, la Zn-tioneïna MT1 mostra poca afinitat pel fragment organometàl·lic, però aquesta és lleugerament superior a la que s'observa amb MT4, una isoforma classificada com a intermèdia entre Zn i Cu-tioneïna, respecte les altres.

En vista dels resultats obtinguts, podem afirmar que el diferent comportament de les proteïnes pel que respecte al bescanvi dels seus metalls no es pot explicar únicament per la naturalesa del enllaç, ja que en tots els casos es tracta d'un enllaç Zn-tiolat. A priori, semblaria lògic pensar que degut a la diferència d'energia entre els enllaços Re-S i Zn-S, totes i cadascuna de les MTs estudiades haurien de bescanviar fàcilment els metalls originals pel fragment *fac*-{Re(CO)₃}, a la temperatura a la qual es realitzen els experiments. Un clar exemple d'aquest bescanvi el trobem en el capítol III de la present tesi doctoral on, mitjançant una reacció de transmetal·lació entre un complex amb enllaços Zn-S, és possible l'obtenció amb bons rendiments de complexos de reni

carbonil. Per tant, el fet que no sigui així només es pot explicar pel possible plegament de la proteïna en solució, la qual mantindria els metalls zinc envoltats i protegits per la cadena d'aminoàcids. Com a conclusió, podem afirmar que no es pot extrapolar el comportament de molècules individuals al de les macromolècules biològiques com les proteïnes.

Un altre fet important a destacar és que en cap cas es va observar espècies heterometàl·liques de reni i zinc que continguessin els fragments $\{\text{Re}(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3\}$ o $\{\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})_3\}$. Aquest fet indica que la coordinació del fragment reni carbonil es donaria probablement mitjançant els tres punts d'unió possibles del complex. Seguint aquest raonament, la proteïna es coordinaria al metall reni mitjançant tres sofres cisteïnics generant un tipus de coordinació $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SSS})]$ (Figura 91), que conferiria una gran estabilitat *in vivo* i per tant faria viable l'ús de les MTs com a BFCAs. Malgrat això, no es pot descartar que alguna de les posicions del complex estigui ocupada per un altre àtom donador de la cadena polipeptídica o d'una cadena lateral d'un d'aminoàcid.

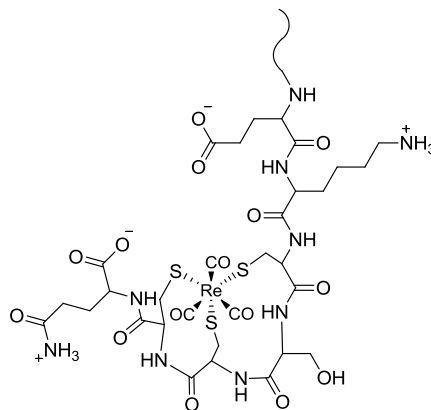


Figura 91. Exemple de coordinació $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SSS})]$ amb la seqüència EKCSQQ corresponent al final del domini α de MT3 (C-terminal).

2.2. Estudi de la interacció de les isoformes de MT de mamífer amb el fragment organometàl·lic de tecneci tricarbonil

Un cop avaluat el comportament de les proteïnes amb el fragment de reni carbonil es va procedir a l'estudi d'interacció d'aquestes amb tecneci. Per a portar a terme aquest estudi es va seguir la mateixa tècnica emprada amb reni (seguiment de la reacció mitjançant EM). Per aquest motiu, el isòtop escollit va ser el tecneci-99 (beta emissor) ja

que la baixa concentració en tecneci d'una mostra amb el isòtop gamma emissor (tecneci-99m) no permetria estudiar-la mitjançant espectrometria de masses. Per l'obtenció d'una solució enriquida amb el isòtop ^{99}Tc es va deixar d'eluir tecneci-99m d'un generador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ durant un període llarg de temps. Durant el temps que aquest generador no va estar sent utilitzat, la columna d'alúmina del interior es va anar enriquint amb tecneci-99. Finalment, quan es va considerar pertinent, es va procedir a l'elució de la columna amb solució salina i es va deixar decaure fins que no tingués pràcticament activitat. Per tal d'estimar la quantitat de massa de tecneci, i així la seva concentració en solució, es va aplicar una fórmula matemàtica que té en compte variables del isòtop de ^{99}Mo com; (a) activitat específica; (b) constant de decaïment; i (c) període de semidesintegració.¹⁴¹

Per tal de preparar el complex $^{99}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$ es va emprar en tots els casos el kit Isolink el qual, com ja s'ha comentat, permet preparar el fragment organometàl·lic quantitativament. En les primeres proves realitzades, l'enorme quantitat de sals que conté la solució (Taula 4) provinents en gran part del kit, no va permetre observar els senyals de les metal·loproteïnes per EM. Aquest resultat es pot atribuir al fet que la concentració d'aquestes sals és varis ordres de magnitud superior a la de la proteïna i no permeten la correcta ionització d'aquesta última.

Taula 4. Composició del kit Isolink.

Substància	Quantitat (mg)
Sodi Boranocarbonat ($\text{Na}_2(\text{H}_3\text{BCO})$)	4.5
Sodi tetraborat decahidratat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	2.85
Sodi Tartrat dihidratat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8.5
Sodi carbonat (Na_2CO_3)	7.15

Amb la finalitat d'eliminar les sals contingudes en la solució es varen provar diferents procediments. El primer d'aquests consistia en, un cop preparat el complex *fac*- $^{99}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$, posar en contacte la solució resultant amb una resina d'intercanvi aniónic. Amb aquesta metodologia es pretenia que la gran majoria de les sals (anióniques) quedessin retingudes en la resina, mentre que el compost de tecneci

¹⁴¹ Buchana, W. J. Szabo, Z. *Principles of Nuclear Medicine*, Wagner, H. N. Jr. (Ed) Barnes & Noble, 1995.

(catiònic) quedés en solució. Així doncs, després de separar la resina i la solució, aquesta última ja es podria fer servir per la prova de marcatge amb les proteïnes. Abans però de procedir al marcatge de les MTs, es va creure convenient realitzar una prova per tal de veure que el complex no quedava adsorbit sobre la resina. Aquesta prova va consistir en analitzar una mostra de tecneci-99m per RHPLC, abans i després del intercanvi aniònic. En determinar l'activitat radioactiva de la mostra després de ser exposada a la resina es va observar que aquesta havia disminuït varis ordres de magnitud, i que per tant, gran part del complex $fac-[^{99}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+]$ havia quedat retingut en la resina. Per aquest motiu, es va decidir realitzar una separació un cop finalitzada la reacció de marcatge amb tecneci. Mitjançant cromatografia d'exclusió va ser possible separar totes les sals contingudes en les mostres de les proteïnes. Aquestes últimes tenen uns valors de pes molecular varis ordres de magnitud superiors i, per tant, uns temps de retenció molt inferior. Així doncs, per a la separació de les mostres, es va emprar en tots els casos la mateixa fase mòbil, la qual va consistir en 100% tampó acètic/acetat 7 mM. Seguint aquest procediment experimental s'ha pogut obtenir per primer cop una metal·lotioneïna marcada amb el fragment $fac\{-\text{Tc}(\text{CO})_3\}$ i encara més important determinar l'estequiometria del compost format.

Abans de començar amb la discussió dels resultats obtinguts amb tecneci-99, és important remarcar que en els experiments es va decidir afegir només un equivalent de tecneci respecte de les proteïnes, ja que com s'ha comentat anteriorment, en condicions de radiofarmàcia el radionúclid no es trobarà mai a major concentració que la biomolècula. Cal comentar però, que degut a que es tracta d'una solució radioactiva (beta emissor), per motius de seguretat, la solució *stock* de tecneci no es va poder estandarditzar. Tot i això, els càlculs realitzats per estimar la concentració de tecneci en solució, fan possible saber l'ordre de magnitud en que es troba la concentració del radionúclid.

En analitzar les mostres per EM el primer que es va observar va ser que a diferència dels resultats obtinguts amb reni després d'afegir-hi un equivalent de metall, totes i cadascuna d'elles interaccionaven amb el fragment organometàl·lic de tecneci formant espècies mixtes (Figura 92). Aquest fet, aparentment sorprenent, es pot considerar un excel·lent exemple de la diferència de velocitats en el bescanvi de lligands en complexos de tecneci respecte dels de reni. Com ja s'ha comentat anteriorment, la velocitat d'intercanvi del tecneci sol ser varis ordres de magnitud superior a la del reni degut a que es tracte d'un element de la segona sèrie de transició.

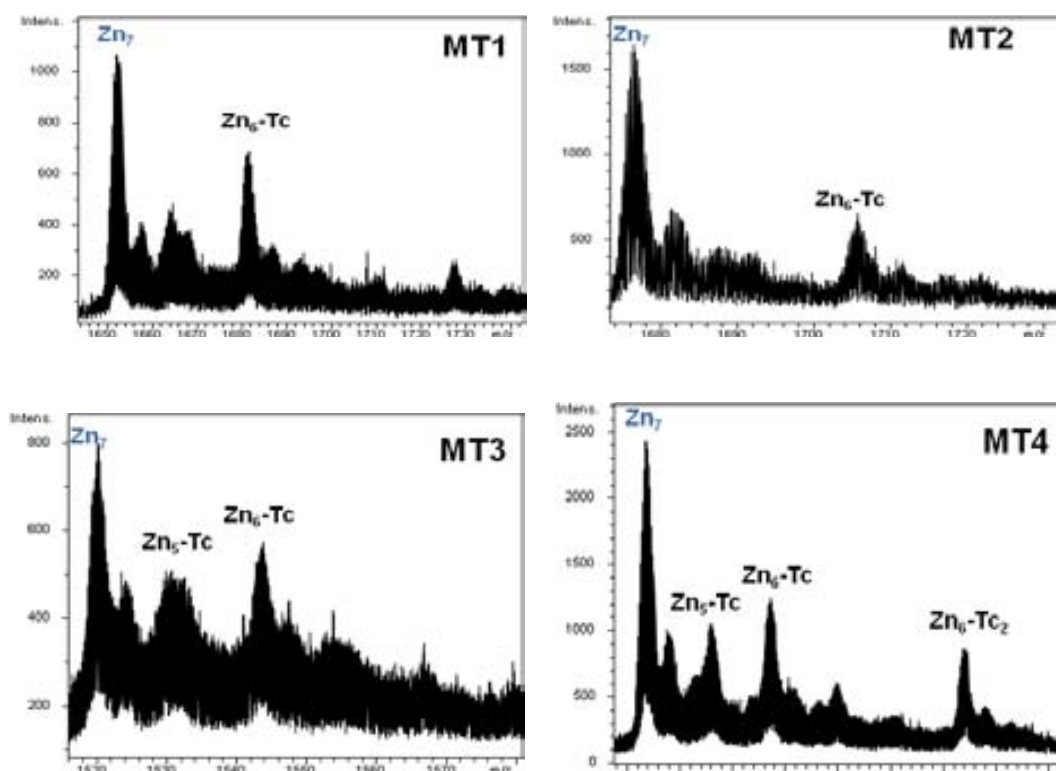


Figura 92. ESI-MS de Zn_7 -MT1, Zn_7 -MT2, Zn_7 -MT3 i Zn_7 -MT4 en presència d'un equivalent del fragment $fac\{-^{99}Tc(CO)_3\}$.

Un altre fet sorprenent es troba en MT4, la qual amb reni semblava no interaccionar, amb tecneci és capaç de formar espècies mixtes com $\{^{99}Tc(CO)_3\}_2$ - Zn_5 -MT4 o $\{^{99}Tc(CO)_3\}$ - Zn_6 -MT4. Aquest comportament també s'observa en menor grau amb MT3 (Figura 92). Pel que respecte a la classificació de les proteïnes com a Zn- o Cu-tioneïna, semblaria que amb tecneci aquesta no segueix el mateix ordre que amb reni. Ja que trobaríem a MT4 com a Cu-tioneïna per davant de MT3. Aquest comportament erràtic de MT4 també s'ha observat en altres metalls.¹⁴²

Com en els experiments amb reni, no es va observar en cap cas la formació d'una espècie heterometàlica on la proteïna contingues en la seva estructura els fragments $Tc(X)(CO)_3$ o $Tc(X)_2(CO)_3$, on X podria ser una molècula d'aigua o qualsevol lligand que estes present en el kit (carbonat, tartrat, etc.). Aquest fet indicaria que, com en el cas del reni, la proteïna estaria enllaçant el tecneci probablement mitjançant tres grups tiol $[Tc(CO)_3(SSS)]$. Tenint en compte la bona estabilitat *in vivo* dels lligands tridentats

¹⁴² Tesi Doctoral Catalina Perez Zuñiga, actualment en curs.

(apartat 1.1.3. Capítol III) amb el fragment tricarbonílic de tecneci, és raonable pensar que l'ús de les MTs com a BFCAs podria ser una bona alternativa als mètodes de síntesi actuals per a la preparació de radiofàrmacs de segona generació. Un altra fet important que cal destacar, és que la incorporació de fragments de tecneci carbonil no semblaria afectar en gran mesura a l'estructura de la MT, ja que aquesta segueix tenint un alt contingut de zinc. Aquest fet podria obrir la porta a la possibilitat de marcatge de les metal·lotioneïnes amb tecneci-99m, i d'aquesta manera realitzar estudis *in vivo* que poguessin aportar informació sobre la funció que tenen en el cos. Tal com s'ha esmentat anteriorment, tot i els nombrosos estudis realitzats, encara no es disposa de prou informació sobre les funcions d'aquestes metal·loproteïnes.

3. CONCLUSIONS

Mitjançant la tècnica d'espectrometria de masses s'ha pogut realitzar l'estudi de la interacció de les quatre isoformes de MT de mamífer (MT1, MT2, MT3 i MT4) amb el fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$. L'anàlisi per EM ha mostrat la diferent tendència de cadascuna de les MTs a enllaçar el compost organometàl·lic. Així, MT3 és la isoforma que mostra una tendència més gran a substituir el zinc pel fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$. En contraposició, MT2 és la isoforma que té una inclinació més gran a retenir els metalls zinc en la seva estructura. Aquests resultats són coherents amb la classificació de MT2 com a Zn-tioneïna i MT3 com a Cu-tioneïna. El comportament de MT1 i MT4 és intermedi i es mostra en la següent Figura (Figura 93).

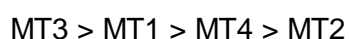


Figura 93. Ordre de reactivitat de les isoformes de MT de mamífer enfront el fragment $fac\{-Re(CO)_3\}$.

S'ha aconseguit posar a punt una metodologia que permet analitzar els productes resultants de la substitució dels àtoms de zinc per tecneci mitjançant HPLC i EM. Aplicant aquest procediment, s'ha demostrat que la substitució del zinc per tecneci en les MTs és molt més favorable amb tecneci que no pas amb reni. És especialment sorprenent el comportament de la isoforma MT4, ja que amb tecneci les espècies heterometàl·liques presenten senyals en l'espectre molt més intenses que amb reni. El comportament poc previsible d'aquesta isoforma s'ha observat prèviament amb algun altre metall. L'ordre de

reactivitat de les MT enfront el fragment $fac\{-Tc(CO)_3\}$ es pot esquematitzar aproximadament segons la figura següent (Figura 94).

$$MT4 \approx MT3 > MT1 > MT2$$

Figura 94. Ordre de reactivitat de les isoformes de MT de mamífer enfront el fragment $fac\{-Tc(CO)_3\}$.

En vista dels resultats obtinguts entre les MTs i el fragment organometàl·lic tecneci carbonil, sembla que aquestes proteïnes presenten cert potencial per al seu ús com a BFCAs i la preparació de nous radiofàrmacs de segona generació. També semblaria indicar que, el caràcter de Zn- o Cu-tioneïna d'una MT podria ser una primera indicació de quin seria el seu comportament enfront tecneci, però, en cap cas, es pot utilitzar com a únic factor a tenir en compte, ja que com s'ha pogut observar algunes MTs (MT4) poden presentar un comportament molt diferent al esperat. Per últim, el baix contingut de tecneci que incorporen les MTs podria permetre el seu marcatge amb ^{99m}Tc i així realitzar estudis *in vivo* que poguessin aportar informació sobre la funció que tenen en el cos.

Chapter V

Experimental Section



1. GENERAL PROCEDURES

All commercially available reagents were used as received. Solvents were dried by distillation over the appropriate drying agents when required; CaH₂ (CHCl₃, CH₃CN, CH₂Cl₂), (Mg⁰) MeOH or using molecular sieves: DMF, DIPEA.

Rhenium complexes [ReO₂(py)₄]Cl·2H₂O,⁵⁴ [ReO₂(py)₄]PF₆,⁵⁶ [NBu₄][ReOCl₄],⁵⁵ Re(CO)₅Br,¹⁴⁰ [Re(CO)₅(O₃SCF₃)],⁶⁸ [NEt₄]₂[Re(Br)₃(CO)₃],⁶⁹ were synthesized according to the literature.

1.1. Spectroscopy

Nuclear magnetic resonance spectra (**NMR**) have been registered at the *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* in the *Universitat Autònoma de Barcelona*. ¹H-NMR spectra were recorded on Bruker DPX250 (250 MHz), Bruker DPX360 (360 MHz) and Bruker ARX400 (400 MHz) spectrometers. Proton chemical shifts are reported in ppm (δ). ¹³C-NMR spectra were recorded on Bruker DPX250 (62.5 MHz), Bruker DPX360 (90 MHz) and Bruker ARX400 (100 MHz) spectrometers. Carbon chemical shifts are reported in ppm (δ). All spectra have been registered at 298 K.

The abbreviation used to describe signal multiplicities are: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet) and *J* to indicate the coupling constants.

Infrared spectra (**IR**) were recorded on a Sapphire-ATR Spectrophotometer. Peaks are reported in cm⁻¹.

A Jasco spectropolarimeter (Model J-715) interfaced to a computer (J700 software) was used for circular dichroism (**CD**) measurements at a constant temperature of 25 °C maintained by a Peltier PTC-351S apparatus.

Electronic absorption measurements were performed on an HP-8453 Diode array Ultraviolet–visible (**UV-Vis**) spectrophotometer. All spectra were recorded with 1 cm capped quartz cuvettes, corrected for dilution effects and processed using the GRAMS 32 program.

1.2. Spectrometry

All spectrometry data were recorded at the *Servei d'Anàlisi Química* in the *Universitat Autònoma de Barcelona*. High resolution mass spectra (**HRMS**) and mass spectra (**MS**) of the metallic complexes were recorded in a Bruker micrOTOFQ and *Esquire 3000* spectrometers respectively using ESIMS (QTOF). Protein Molecular mass determination was performed by electrospray ionization mass spectrometry equipped with a time-of-flight analyzer (ESI-TOF MS)] using a Micro Tof-Q Instrument (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) calibrated with NaI (200 ppm NaI in a 1:1 H₂O:isopropanol mixture), interfaced with an Series 1100 HPLC pump (Agilent Technologies) equipped with an autosampler, both controlled by the Compass Software. In all cases, molecular masses were calculated according to the method.¹⁴³ Determination of concentration was performed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (**ICP-OES**) in a Perkin-Elmer Optima 4300.

1.3. Elemental Analysis

Elemental analyses have been performed at the *Servei d'Anàlisi Química* in the *Universitat Autònoma de Barcelona* with an EA1108 analyzer (Carlo Erba), CHNS type.

¹⁴³ Yu, X.; Wojciechowski, M.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1355.

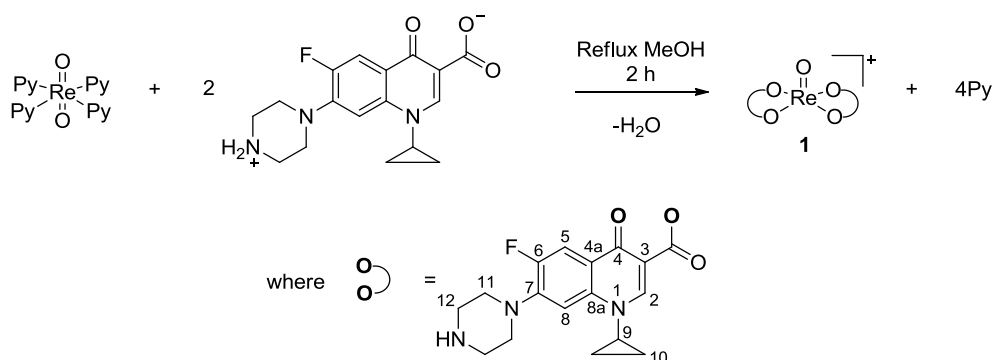
1.4. Chromatography

Ray-high pressure liquid chromatography (**RHPLC**) analysis was performed on a Waters 600E equipped with a Waters 486 tunable absorption and a raytest GABI radiometric detectors for characterisation of technetium dithiocarbamate complexes. For protein samples a HPLC pump1200 series (Agilent technologies) was used.

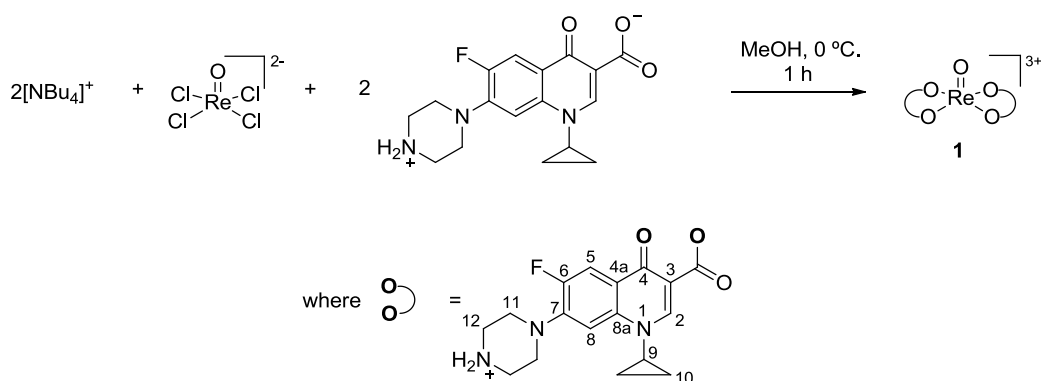
2. RHENIUM AND CIPROFLOXACIN COMPLEXES

2.1. Synthesis and Characterization of $[\text{ReO}(\text{Cpf})_2]\text{Cl}$, **1**

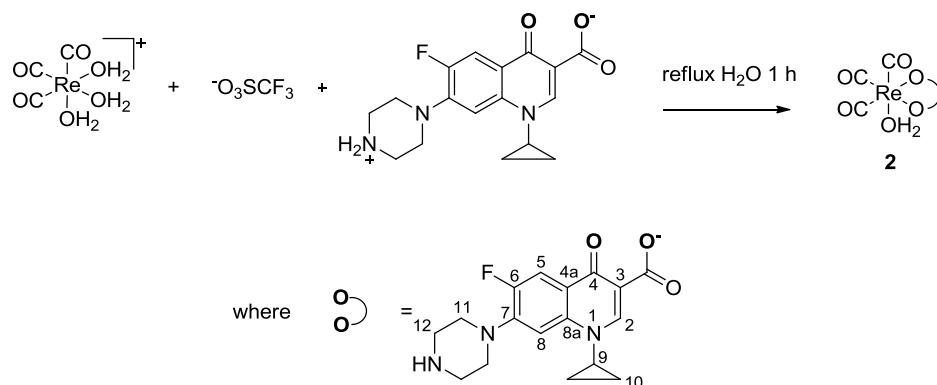
Path A



The precursor $[\text{ReO}_2(\text{py})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (130 mg, 0.2 mmol) was dissolved in MeOH (5 mL) and added to a suspension of CpfH (150 mg, 0.4 mmol) in the same solvent (45 mL). The mixture was heated at the reflux temperature for 2 h. Then, the dark brown solution was concentrated under vacuum to 5 mL and the resulting solution was cooled to 4 °C to crystallize the complex. The solid was washed with cold MeOH and Et_2O to give a brown solid **1** (120 mg, 60%). **IR** (ATR, cm^{-1}): 1730 (CO, carboxylate), 1630 (CO, piridone), 1454 (OCO), 896 (Re=O). **$^1\text{H-NMR}$** (D_2O , δ): 8.82 (s, 1H, H-2), 8.02 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-5), 7.68 (m, 1H, H-8), 3.81 (m, 1H, H-9), 3.64 (m, 4H, H-12), 3.50 (m, 4H, H-13), 1.30 (m, 4H: H-10, H-10'). **$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$** (D_2O , δ): -123.64. **$^{13}\text{C CP-MAS}$** : 174.4 (C-4), 165.0 (carboxylate), 154.3 (d, C-6), 148.7 (C-2), 145.4 (C-7), 139.5 (C-4a), 117.5 (C-8a), 109.9 (C-5), 106.5 (C-3), 105.0 (C-8), 46.2 (C-11, C-12), 36.1 (C-9), 8.2 (C-10). **HRMS (ESI)** (positive mode, m/z): Calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_7\text{Re}$ (M-Cl) 863.2011, found 863.1977.

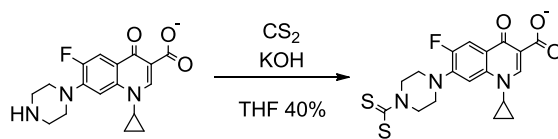
Path B

A solution of $[\text{NBu}_4][\text{ReOCl}_4]$ (70 mg, 0.12 mmol) in dry methanol (10 mL) was added dropwise to a suspension of Ciprofloxacin (86 mg, 0.26 mmol) in the same solvent (10 mL). The mixture was cooled to 0 °C and stirred for 1 h. The resulting dark-brown solution was reduced to 5 mL under vacuum and cooled to -30 °C for 12 h. The dark brown precipitated was filtered and washed with 5 mL of dry acetone, 5 mL of dry Et_2O and dried under vacuum to obtain the complex **1** (63 mg, 59%). **IR** (ATR, cm^{-1}): 1626 (CO, pyridone), 1451(OCO), 899 (Re=O). **$^1\text{H-NMR}$** (MeOD, δ): 8.82 (s, 1H, H-2), 8.02 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H-5), 7.68 (m, 1H, H-8), 3.81 (m, 1H, H-9), 3.64 (m, 4H, H-12), 3.50 (m, 4H, H-13), 1.30 (m, 4H: H-10, H-10'). **$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR** (MeOD, δ): -123.60. **$^{13}\text{C CP-MAS}$** : δ 175.7 (C-4), 168.2 (carboxylate), 152.6 (d, C-6), 147.0 (C-2), 144.0 (C-7), 139.5 (C-4a), 118.0 (C-8a), 111.9 (C-5), 107.3 (C-3), 105.2 (C-8), 44.9 (C-11, C-12), 36.8 (C-9), 8.5 (C-10). **ESI MS (positive mode, m/z)**: 863.2 (M). Anal. Calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_7\text{Re}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 41.28 H, 3.87 N, 8.50 %. Found: C, 41.08 H, 3.98 N, 8.17%.

2.2. Synthesis and Characterization of *fac*-[Re(CO)₃(Cpf)(H₂O)], 2

The complex $\text{Re}(\text{CO})_5\text{O}_3\text{SCF}_3$ (154 mg, 0.60 mmol) was dissolved in water (10 mL) and heated to reflux temperature for 1 h. Then, a pH 3 water solution of Ciprofloxacin (200 mg, 0.60 mmol) was added and the heterogeneous mixture was heated to reflux temperature for 2 h with a vigorous stirring. After this, the mixture was cooled in an ice bath and the pale-yellow precipitate. The solid was filtered and washed with 10 mL of cold water, 10 mL of methanol, 10 mL of Et_2O and dried under vacuum to afford **3** (231 mg, 62%). **IR** (ATR, cm^{-1}): 2018, 1871 ($\text{C}\equiv\text{O}$), 1614 (CO, piridone), 1480 (OCO). **$^1\text{H-NMR}$** (DMSO-d_6 , δ): 8.85 (m, 1H, H-2), 7.85 (m, 1H, H-5), 7.45 (m, 1H, H-8), 3.35 (m, 5H, H-9, H-11, H-12), 1.20 (m, 4H, H-10, H-10'). **$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$** (DMSO-d_6 , δ): -120.9. **$^{13}\text{C CP-MAS}$** : δ 198.3 (carboxilate), 175.9 (carbonyls), 168 (C-4), 148.6 (C-2, C-6, C-7), 138.9 (C-4a) 111.5 (C-3, C-5, C-8, C-8a), 44.9 (C-11, C-12), 36.8 (C-9), 8.1 (C-10). **ESI MS** (positive mode, m/z): 602.2 ($\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}^+$). **Anal. Calcd.** for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_7\text{Re}$: C, 38.83 H, 3.10 N, 6.79%. Found: C, 38.44 H, 3.25 N, 6.67%.

2.3. Synthesis and Characterization of DTC-Cpf



About 1.2 g (0.02 mol) of crushed potassium hydroxide and 3.6 g (0.01 mol) of Ciprofloxacin hydrochloride were stirred vigorously in 11 ml of 40% tetrahydrofuran solution for 5 min in an ice-salt bath. To the above solution, 1 ml of carbon disulfide was then added. The mixture was stirred for 2 h in an ice-salt bath and it was allowed to warm room temperature and stirred overnight. Once the reaction was finished, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was filtered off. The yellow crude product was recrystallized from methanol/diethyl ether to give the compound DTC-Cpf (3.23 g, 66%). **$^1\text{H-NMR}$** (D_2O , δ): 8.45 (s, 1H, H-2), 7.87 (d, $J = 7.87$, 1H, H-8), 7.60 (d, $J = 7.59$, 1H, H-5), 4.6 (s, 4H, H-12), 3.62 (s, 1H, H-9), 3.40 (s, 4H, H-11), 1.23 (m, 4H, H-10, H-10').

2.4. Bacteriological Studies

In both bacteriological assays the follow steps were used to prepare the samples. Complex **2** was dissolved in a small volume of DMSO and the solution was diluted with sterile MilliQ grade water to the desired assay concentrations (from 1 to 2000 μM). In all the cases, the DMSO final concentration was less than 2.5% except for the highest concentration of product, 1000 μM and 2000 μM , with DMSO at 2.5% and 5%, respectively. Compound **1** and Ciprofloxacin (used as control) were dissolved in sterile MilliQ grade water.

2.4.1. Antimicrobial Susceptibility Test

Antimicrobial activities of complexes **1** and **2** were evaluated using a methodology similar as previously described.⁷⁶ Briefly, 24 h cultures of tested microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) were stirred with NaCl 0.9% solution and adapted to the concentration of 2×10^8 cfu/ml. A sterile cotton swab was dipped into bacterial suspension and streaked over Mueller-Hinton agar plates (Oxoid). Filter paper discs \varnothing 6 mm (Whatman) were drenched with test complexes (5 μg of product). Plates were incubated at 37 °C for 18 h. The diameters of inhibition zones were measured. Ciprofloxacin (5 μg ; Oxoid) was used as reference substance.

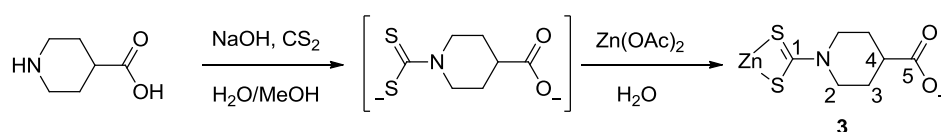
2.4.2. DNA Gyrase Cleavage Assay

DNA gyrase cleavage assay was carried out following the recommendations of the manufacturer (Inspiralis). Briefly, 0.5 μl (1U) of DNA gyrase was incubated with 0.5 μg of supercoiled pBR322 in a reaction volume of 30 μl at 37 °C for 1 hour in a 1X assay buffer (Inspiralis). Ciprofloxacin or the studied complexes **1** and **2** were added at the desired concentrations (from 1 to 2000 μM). Following, sodium dodecyl sulfate and proteinase K were added to final concentrations of 0.2% and 0.1 mg/ml, respectively, and the incubation was continued for 30 min at 37 °C. The reactions were stopped by adding 30 μl Stop buffer (40% sucrose, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM EDTA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bromophenol blue), followed by extraction with 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol

(24:1). Then 20 μl of aqueous phase of each sample was analysed on 1% agarose gels in 1% TAE (40 mM Tris-Acetate, 2 mM EDTA) and visualized after staining with ethidium bromide in a ChemiDoc XRS apparatus (Bio Rad Laboratories).

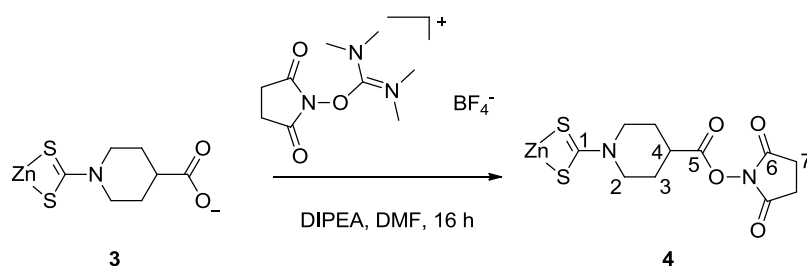
3. SYNTHESIS OF HIGH SPECIFIC SECOND GENERATION RADIOPHARMACEUTICAL

3.1. Synthesis and Characterization of Complex 3



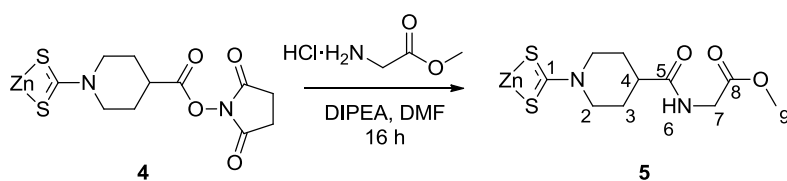
A solution of NaOH (2.8 g, 70 mmol) in water (70 mL) was added to a solution of Isonipecotic acid (4.5 g, 35 mmol) in methanol (140 mL) and the resulting solution was cooled at 0 °C. Carbon disulfide (2.45 mL, 40.9 mmol) was slowly added to this cold solution and the mixture was stirred for 1h. After this time, the mixture was warmed to room temperature and was stirred overnight. Then, a solution of zinc acetate (3.8 g, 17.5 mmol) in water (35 mL) was dropwise added under vigorous stirring to the previous mixture for a period of 4 h. The resulting solution was cooled to 4 °C and colorless crystals precipitate after 12-24h. This solid was filtered off, washed with MeOH and Et₂O, and dried under vacuum giving a white powder **3** (8.1 g, 84%). **IR** (KBr, cm⁻¹): 1553 (COO⁻), 1493 (C-N, S₂CN). **¹H-NMR** (D₂O, δ): 4.97 (d, J = 12.9 Hz, 2H, H-2_{eq}), 3.32 (dt, J = 12.7 Hz, J = 2.7 Hz, 2H, H-2_{ax}), 2.30 (m, 1H, H-4), 1.95 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.65 (m, 2H, H-3_{ax}). **¹³C-NMR** (D₂O, δ): 201.8 (C-1), 184.1 (C-5), 52.5 (C-2), 43.8 (C-4), 29.4 (C-3). **ESI MS** (negative mode, m/z): 493 (M-Na⁺). **Anal. Calcd.** for C₁₄H₁₈N₂Na₂O₄S₄Zn·2H₂O: C, 30.35 H, 4.00 N, 5.06%. Found: C, 30.39 H, 3.91 N, 4.97%.

3.2. Synthesis and Characterization of Complex 4



To a solution of complex **3** (200 mg, 0.36 mmol) in anhydrous DMF (1 mL) was added *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate (TSTU, 256 mg, 0.85 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (13 μ L, 0.07 mmol). The heterogeneous mixture was stirred for 16 h and then 140 mL of a mixture H₂O:EtOH (1:1, v/v) was added. The crude precipitated was centrifuged and washed with EtOH and Et₂O to furnish **4** (239 mg, 99%) as a white solid that could be recrystallized in hot acetonitrile. **IR** (KBr, cm⁻¹): 1736 (C=O, Succinimidyl), 1634 (C=O, ester), 1493 (C-N, S₂CN). **¹H-NMR** (DMSO-d₆, δ): 4.73 (d, J = 13.4 Hz, 2H, H-2_{eq}), 3.53 (t, J = 12.4 Hz, 2H, H-2_{ax}), 3.22 (m, 1 H, H-4), 2.83 (s, 4H, H-7), 2.10 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.70 (m, 2H, H-3_{ax}). **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, δ): 203.4 (C-1), 170.1 (C-6), 169.8 (C-5), 49.9 (C-2), 36.3 (C-4), 27.4 (C-7), 25.5 (C-3). **ESI MS** (positive mode, m/z): 688.9 (M+Na⁺). **Anal. Calcd.** for C₂₂H₂₆N₄O₈S₄Zn: C, 39.55; H, 3.92; N, 8.39%. Found: C, 39.82; H, 3.83; N, 8.61%.

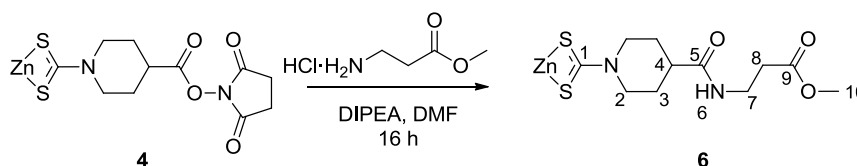
3.3. Synthesis and Characterization of Complex 5



To a solution of **4** (1.0 g, 1.5 mmol) in dry DMF (10 mL) was added a Glycine methyl ester hydrochloride (477 mg, 3.8 mmol) and DIPEA (1.2 ml, 7.5 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, a mixture of water and EtOH (1:1, v/v) (100 mL) was added. The product was centrifuged and washed with the same mixture to eliminate the excess of the amine and DIPEA. The product was dried under vacuum to give **5** (678 mg, 74%) as a white solid. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3294 (N-H, amide), 1753 (C=O, amide), 1646 (C=O, ester), 1492 (C-N, S₂CN). **¹H-NMR** (DMSO-d₆,

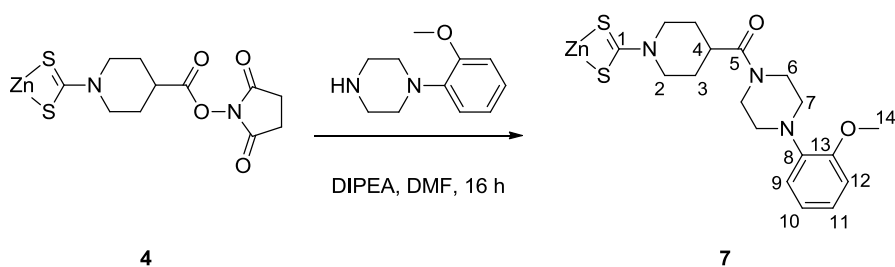
δ): 8.4 (t, $J = 5.96$ Hz, 1H, H-6), 4.8 (d, $J = 12.86$ Hz, 2H, H-2_{eq}), 3.8 (d, $J = 5.96$ Hz, 2H, H-7), 3.62 (s, 3H, H-9), 3.31 (m, 2H, H-2_{ax}), 2.53 (m, 1H, H-4), 1.82 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.58 (m, 2H, H-3_{ax}). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, δ): 202.7 (C-1), 174.6 (C-5), 170.6 (C-8), 51.7 (C-9), 50.6 (C-2), 40.9 (C-4), 40.3 (C-7), 28.2 (C-3). **ESI MS** (positive mode, m/z): 637.0 (M+Na⁺). **Anal. Calcd.** for C₂₀H₃₀N₄O₆S₄Zn: C, 38.99; H, 4.91; N, 9.09%. Found: C, 38.71; H, 4.91; N, 8.92%.

3.4. Synthesis and Characterization of Complex 6



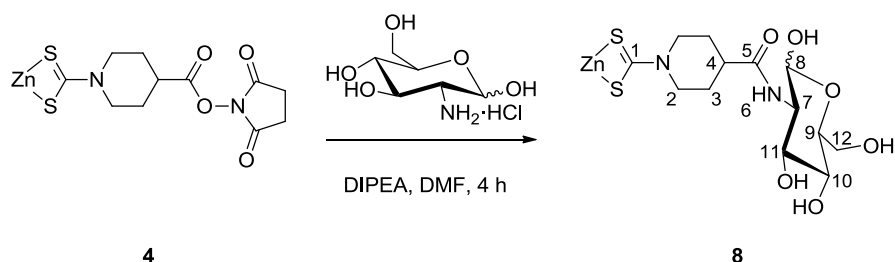
To a solution of **4** (1.0 g, 1.5 mmol) in dry DMF (10 mL) was added a β -alanine methyl ester hydrochloride (530 mg, 3.8 mmol) and DIPEA (1.2 mL, 7.5 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, a mixture of water and EtOH (1:1, v/v) (100 mL) was added. The product was centrifuged and washed with the same mixture to eliminate the excess of the amine and DIPEA. The product was dried under vacuum to obtain **6** (580 mg, 58%) as a white solid. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3271 (N-H, amide), 1746 (C=O, amide), 1640 (C=O, ester), 1492 (C-N, S₂CN). ¹H-NMR (DMSO-d₆, δ): 8.0 (t, $J = 5.41$ Hz, 1H, H-6), 4.8 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H, H-2_{eq}), 3.60 (s, 3H, H-10), 3.27 (m, 4H, H-2_{ax}, H-8), 2.45 (m, 3H, H-4, H-7), 1.76 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.57 (m, 2H, H-3_{ax}). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, δ): 202.7 (C-1), 174.0 (C-5), 172.2 (C-9), 51.8 (C-10), 51.1 (C-2), 40.6 (C-4), 34.0 (C-7), 35.1 (C-8), 34.0 (C-7), 28.7 (C-3). **ESI MS** (positive mode, m/z): 665.1 (M+Na⁺). **Anal. Calcd.** for C₂₂H₃₄N₄O₆S₄Zn·H₂O: C, 39.90; H, 5.48; N, 8.46%. Found: C, 39.96; H, 5.37; N, 8.41%.

3.5. Synthesis and Characterization of complex 7



To a solution of **4** (1.0 g, 1.5 mmol) in dry DMF (10 mL) was added a 1-(2-methoxyphenyl)-piperazine (0.7 g, 3.8 mmol) and DIPEA (1.2 mL, 7.5 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then, a mixture of water and EtOH (1:1, v/v) (100 mL) was added. The product was centrifuged and washed with the same mixture to eliminate the excess of the amine and DIPEA. The product was dried under vacuum to obtain **7** (870 mg, 71%) as a white solid. **IR** (KBr, cm^{-1}): 1639 (C=O, amide), 1436 (C-N, S_2CN). **$^1\text{H-NMR}$** (DMSO- d_6 , δ): 6.96-6.89 (m, 4H, ArH), 4.87 (d, $J = 12.26$ Hz, 2H, H- 2_{eq}), 3.79 (s, 3H, H-14), 3.63 (m, 4H, H-6), 3.40 (m, 2H, H- 2_{ax}), 3.05 (m, 1H, H-4), 2.95 (m, 4H, H-7), 1.80 (m, 2H, H- 3_{eq}), 1.59 (m, 2H, H- 3_{ax}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (DMSO- d_6 , δ): 202.4 (C-1), 172.2 (C-5), 152.4 (C-13), 141.0 (C-8), 124-111 (C-9, C-10, C-11, C-12), 55.7 (C-14), 50.6 (C-7), 50.6 (C-2), 50.1 (C-7), 45.2 (C-6), 41.4 (C-6), 35.9 (C-4), 28.7 (C-3). **ESI MS** (positive mode, m/z): 843.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$). **Anal. Calcd.** for $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_4\text{Zn}$: C, 52.57; H, 5.88; N, 10.22%. Found: C, 52.24; H, 5.82; N, 9.86%.

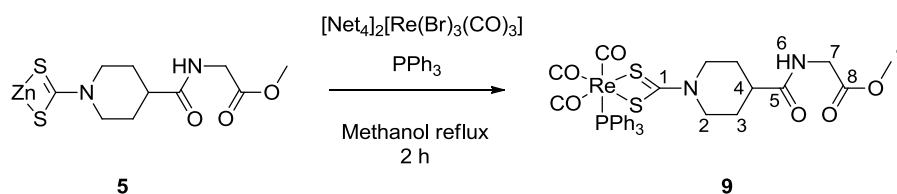
3.6. Synthesis and Characterization of Complex 8



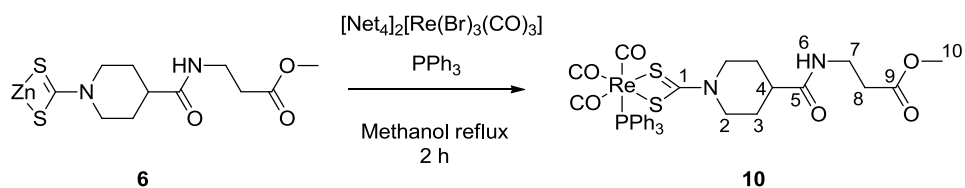
To a solution of **4** (1.0 g, 1.5 mmol) in dry DMF (10 mL) was added a Glucosamine chlorhydrate (0.8 g, 3.8 mmol) and DIPEA (240 μL , 1.5 mmol). The reaction mixture was stirred 3 hours at room temperature. Then, methanol (100 mL) was added and the crude was centrifuged and washed with the same solvent to eliminate the excess of glucosamine and DIPEA. The product was dried under vacuum to provide **8** (550 mg,

44%) as a white solid. **IR** (KBr, cm^{-1}): 3411 (O-H, alcohols), 1644 (C=O, amide), 1492 (C-N, S_2CN). **$^1\text{H-NMR}$** (DMSO-d_6 , δ): 7.69 (d, $J = 7.65$ Hz, 1H, H-6), 6.47 (d, $J = 6.34$ Hz, 1H, H-8), 4.90-4.30 (m, 6 H, H-2_{eq}, H-7, H-11, H-12), 3.60-3.00 (m, 4H, H-2_{ax}, H-9, H-10), 2.56 (m, 1H, H-4), 1.71 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.60 (m, 2H, H-3_{ax}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (DMSO-d_6 , δ): 202.6 (C-1), 174.1 (C-5), 95.9 (C-8 α), 90.7 (C-8 β), 77.3 (C-9 α), 74.6 (C-10 α), 72.3 (C-9 β), 71.5 (C-10 β), 71.2 (C-11 α), 70.8 (C-11 β), 61.5 (C-12), 57.4 (C-7 α), 54.7 (C-7 β), 51.1 (C-2), 40.0 (C-4), 28.8 (C-3). **ESI MS** (positive mode, m/z): 817.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$); **Anal. Calcd.** for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_4\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 37.52; H, 5.57; N, 6.73%. Found: C, 37.88; H, 5.42; N, 6.69%.

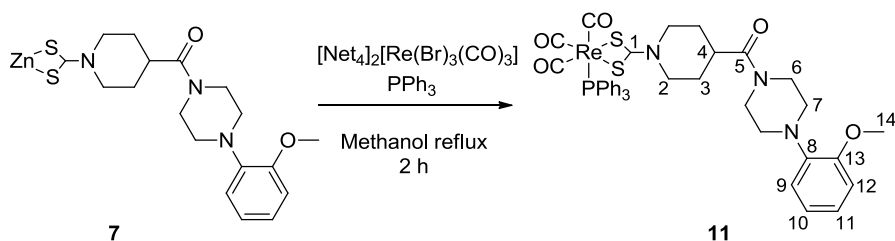
3.7. Synthesis and Characterization of Complex 9



The precursor $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ (100 mg, 0.14 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and added to a suspension of **5** (49 mg, 0.08 mmol) in the same solvent (30 mL). The mixture was heated at reflux temperature for 1 h. Next, triphenylphosphine (34 mg, 0.14 mmol) was added and the resulting suspension was heated at reflux temperature for one additional hour. After this time, the mixture was concentrated under vacuum to 5 mL and the resulting solution was cooled to 4 °C to crystallize the complex. The complex was washed with cold MeOH and Et_2O to give a white solid **9** (58 mg, 51%). **IR** (KBr, cm^{-1}): 2009, 1912, 1905, 1892 (C \equiv O), 1723 (C=O, amide), 1678 (C=O, ester), 1497 (C-N, S_2CN). **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , δ): 7.53-7.28 (m, 15 H, ArH), 5.92 (t, $J = 5.07$ Hz, 1H, H-6), 4.31 (d, $J = 13.81$ Hz, 2H, H-2_{eq}), also observed 4.21 (d, $J = 13.81$ Hz, 2H, H-2_{eq}), 4.05 (d, $J = 5.07$ Hz, 2H, H-7), 3.81 (s, 3H, H-9), 2.74 (t, $J = 11.96$ Hz, 2H, H-2_{ax}), also observed 2.50 (t, $J = 11.96$ Hz, 2 H, H-2_{ax}), 2.28 (m, 1H, H-4), 1.67 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.30 (m, 2H, H-3_{ax}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , δ , except phenyl resonances): 210.1 (C-1), 193.2 - 190.4 (carbonyls), 173.7 (C-5), 170.5 (C-8), 51.6 (C-9), 44.3 (C-2), 42.1 (C-4), 41.3 (C-7), 26.6 (C-3). **$^{31}\text{P-NMR}$** (CDCl_3 , δ): 14.8 also observed 14.4. **ESI MS** (positive mode, m/z): 831.0 ($\text{M}+\text{Na}^+$); **Anal. Calcd.** for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{PReS}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 45.08; H, 3.91; N, 3.39%. Found: C, 45.24; H, 4.08; N, 3.53%.

3.8. Synthesis and Characterization of Complex **10**

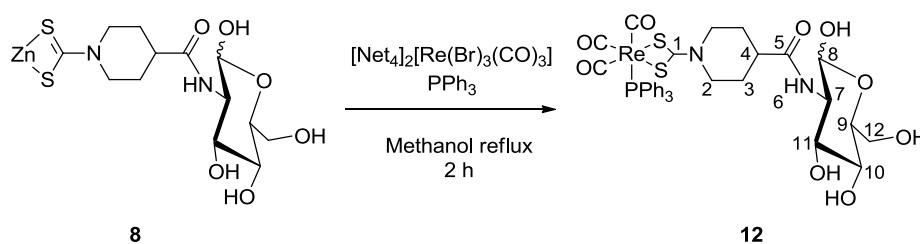
The precursor $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ (100 mg, 0.14 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and added to a suspension of **6** (51 mg, 0.08 mmol) in the same solvent (30 mL). The mixture was heated at reflux temperature for 1 h. Next, triphenylphosphine (34 mg, 0.14 mmol) was added and the resulting suspension was heated at reflux temperature for one additional hour. After this time, the mixture was concentrated under vacuum to 5 mL and the resulting solution was cooled to 4 °C to crystallize the complex. The complex was washed with cold MeOH and Et₂O obtaining a white solid **10** (45 mg, 40%). **IR** (KBr, cm⁻¹): 2009, 1912, 1905, 1892 (C≡O), 1723 (C=O, amide), 1678 (C=O, ester), 1497 (C-N, S₂CN). **¹H-NMR** (CDCl₃, δ): 7.53-7.28 (m, 15 H, ArH), 6.10 (m, 1H, H-6), 4.31 (d, *J* = 13.54 Hz, 2H, H-2_{eq}), also observed 4.21 (d, *J* = 13.54 Hz, 2 H, H-2_{eq}), 3.71 (s, 3H, H-10), 3.55 (q, *J* = 5.81 Hz, 2H, H-7), 2.70 (t, *J* = 13.54 Hz, 2H, H-2_{ax}), also observed 2.40 (t, *J* = 13.54 Hz, 2H, H-2_{ax}), 2.56 (q, *J* = 5.81 Hz, 2H, H-8), 2.17 (m, 1H, H-4), 1.68 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.26 (m, 2H, H-3_{ax}). **¹³C-NMR** (CDCl₃, δ, except phenyl resonances): 210.9 (C-1), 193.2 - 190.4 (carbonyls), 174.2 (C-5, C-9), 51.8 (C-10), 44.2 (C-2), 42.3 (C-4), 34.8 (C-7), 33.6 (C-8), 28.1 (C-3). **³¹P-NMR** (CDCl₃, δ): 15.3 also observed 14.7. **ESI MS** (positive mode, *m/z*): 845.0 (M+Na⁺); **Anal. Calcd.** for C₃₂H₃₂N₂O₆PREs₂: C, 46.76 H, 3.92 N, 3.41%. Found: C, 46.68 H, 4.00 N, 3.34%.

3.9. Synthesis and Characterization of Complex **11**

The precursor $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ (100 mg, 0.14 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and added to a suspension of **7** (66 mg, 0.08 mmol) in the same solvent (30 mL). The mixture was heated at reflux temperature for 1 h. Next, triphenylphosphine (34 mg,

0.14 mmol) was added and the resulting suspension was heated at reflux temperature for one additional hour. The mixture was concentrated under vacuum to 5 mL and the resulting solution was cooled to 4 °C to crystallize the complex. The complex was washed with cold MeOH and Et₂O to yield **11** (74 mg, 58%) as a white solid. **IR** (KBr, cm⁻¹): 2009, 1912, 1905, 1892 (C≡O), 1723 (C=O, amide), 1678 (C=O, ester), 1497 (C-N, S₂CN). **¹H-NMR** (CDCl₃, δ): 7.55-6.87 (m, 19H, ArH), 4.31 (d, *J* = 13.05 Hz, 2H, H-2_{eq}), also observed 4.21 (d, *J* = 13.05 Hz, 2H, H-2_{eq}), 3.91 (s, 3H, H-14), 3.90-3.50 (m, 4H, H-6), 3.10 (s, 4H, H-7), 2.77 (t, *J* = 11.51 Hz, 2H, H-2_{ax}), also observed 2.53 (t, *J* = 11.51 Hz, 2H, H-2_{ax}), 2.66 (m, 1H, H-4), 1.65 (m, 2H, H-3_{eq}), 1.44 (m, 2H, H-3_{ax}). **¹³C-NMR** (CDCl₃, δ, except phenyl resonances): 211.0 (C-1), 193.4 - 190.3 (carbonyls), 172.2 (C-5), 151.6 (C-13), 55.4 (C-14), 51.4 (C-7), also observed 50.6 (C-7), 45.7 (C-6), also observed 41.8 (C-6), 44.5 (C-2), 37.6 (C-4) also observed 37.0 (C-4), 27.4 (C-3). **³¹P-NMR** (CDCl₃, δ) 15.3, also observed 14.7. **ESI MS** (positive mode, *m/z*): 912.0 (M+H⁺); **Anal. Calcd.** for C₃₉H₃₉N₃O₄PReS₂·H₂O: C, 50.42; H, 4.45; N, 4.52%. Found: C, 50.55; H, 4.43; N, 4.52%.

3.10. Synthesis and Characterization of Complex **12**

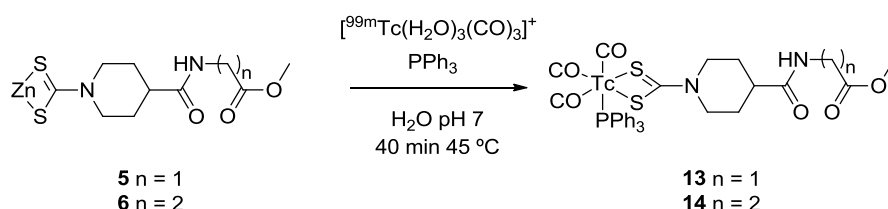


The precursor [NEt₄]₂[Re(CO)₃Br₃] (100 mg, 0.14 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and added to a suspension of **8** (64 mg, 0.08 mmol) in the same solvent (30 mL). The mixture was heated at reflux temperature for 1 h. Next, triphenylphosphine (34 mg, 0.14 mmol) was added and the resulting suspension was heated at reflux temperature for one additional hour. After this time, the mixture was concentrated under vacuum to 5 mL and the resulting solution was cooled to 4 °C to crystallize the complex. The complex was washed with cold MeOH and Et₂O to obtain **12** (88 mg, 70%) as white solid. **IR** (KBr, cm⁻¹): 2006, 1915, 1906, 1892 (C≡O), 1722 (C=O, amide), 1498 (C-N, S₂CN) cm⁻¹; **¹H-NMR** (acetone-d₆, δ): 7.58-7.46 (m, 15H, ArH), 6.89 (d, *J* = 8.22 Hz, 1H, H-6), 6.86 also observed (d, *J* = 8.22 Hz, 1H, H-6), 5.66 (m, 1H, H-8), also observed 5.62 (m, 1H, H-8), 5.17 (m, 1H, H-7), also observed 5.10 (m, 1H, H-7), 4.31-3.33 (m, 6H, H-2_{eq}, H-9, H-10, H-11, H-12), 2.83 (alcohols), 2.67 (t, *J* = 11.04 Hz, 2H, H-2_{ax}), 2.55 (m, 1H, H-4), 1.73 (m,

2H, H-3_{eq}), 1.56 (m, 2H, H-3_{ax}). ¹³C-NMR (acetone-d₆, δ, except phenyl resonance): 209.8 (C-1), 194.2 (carbonyls), 174.1 (C-5), 91.4 (C-8), 76.8 (C-9), 72.2 (C-10, C-11), 61.8 (C-12), 54.7 (C-7), 45.4 (C-2), 42.1 (C-4), 28.3 (C-3). ³¹P-NMR (acetone-d₆, δ): 12.0, also observed 11.6. **ESI MS** (positive mode, *m/z*): 921.1 (M+Na⁺). **Anal. Calcd.** for C₃₄H₃₆N₂O₉PREs₂·2H₂O: C, 43.72; H, 4.32; N, 3.00%. Found: C, 44.02; H, 4.26; N, 3.02%.

3.13. Synthesis and Characterization of Complex 13-14

Na^{99m}TcO₄ was eluted from a ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator (supplied by General electric) with 0.9% saline. [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ was prepared using the boranocarbonate kit Isolink (Mallinckrodt-Covidien). RHPLC analysis for characterization the complexes was performed using an Agilent Eclipse XDB-C18 reverse-phase (5 μm, 150 × 4.6 mm) column. Aqueous 0.1% TFA (solvent A) and acetonitrile 0.05% TFA (solvent B) were used as HPLC solvents. The HPLC system started with 60% A and 40% B from 0 to 3 min. The eluent switched on from 3 min to 10 min to 100% B by a linear gradient. The gradient remained at 100% B for 8 min before switching back to 60% A and 40% B. The flow rate was 1 ml/min. For protein binding human serum assay the exclusion column was an Agilent Zorbax GF-250 (4 μm 250 × 4.6 mm) column. Aqueous 0.1 M PBS pH = 7 (Solvent A) was used as HPLC solvent in Isocratic elution. The flow rate was 1 ml/min.



^{99m}Tc(CO)₃ solution (500 μL, 1.2–1.5 GBq/ml) neutralized with 1 M HCl to pH 6.5 was added to a suspension (200 μL) of the appropriated bioconjugated zinc dithiocarbamate (**5,6**). Immediately 20 μL of PPh₃ 10⁻³ M in ethanol was added and the resulting mixture heated for 40 min at 45 °C. The reaction was monitored by HPLC. Retention times were 12.96 and 13.06 min for **13** and **14** respectively.

4. STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN MAMMALIAN MT AND FAC- $\{M(CO)_3\}$ (M=Re, Tc)

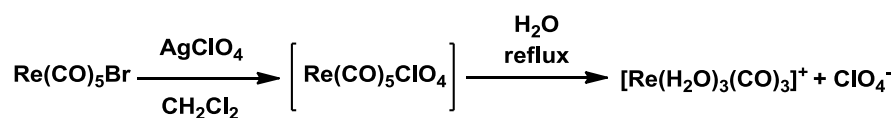
The Zn-complexes of Zn₇-MT1, Zn₇-MT2, Zn₆-Zn₇-MT3, and Zn₇-MT4 were obtained following the recombinant methodology routinely used by this group.¹⁴⁴ The recombinant expressed MTs complexes were analyzed for element composition (S, Zn,) by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) at appropriate wavelengths (S, 182.040 nm; Zn, 213.856 nm). Samples were prepared either at “conventional” (dilution with 2% HNO₃ (v/v)),¹⁴⁵ or at “acidic” (incubation in 1M HCl at 65 °C for 5 min) conditions.¹⁴⁶ MT concentrations in the recombinant preparations were calculated assuming that the only contribution to their S content was that made by the MT peptides. In all cases, the RSD in the concentration of S or Zn was lower than 5%. Several experiments were run with samples at 3 different concentrations: 10, 50 and 100 μM of each protein, which covers the common range in agreement with the sensibility of the instrument. The spectra recorded at any concentration were mainly coincident, and for this reason, suppression of signal was not considered. The spectra shown in this work are those recorded at 100 μM, which showed better S/N ratio. Molecular mass determination was performed by electrospray ionization mass spectrometry equipped with a time-of-flight analyzer (ESI-TOF MS)]. The experimental conditions for analyzing the samples were in all cases: 20 μL were injected through a PEEK long tube (1.5m×0.18mm i.d.) at 40 μL/min under the following conditions: capillary-counterelectrode voltage, 5.0 Kv; desolvation temperature, 90–110 °C; dry gas 6 L/min. Spectra were collected throughout an m/z range from 800 to 2000. The liquid carrier was a 95:5 mixture of 15 mM ammonium acetate and acetonitrile, for the analysis at pH 7.0, and for the analysis at acidic pH, a 95:5 mixture of 5 mM formic acid and acetonitrile adjusted at pH 2.4. All the samples were analyzed at least in duplicate to ensure reproducibility. For analysing the technetium samples Super dex peptide 10/200 GL (GE Healthcare) column was used with Aquose 7 mM Acetic/actetat buffer pH=7 in Isocratic elution. The flow rate was 0.5 ml/min.

¹⁴⁴ Capdevila, M.; Cols, N.; Romero-Isart, N.; Gonzalez-Duarte, R.; Atrian, S.; Gonzalez-Duarte, P. *Cell. Mol. Life Sci.* 1997, 53, 157.

¹⁴⁵ Bongers, J.; Walton, C. D.; Richardson, D. E.; Bell, J. U. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2683.

¹⁴⁶ Capdevila, M.; Domènech, J.; Pagani, A.; Tío, L.; Villarreal, L.; Atrian, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4618.

4.1. Synthesis of $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{ClO}_4$



The compound $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ (200 mg, 0.24 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and added to a solution of AgClO_4 (66 mg, 0.32 mmol) in the same solvent (5 mL). The mixture was stirred for 3 hours. Next, hexane (5 mL) was added and the resulting suspension was filtered off. The white solid was dissolved in 5 mL of water and heated at reflux temperature for one hour. The solution was standardized by ICP-OES.

4.2. Rhenium and Technetium Binding Experiments

All manipulations involving the protein and metal ion solutions were performed in Argon atmosphere. Metal-binding experiments were carried out by sequentially adding molar-ratio aliquots of concentrated $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$ ($\text{M} = \text{Re}, {}^{99}\text{Tc}$) stock solutions (pH = 3) to single solutions of either metallothionein (MT1, MT2, MT3 or MT4) on Tris/ HClO_4 buffer solution (pH = 7). Each resulting mixture was heated at 70 °C for one hour and followed by spectrometrically (MS).

Capítol VI

Bibliografia

- ¹ World Health Organization. The medical uses of ionizing radiation and isotopes. Technical Report Series 492. Geneva: WHO, **1972**.
- ² Querido, A.; Kassenaar, A. A. H.; Lameyer, L. D. F. *Acta Endocrinologic* **1953**, 12, 335.
- ³ Heeg, M.J.; Jurisson, S.S. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 1.
- ⁴ Reichert, D.E.; Anderson, D.E.; Welch, M.J. *Chemistry & Industry* **1998**, 730.
- ⁵ Jurisson, S.; Berning, D.; Jia, W.; Ma, D. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1137.
- ⁶ Mariani, G.; Bruselli, L.; Kuwert, T.; Kim, E. E.; Flotats, F.; Israel, O.; Dondi, M.; Watanabe, N. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2010**, 10, 1959.
- ⁷ Buck, A. K.; Nekolla, S.; Ziegler, S.; Beer, A.; Krause, B. J.; Herrmann, K.; Scheidhauer, K.; Wester, H.; Rummeny, E. J.; Schwaiger, M.; Drzezga, A. *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 1305.
- ⁸ World Health Organization. *The International Pharmacopoeia. November 2008, 4th edition*.
- ⁹ Paul Scherrer Institut <http://www.psi.ch> [consultada: Maig de **2012**]
- ¹⁰ Rossin, R. Tesis Doctoral, **2003**, Univesità di Padova.
- ¹¹ Chinnadurai, P.; Berg, S.; Nicolas, G.; Walter, M.; Rasch, H.; Mueller-Brand, J.; Kneifel, S. *The Open Nucl. Med. J.* **2010**, 2, 1.
- ¹² Lasne, M.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barre, L.; Roeda, D.; Dolle, F.; Crouzel, C. *Topics in Current Chemistry, 222 Contrast Agents II*, Krause, W., (Eds), Springer Verlag, **2002**, 201.
- ¹³ Dilworth, J. R.; Parrott, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 43.
- ¹⁴ Undaraiya, S.; Dizdarevic, S.; Miles, K.; Quin J.; Williams, A.; Wheatley, T.; Zammitt, C. *Endocr. Pract.* **2009**, 15, 458.
- ¹⁵ Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.
- ¹⁶ Nosco, D. L.; Beaty-Nosco, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 91.
- ¹⁷ Duatti, A.; Liu, S.; Pasqualini, R. *Current Radiopharmaceuticals* **2009**, 2, 268.
- ¹⁸ Britton, K. E. *Eur. J. Nucl. Med.* **1990**, 16, 373.
- ¹⁹ Hesslewood S.; Leung E. *Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, 21, 348.
- ²⁰ Van de Wiele, C.; Signore, A.; Dierckx, R. *Am. J. Resp. Med.* **2002**, 1, 177.
- ²¹ Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. B.; Tei, L. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3019.
- ²² Tisato, F.; Bolzati, C.; Porchia, M.; Refosco, F. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, 23, 309.
- ²³ Alberto, R., Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.

- ²⁴ Omori, T., Topics in Current Chemistry, 176, Technetium and Rhenium, Yoshihara, K.; Omori, T., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.
- ²⁵ Palestro, C. J.; Love, C.; Millier, T. *Cellular Microbiology* **2007**, 9, 2323.
- ²⁶ Palestro, C. J.; Love, C. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2007**, 50, 15.
- ²⁷ Welling M. M.; Paulusma-Annema, A.; Balter, H. S.; Pauwels, E. K. J.; Nibbering, P. H. *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, 27, 292.
- ²⁸ Yapar, Z.; Kibar, M.; Yapar, F.; Togrul, E.; Kayaselçuk, U.; Sarpel, Y. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28, 822.
- ²⁹ Bolon, M. K. *Medical Clinics of North America* **2011**, 95, 793.
- ³⁰ Pranger, A. D.; Alffenaar, J. W. C.; Aarnoutse, R. E. *Current Pharmaceutical Design* **2011**, 17, 2900.
- ³¹ Britton K. E.; Vinjamuri S, Hall A. V.; Solanki K.; Bomanji J.; Das S. *Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, 24, 553.
- ³² Hall A. V.; Solanki K. K.; Vinjamuri S.; Britton K. E.; Das S. S. *J. Clin. Pathol.* **1998**, 51, 215.
- ³³ Schauwecker, D. S.; Park, H.M.; Mock, B. H.; Burt, R. W.; Kernick, C. B.; Ruoff, A. C.; Sinn, H.J.; Wellman, N. *J. Nucl. Med.* **1984**, 25, 849.
- ³⁴ Vinjamuri, S.; Hall A. V.; Solanki, K. K.; Bomanji, J.; Siraj, O.; O'Shaughnessy, E.; Das, S. S.; Britton, K. E. *Lancet* **1996**, 347, 233.
- ³⁵ Sonmezoglu, K.; Sonmezoglu, M.; Halac, M.; Akgün, I.; Türkmen, C.; Önsel, C.; Kanmaz, B.; Solanki, K.; Britton, K. E.; Uslu, I. *J. Nucl. Med.* **2001**, 42, 567.
- ³⁶ Sarda, L.; Cremieux, A-C.; Lebellec, Y.; Meulemans, A.; Lebtahi, R.; Hayem, G.; Genin, R.; Delahaye, N.; Hutten, D.; Le Guludec, D. *J. Nucl. Med.* **2003**, 44, 920.
- ³⁷ Fuster, D.; Soriano, A.; Garcia, S.; Piera, C.; Suades, J.; Rodríguez, D.; Martínez, J. C.; Mensa, J.; Campos, F.; Pons, F. *Nucl. Med. Comm.* **2010**, 32, 44.
- ³⁸ Edelson, J.; Davison, C.; Benziger, D. P. *Drug Metabolism Review* **1977**, 6, 105.
- ³⁹ Drlica, K. *Annals of Medicine (Helsinki)* **2000**, 32, 585.
- ⁴⁰ Owens, R. C. Jr.; Ambrose, P. G. *Medical Clinics of North America* **2000**, 84, 1447.
- ⁴¹ Drevensek, P. Zupancic, T.; Pihlar, B.; Jerala, R.; Kolitsch, U.; Plaper, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 432.
- ⁴² Yu, L.-C.; Chen, Z.-F.; Liang, H.; Zhou, C.-S.; Fun, H.-K. *J. Coord. Chem.* **2006**, 15, 953.
- ⁴³ Turel, I.; Bukovec, N. *Polyhedron* **1996**, 15, 269.
- ⁴⁴ Dong-Rong Xiao,; En-Bo Wang,; Hai-Yan An, *Cristal Growth and Design* **2007**, 7, 506.
- ⁴⁵ Baenziger, N. C. *Act. Cryst.* **1986**, 42, 1505.

- ⁴⁶ Mendoza, L. M.; De Almelda, M. V.; De Abreu, H. A.; Duarte, H. A.; Grazul, R. M.; Soares, A. P. *Inorg. Chim. Act.* **2009**, 362, 2060.
- ⁴⁷ Yu, L.; Lai, L.; Liu, S.; Xia, Y. *J. Coord. Chem.* **2009**, 62, 2261.
- ⁴⁸ Rodríguez-Puig, D.; Piera, C.; Fuster, D.; Soriano, A.; Sierra, J.; Rubi, S.; Suades, J. *J. Label Compd Radiopharm.* **2006**, 49, 1171.
- ⁴⁹ Imre, J. *J. Radioanalytical and Nucl. Chem.* **1984**, 87, 291.
- ⁵⁰ Deutsch, E.; Libson, K.; Jurisson, S.; Lindoy, L. F. *Progr. Inorg. Chem.* **1983**, 30, 75.
- ⁵¹ Bondoli, G.; Mazzi, U.; Roncari, E.; Deutsch, E. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 44, 191.
- ⁵² Johannsen, B.; Spies, H. *Topics in Current Chemistry*, 176 *Technetium and Rhenium*, Dunitz, J. D.; Hafner, K.; Ito, S.; Lehn, J.-M.; Raymond, K. N.; Rees, C. W.; Thiem, J.; Vögtle, F., (Eds), Springer Verlag, **1996**, 275.
- ⁵³ Oh, S. J.; Ryu, J.; Shin, J. W.; Yoob, E. J.; Ha, H.; Cheon, J. H.; Leel, H. K. *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, 57, 193.
- ⁵⁴ Rose, D. J.; Maresca, K. P.; Kettler, P. B.; Chang, Y. D.; Soghomomian, V.; Chen, Q.; Abrams, M. J.; Larsen, S. K.; Zubieta, J. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 3548.
- ⁵⁵ Dilworth, J. R. *Inorg. Chem.* **1997**, 31, 257.
- ⁵⁶ Gray, H. B.; Brewer, J. C.; *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 3334.
- ⁵⁷ Wang, E.-B.; Su, Z.-M.; Xiao, D.-R.; An, H.-Y.; Li, Y.-G.; Gao, L.; Sun, C.-Y.; Xu, L. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6673.
- ⁵⁸ Drevensek, P.; Ulrih, N. P.; Majerle, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1705.
- ⁵⁹ Drevensek, P.; Zupancic, T.; Pihlar, B.; Jerala, R.; Kolisch U.; Plaper, A.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 432.
- ⁶⁰ Zieba, A.; Masnamkiewicz, A.; Silkowski, J. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, 42, 903.
- ⁶¹ Chattah, A. K.; Linck, Y. G.; Monti, G. A.; Levstein, P. R. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 850.
- ⁶² Zahid, H. C.; Caludiu, T. S.; Scozzafava, A. *J. Enzyme Inhibition and Med. Chem.* **2005**, 20, 303.
- ⁶³ Alberto, R. *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1179.
- ⁶⁴ Marzilli, L. G.; Carlone, M.; Taylor, A. T.; Xu, X. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 5437.
- ⁶⁵ Halder, K. K.; Nayak, D. K.; Baishya, R.; Sarkar, B. R.; Sinha, S.; Ganguly, S.; Debnath, B. C. *Metallomics*, **2011**, 3, 1041.
- ⁶⁶ Shijian, Z.; Weifang, Z.; Yue, W.; Zhonghui, J.; Xuebin, W.; Junbo, Z.; Yanyan, Z. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 369.
- ⁶⁷ Junbo, Z.; Xuebin, W.; Shijian, Z.; Haixun, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3781.
- ⁶⁸ Schmidt, S. P.; Trogler, W. C.; Basolo, F. *Inorg. Synth.* **1985**, 23, 41.

- ⁶⁹Miroslavov, A. E.; Gorschkov, N. I.; Lumpov, A. A.; Suglobov, D. N. *Radiokhimiya* **1996**, 15, 213.
- ⁷⁰Egli, A.; Hegetschweiler, K.; Alberto, R.; Abram, U.; Schibli, R.; Hedinger, R.; Gramlich, V.; Kissner, R.; Schubiger P. A. *Organometallics* **2007**, 692, 1332.
- ⁷¹Fallati, C. S.; Ahumada, A. A.; Manzo, R. H. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **1994**, 13, 73.
- ⁷²Hernández-Borrell, J.; Montero, M. T. *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 1311.
- ⁷³Gray, H. B.; Brewer, J. C. *Inorg. Chem.* **1997**, 31, 257.
- ⁷⁴Junbo Z.; Haixun G.; Shijian Z.; Yan L.; Xuebin W.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5168.
- ⁷⁵Lecompte, S.; Baron, M. H.; Chenon, M. T.; Coupry, C.; Moreau, N. J. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1994**, 38, 2810.
- ⁷⁶Turel, I.; Leban, I.; Bukovek, N. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 66, 241.
- ⁷⁷Brown, P. O.; Cozzarelli, N. R. *Science* **1979**, 206, 1081.
- ⁷⁸Shen, L. L.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Donell, T. J.; Chu, D. W. T.; Cooper, C. S.; Rosen, T.; Pernet, A. G. *Biochemistry* **1989**, 28, 3886.
- ⁷⁹Kirchhausen, T.; Wang, J. C.; Harrison, S. C. *Cell* **1985**, 41, 933.
- ⁸⁰Drlica, K.; Franco, R. J. *Biochemistry* **1988**, 27, 2253.
- ⁸¹Black, M. T.; Stachyra, T.; Platel, D.; Girard, A. M.; Claudon, M.; Bruneau, J. M.; Miossec, C. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **2008**, 52, 3339.
- ⁸²Patel, M. N.; Chhasatia, M. R.; Patel, S. H.; Bariya, H. S.; Thakkar, V. R. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2009**, 24, 715.
- ⁸³Sierra, J. M.; Rodriguez-Puig, D.; Soriano, A.; Mensa, J.; Piera, C.; Vila, J. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **2008**, 52, 2691.
- ⁸⁴Wen-Sheng, H.; Yung-Hsiao, C.; Jiann-Chyun, L.; Yuan-Hwa, C.; Cheng-Yi, C.; Ren-Shyan, L. *J Nucl. Med.* **2003**, 44, 999.
- ⁸⁵Alberto, R. *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol 5, chapter 5.2, (McCleverty, J. A.; Meyer, T. J., editors), Elsevier, **2003**.
- ⁸⁶Stahl, L.; Smoliakova, I. P. *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol 3, Chapter 2, (Crabtree, R. H.; Mingos, D. M. P, editors), Elsevier, **2007**.
- ⁸⁷Boyle, E. M.; Kovacich, J. C.; Norbert, F.; Canty, T. O. Jr.; Morgan, E.; Pohlman, T. H.; Verrier, E. D. Inhibition of NF-κB mediated tissue injury using dithiocarbamate derivatives. Patent WO 2000/000192, Jan 6, 2000.
- ⁸⁸Jones, M. M.; Singh, P. K.; Jones, S. G.; Mukundan, C. R.; Banton J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 27.

- ⁸⁹ Arterburn, J. B.; Rao K. V.; Goreham, D. M.; Valenzuela, M. V.; Holguin, M. S.; Hall, K. A.; Ott, K. C.; Bryan, J. C. *Organometallics* **2000**, *19*, 1789.
- ⁹⁰ Eisenhut, M.; Lehmann, W. D.; Becker, W.; Behr, T.; Elser, H.; Strittmatter, W.; Steinstr asser, A.; Baum, R. P.; Valerius, T.; Repp, R.; Deo, Y. *J. Nucl. Med.* **1996**, *37*, 362.
- ⁹¹ Haiduc, I. *Comprehensive Coordination Chemistry II*; McCleverty, J. A.; Meyer, T. J. Elsevier: Oxford, 2004. Vol. 1 Chapter 1.15.6.
- ⁹² Lin, X.; Jin, Z.; Ren, J.; Pang, Y.; Zhang, W.; Huo, J.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2012**, *79*, 239.
- ⁹³ Kim, Y. S.; He, Z.; Hsieh, W. Y.; Liu, S. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 473.
- ⁹⁴ Sokolov M.; Imoto, H.; Saito H. *Inorg. Chem. Comm.* **1999**, *2*, 422.
- ⁹⁵ Alberto, R.; Schibli, R. Method for the Preparation of Facial Metal Tricarbonyl Compounds and their use in the Labelling of Biologically Active Substrates. Patent WO/1998/048848, Nov, 1998.
- ⁹⁶ Mundwiler, S.; K undig, M.; Ortner, K. Alberto, R. *Dalton trans* **2004**, 1320.
- ⁹⁷ Egli, A.; Alberto, R.; Tannahill, L.; Schibli, R.; Schubiger, P. A. *J. Nucl. Med.* **1990**, *40*, 1913.
- ⁹⁸ Gorshkov, N. I.; Schibli, R.; Schubiger, A. P.; Lumpov, A. A.; Miroslavov, A. E.; Suglobov, D. N. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4757.
- ⁹⁹ Schibli, R.; La Bella, R.; Alberto, R.; Garcia-Carayoa, E.; Ortner, K.; Abram, U.; Schubiger, P. A.; *Bioconjugated* **2000**, *11*, 345.
- ¹⁰⁰ Jones, M. M.; Singh, P. K.; Jones, S. G.; Mukundan, C. R.; Banton J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 27.
- ¹⁰¹ Aravamundan, G.; Brown, D. H.; Venkappayya, D. *J. Chem. Soc.(A)* **1971**, 2744.
- ¹⁰² Van Gaal, H. L. M.; Diesveld, J. W.; Pijpers, F. W.; Van Der Linden, J. G. M. *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 3251.
- ¹⁰³ Prakasam, B. A.; Ramalingam, K.; Bocelli, G.; Cantoni, A. *Polyhedron* **2007**, *26*, 448.
- ¹⁰⁴ Mora, A. J.; Delgado, G.; Ramírez, B. M.; Rincón, L.; Almeida, R.; Cuervo, J.; Bahsas, A. *Journal of Molecular Structure*, **2002**, 615, 201.
- ¹⁰⁵ Bonamico, M.; Muzzoni, G.; Vaciago, A.; Zambonelli, L. *Acta Cryst.* **1965**, *19*, 898.
- ¹⁰⁶ Myamae, H.; Ito, M.; Iwasaki, H. *Acta Cryst.* **1979**, *B35*, 1480.
- ¹⁰⁷ Addison, A. W.; Rao, T, N *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 1349.
- ¹⁰⁸ Wang, F.; Wang, X.; Yang, S.; Liu, J.; Zhang, X. *J. Label Compd. Radiopharm*, **2008**, 51 347.

- ¹⁰⁹ Czopek, A.; Byrtus, H.; Kolaczowski, M.; Pawlowski, M.; Dybala, M.; Nowak, G.; Tatarczynska, E.; Wesolowska, A.; Chojnacka-Wójcik, E. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 1295.
- ¹¹⁰ Borg, J. *Behavioural Brain Research* **2008**, 195, 103.
- ¹¹¹ Petrig, J.; Schibli, R.; Dumas, C.; Alberto, R.; Schubiger, P. A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1868.
- ¹¹² Lewis, B. E.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1327.
- ¹¹³ Guo, J.; Ma, L.; Liu, P. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2010**, 185, 2348.
- ¹¹⁴ Alberto, R.; Egli, A.; Abram, U.; Hegetschweiler, K.; Gramlich, V.; Schubiger, P. A. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 19 2815.
- ¹¹⁵ Suardi, G.; Cleary, B. P.; Duckett, S. B.; Sleigh, C.; Rau, M.; Reed, E. W.; Lohman, J. A. B.; Eisenberg R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7716.
- ¹¹⁶ Ariafard, A.; Amini, M. M.; Fazaeli, R.; Aghabozorg, H. R. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2004**, 672, 141.
- ¹¹⁷ Herrick, R. S.; Ziegler, C. J.; Sripathongnak, S.; Barone, N.; Costa, R.; Cupelo, W.; Gambella, A. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3929.
- ¹¹⁸ Riondato, M.; Camporese, D.; Martín, D.; Suades, J.; Alvarez-Larena, A.; Mazzi, U. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4048.
- ¹¹⁹ Silaghi-Dumitrescu, L.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Haiduc, I.; Toscano, R.-A.; Garcia-Montalvo, V.; Cae-Olivares, R.; *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1999**, 625, 347.
- ¹²⁰ Bisceglia, J. A.; Mollo, M. C.; Orelli, L. R. *J Mol. Struct.* **2010**, 966, 79.
- ¹²¹ Miroslavov, A. E.; Sidorenko, G. V.; Suglobov, D. N.; Lumpov, A. A.; Gurzhiy, V. V.; Grigorev, M.S.; Mikhalev, V. A. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1098.
- ¹²² Cols, N.; Romero-Isart, N.; Capdevila, M.; Oliva, B.; González-Duarte, P.; González-Duarte, R.; Atrian, S. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 157.
- ¹²³ Morelock, M. M.; Cormier, A. T.; Tolman, G. L. *Inorg. Chem.* **1988**, *28*, 3137.
- ¹²⁴ Jones, W. B.; ELgren, T. E.; Morelock, M. M.; Elder, R. C.; Wilcox, D. E. *Inorg. Chem.* **1994**, *38*, 5571.
- ¹²⁵ Virzi, F.; Winnard, P.; Fogarasi, M.; Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J. *Bioconjugated Chem.* **1995**, *6*, 139.
- ¹²⁶ Sano, T.; Glazer, A. N.; Canton, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1534.
- ¹²⁷ Behr, T. M.; Becker, W. S.; Klein, M. W. *Cancer Res* **1995**, *55*, 5786.
- ¹²⁸ Burchiel, S. W.; Hadjian, R. A.; Hladik, W. B.; Drozynski, C. A.; Tolman, G. L.; Haber, S. B.; Gallagher, B. M. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 1357.
- ¹²⁹ Pietersz, G. A.; Patrick, M. R.; Chester, K. A. *J. Nucl. Med.* **1998**, *56*, 47.
- ¹³⁰ Margoshes, M.; Valle, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4813.

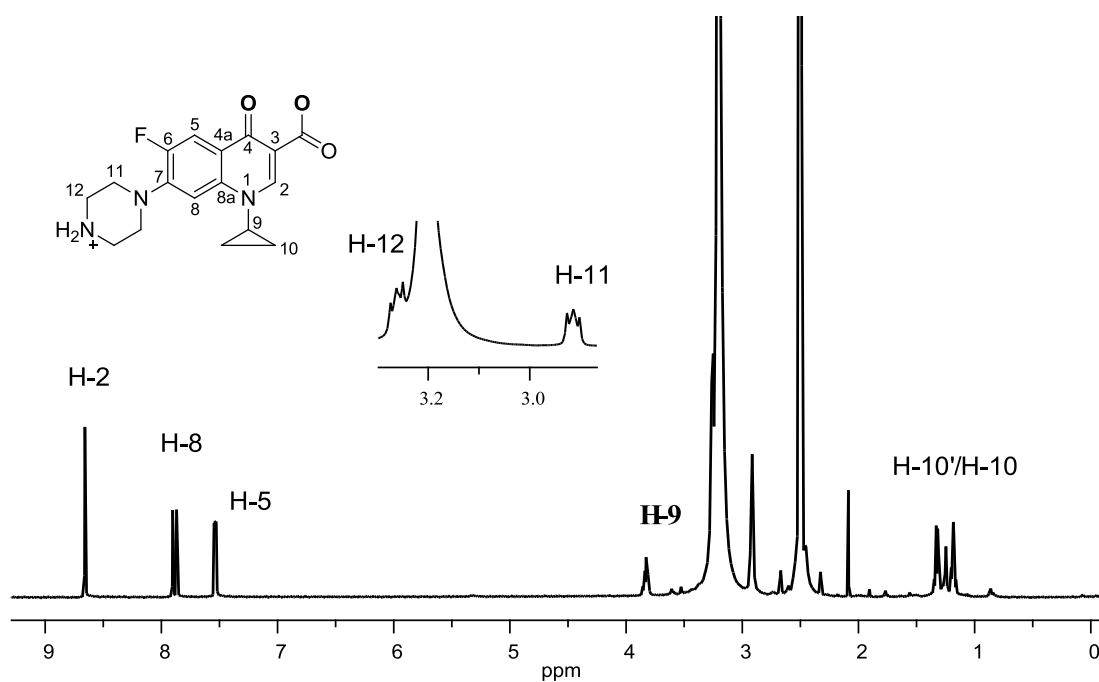
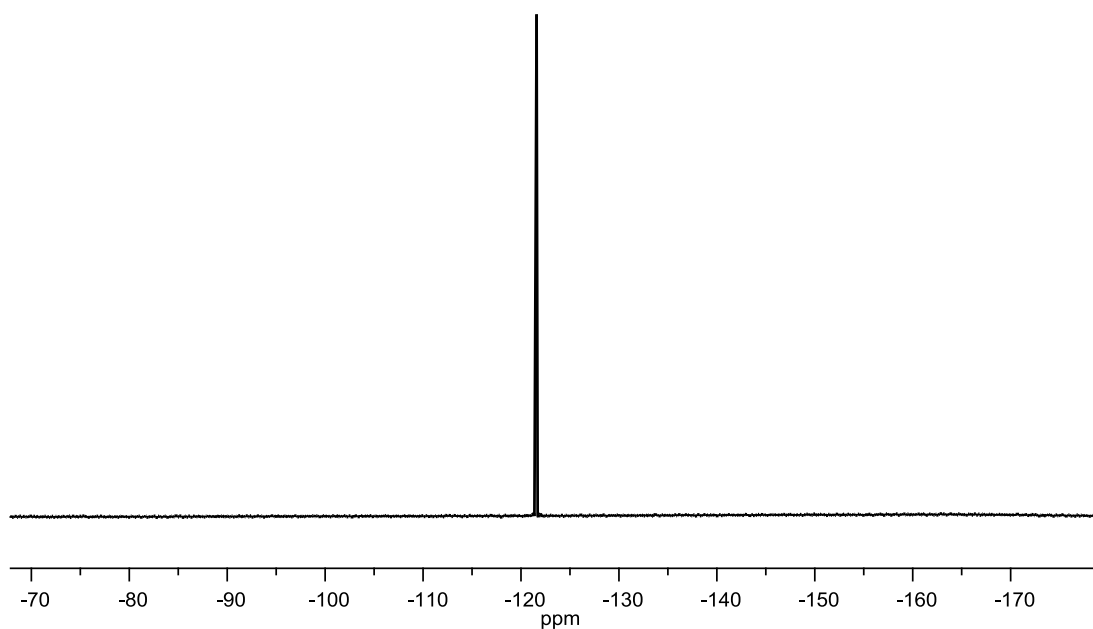
- ¹³¹ Ferderigos, N.; Zikos, C. *Essays Contemp. Pep. Sci.* **2011**, 19.
- ¹³² Bell, S. G.; Vallee, B. L. *Chem. Bio. Chem.* **2009**, 10, 55.
- ¹³³ Lia, Y.; Maret, W. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 1055.
- ¹³⁴ Faller, P.; *FEBS. J.* **2010**, 277, 2921 (and references therein).
- ¹³⁵ Fowler, B. A.; Hildebran, C. F.; Kojima, Y.; Webb, M. *Methalothioneins II* Kägi, J. H: R.; Kojima, Y. (eds) 52 Birkäuser Basel, **1987**, 19.
- ¹³⁶ Kägi, J. H.R.; Valle, B. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 3460.
- ¹³⁷ Valls, M.; Bofill, R.; Gonzalez-Duarte, R.; Gonzalez-Duarte, P.; Capdevila, M.; Atrian, S *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 32835.
- ¹³⁸ Bofill, R.; Capdevila, M.; Atrian, S. *Metallomics* **2009**, 1, 229.
- ¹³⁹ Palacios, O.; Atrian, S.; Capdevila, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 991.
- ¹⁴⁰ Schmidt, S.P.; Trogler, W. C.; Basolo, F. *Inorg. Synth.* **1985**, 23, 41.
- ¹⁴¹ Buchana, W. J. Szabo, Z. *Principles of Nuclear Medicine*, Wagner, H. N. Jr. (Ed) Barnes & Noble, **1995**.
- ¹⁴² Tesi Doctoral Catalina Perez Zuñiga, actualment en curs.
- ¹⁴³ Yu, X.; Wojciechowski, M.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1355.
- ¹⁴⁴ Capdevila, M.; Cols, N.; Romero-Isart, N.; Gonzalez-Duarte, R.; Atrian, S.; Gonzalez-Duarte, P. *Cell. Mol. Life Sci.* 1997, 53, 157.
- ¹⁴⁵ Bongers, J.; Walton, C. D.; Richardson, D. E.; Bell, J. U. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2683.
- ¹⁴⁶ Capdevila, M.; Domènech, J.; Pagani, A.; Tío, L.; Villarreal, L.; Atrian, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4618.

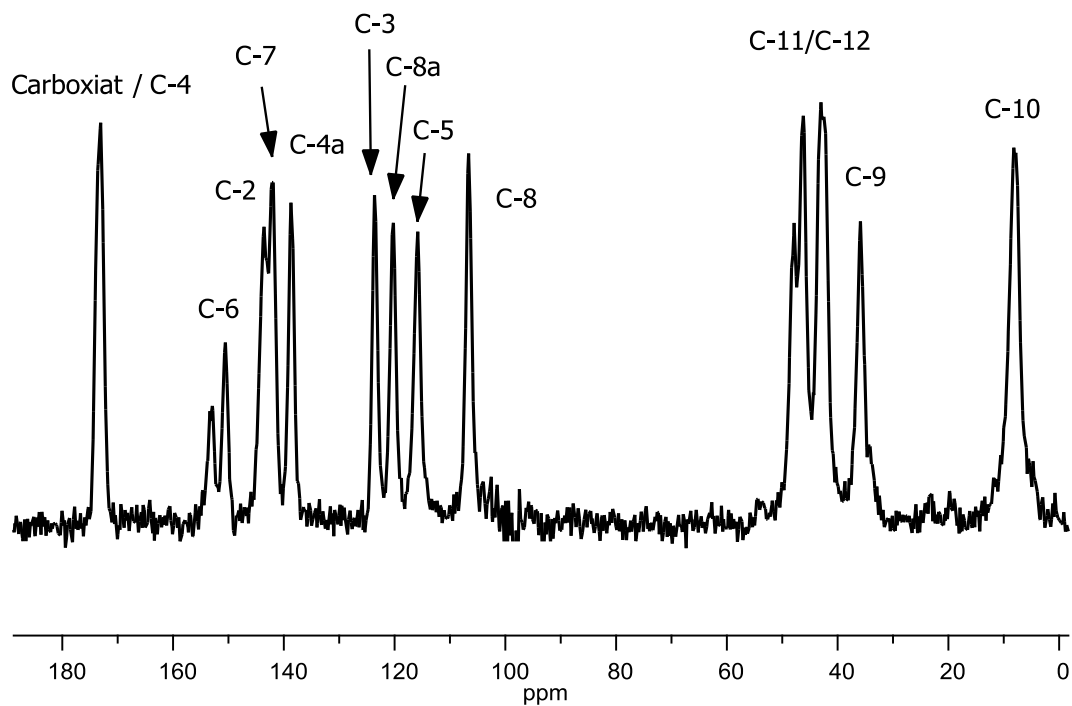
Capítol VII

Recull d'espectres i dades cristal·logràfiques

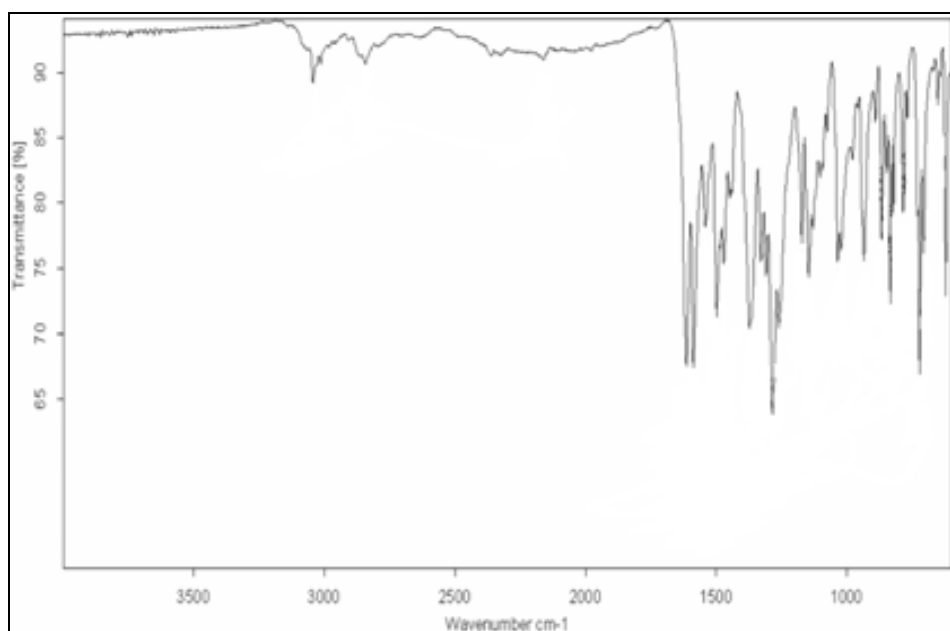
RECULL D'ESPECTRES

Ciprofloxacina

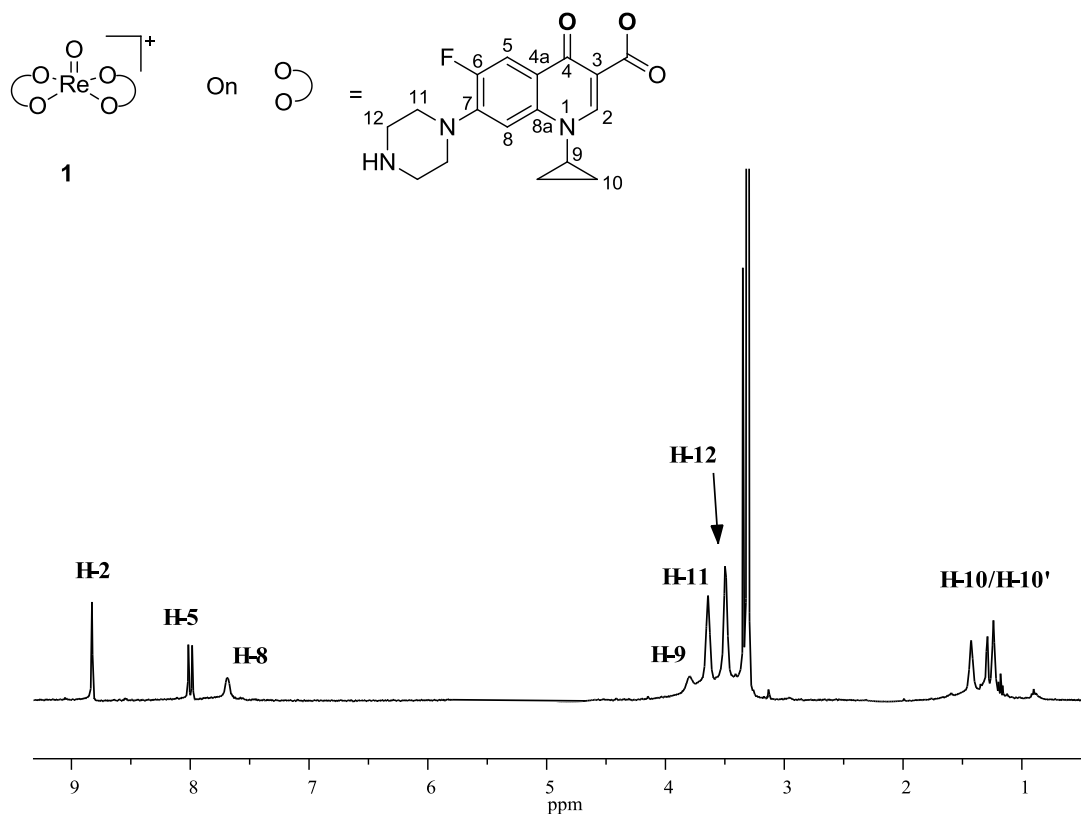
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆)¹⁹F{¹H}-RMN (400 MHz, DMSO-d₆)



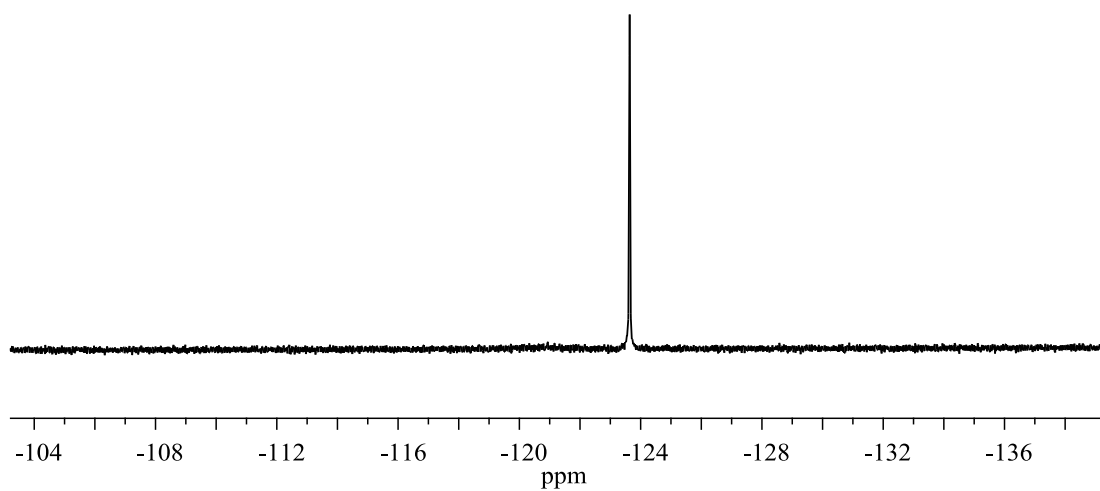
^{13}C CP-MAS (100 MHz)



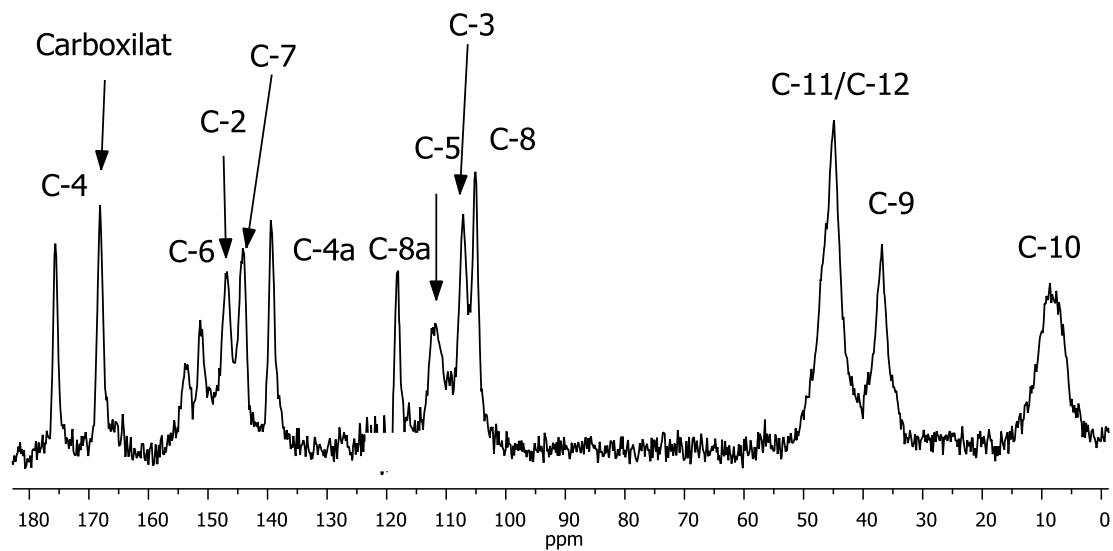
IR(ATR)



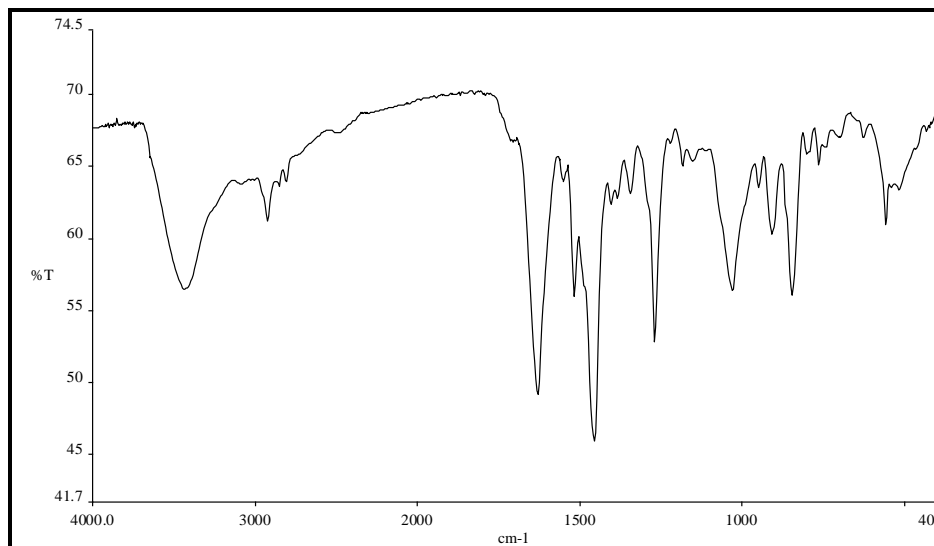
^1H -RMN (400 MHz, MeOD)



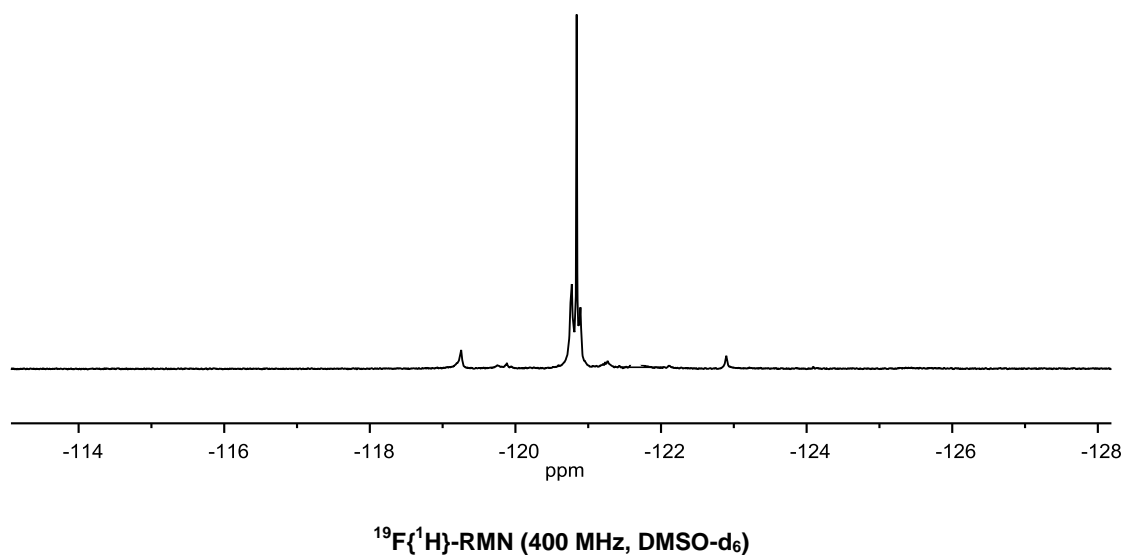
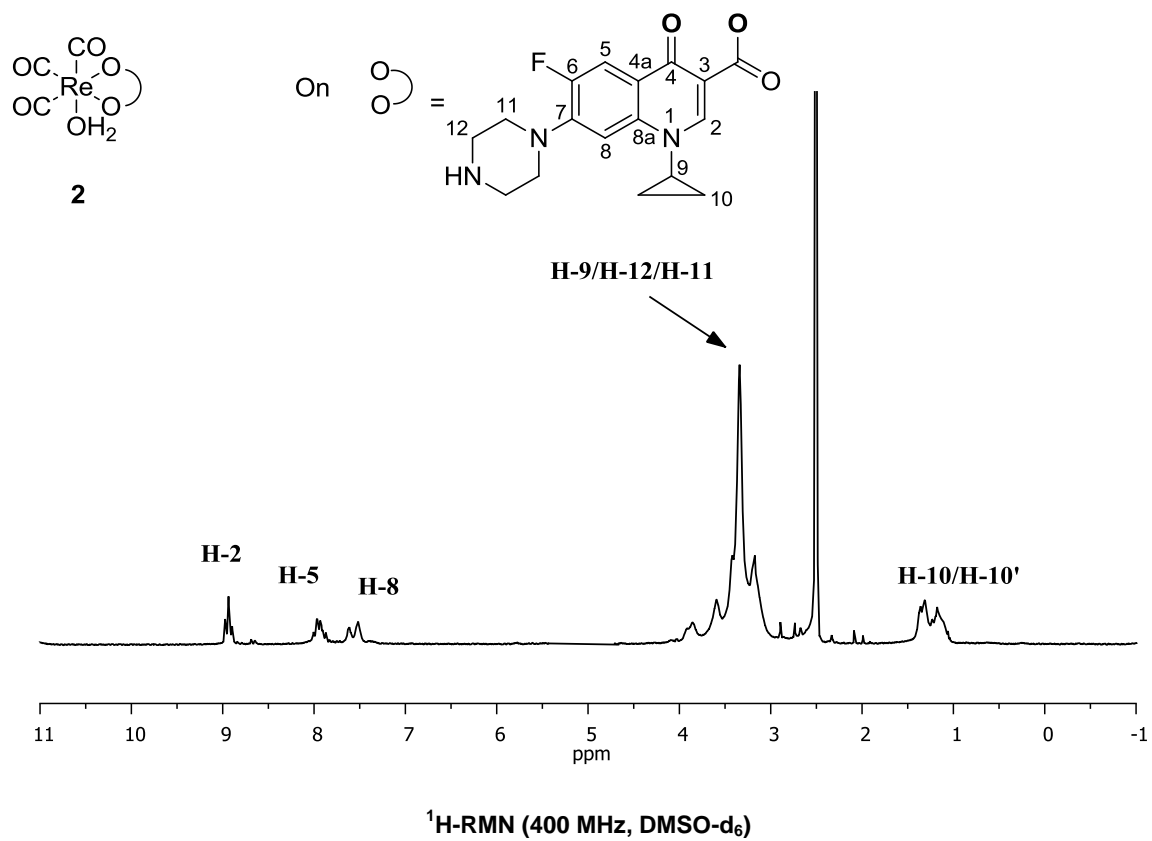
$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -RMN (400 MHz, MeOD)

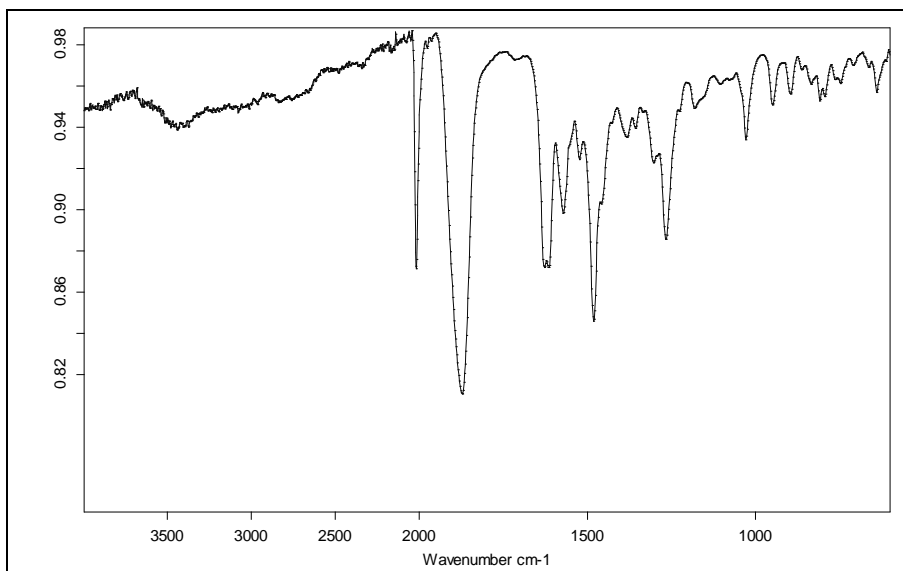
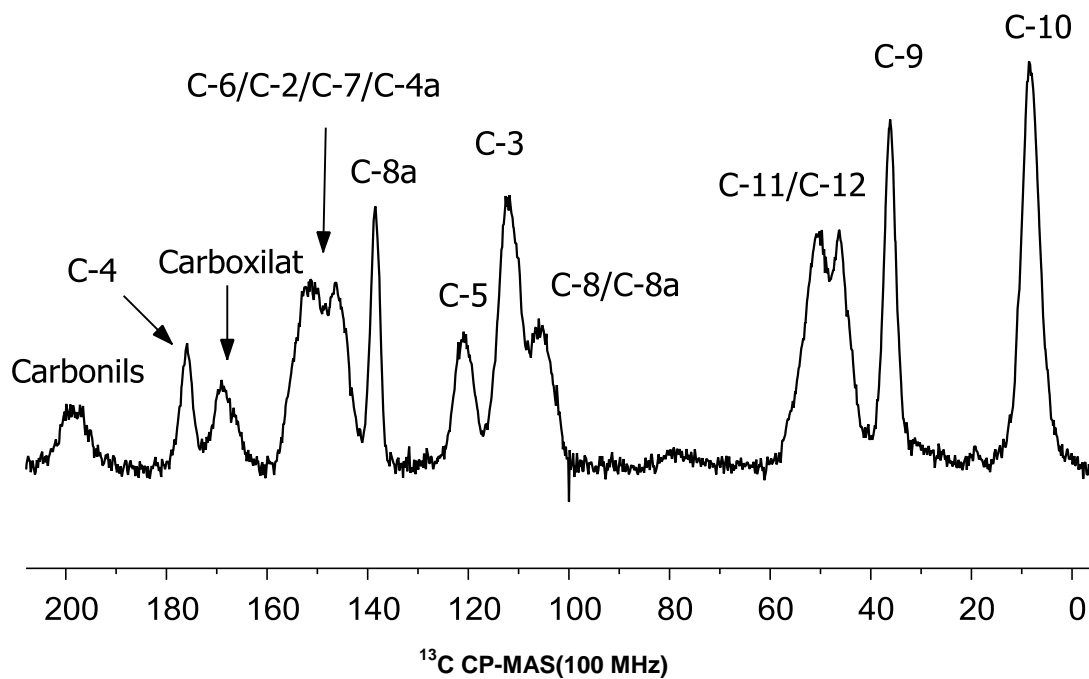


^{13}C -RMN (100 MHz, MeOD)

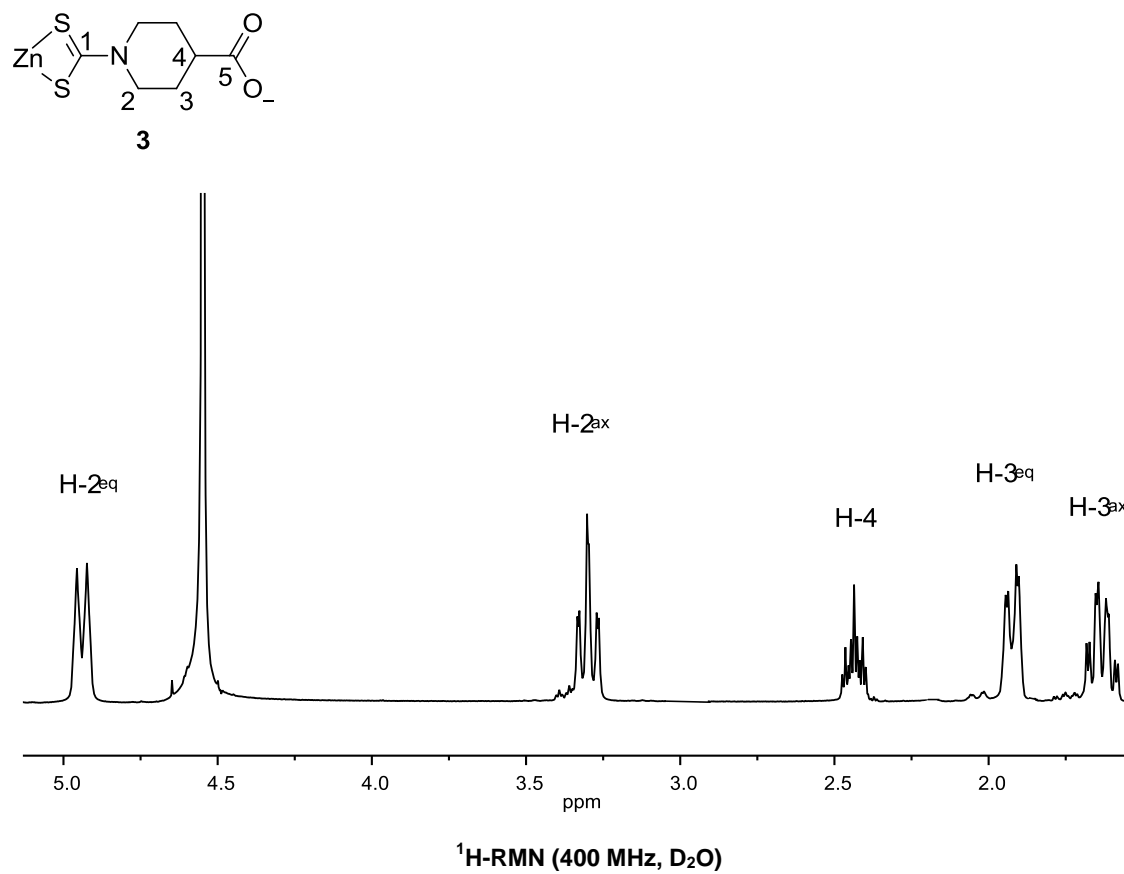
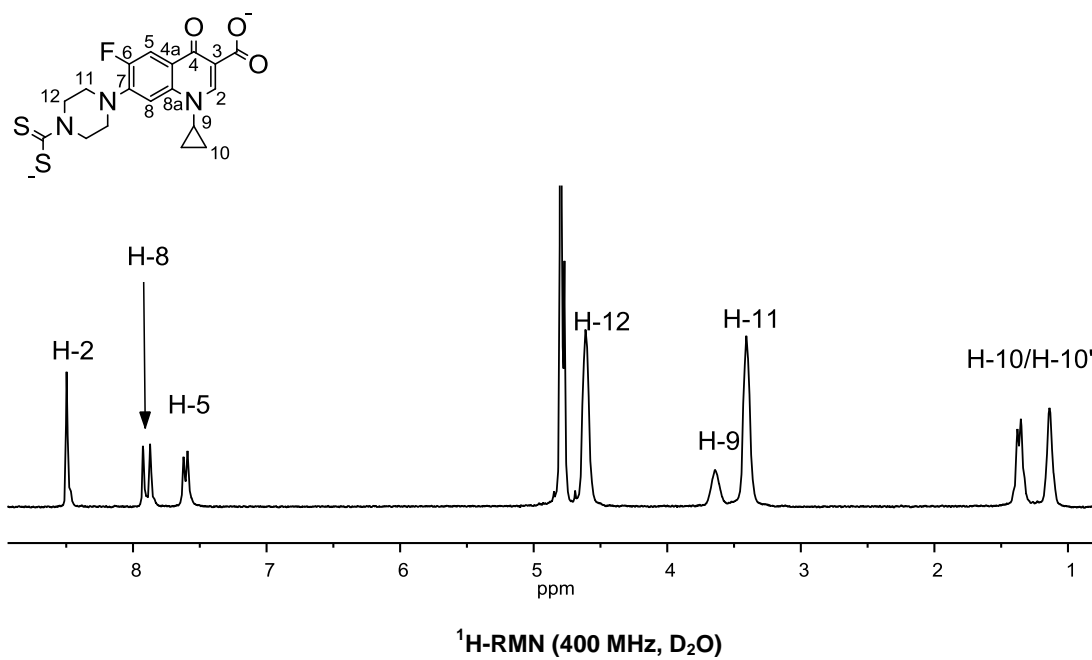


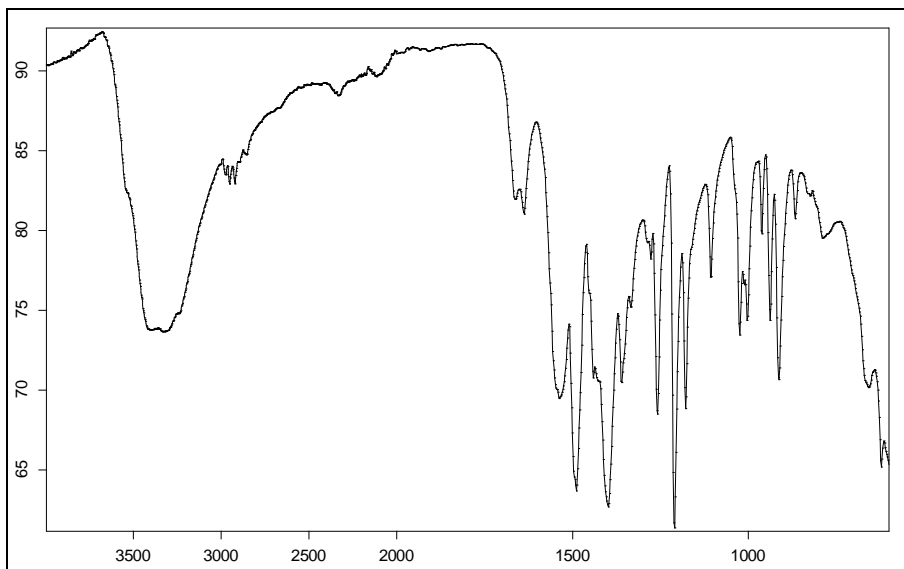
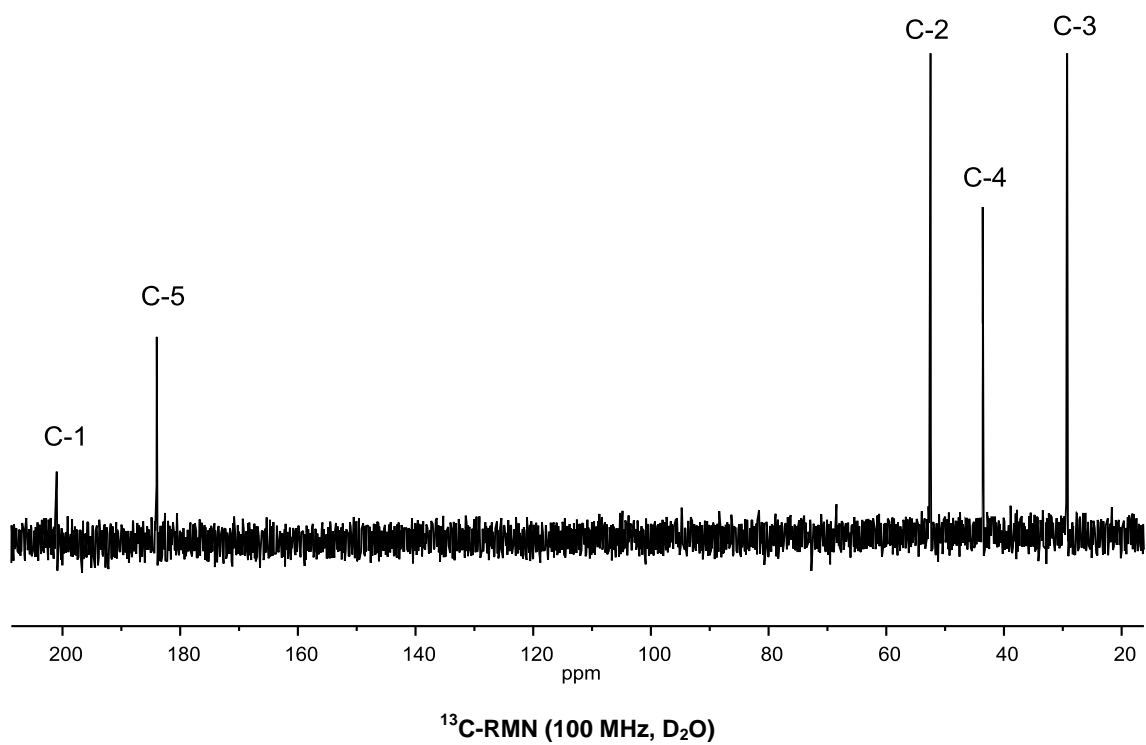
IR(ATR)



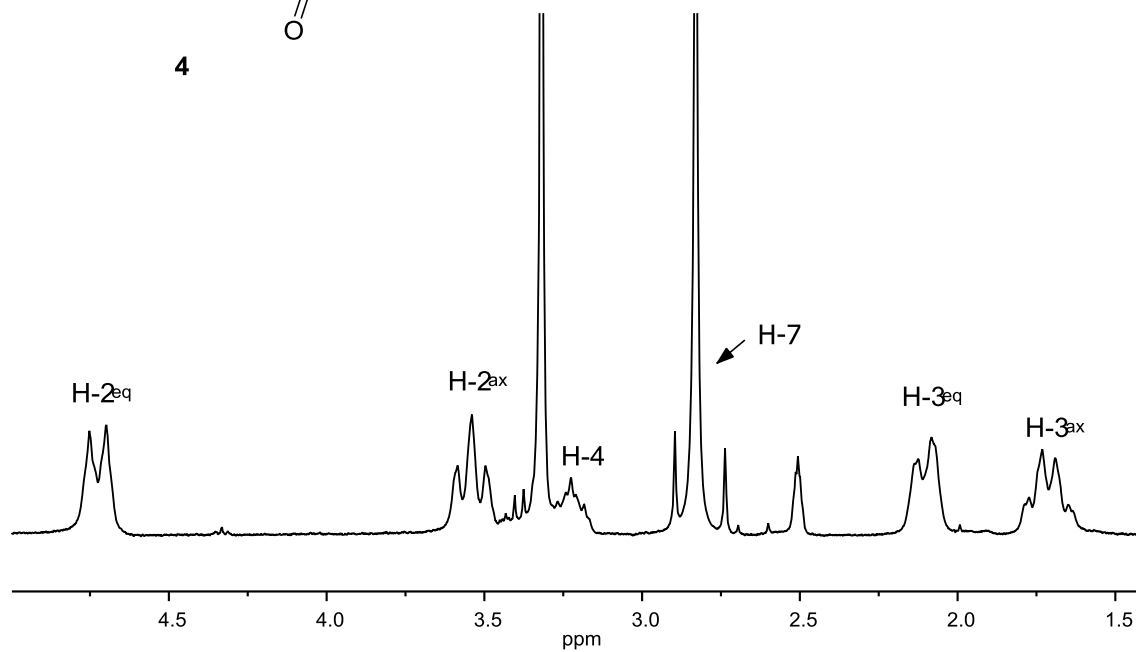
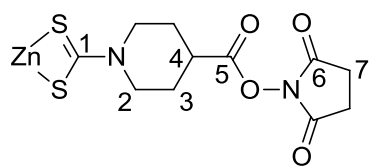


IR(ATR)

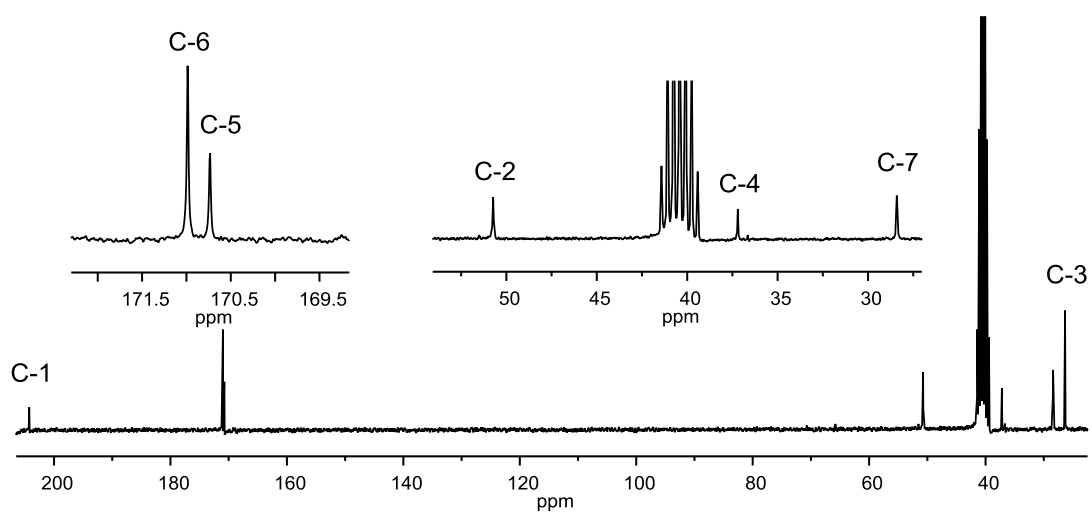




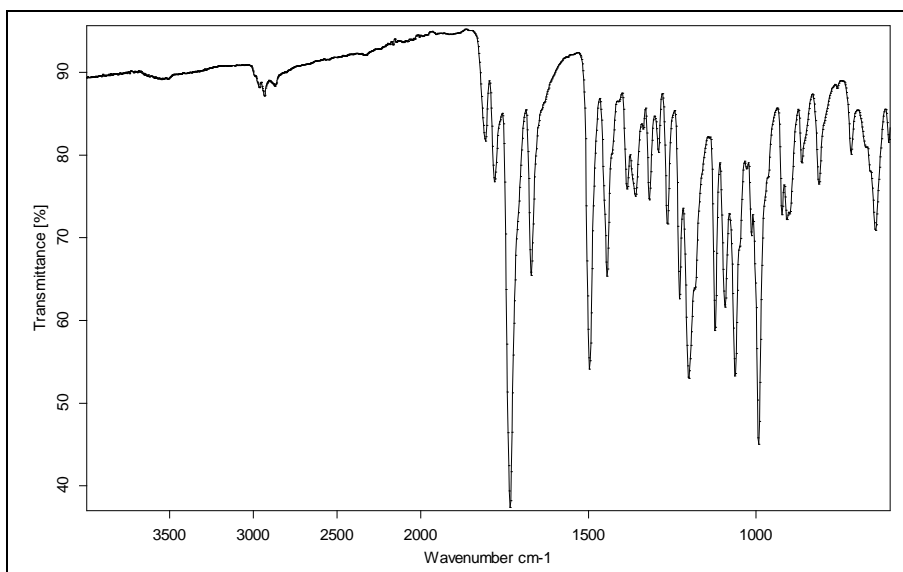
IR (ATR)



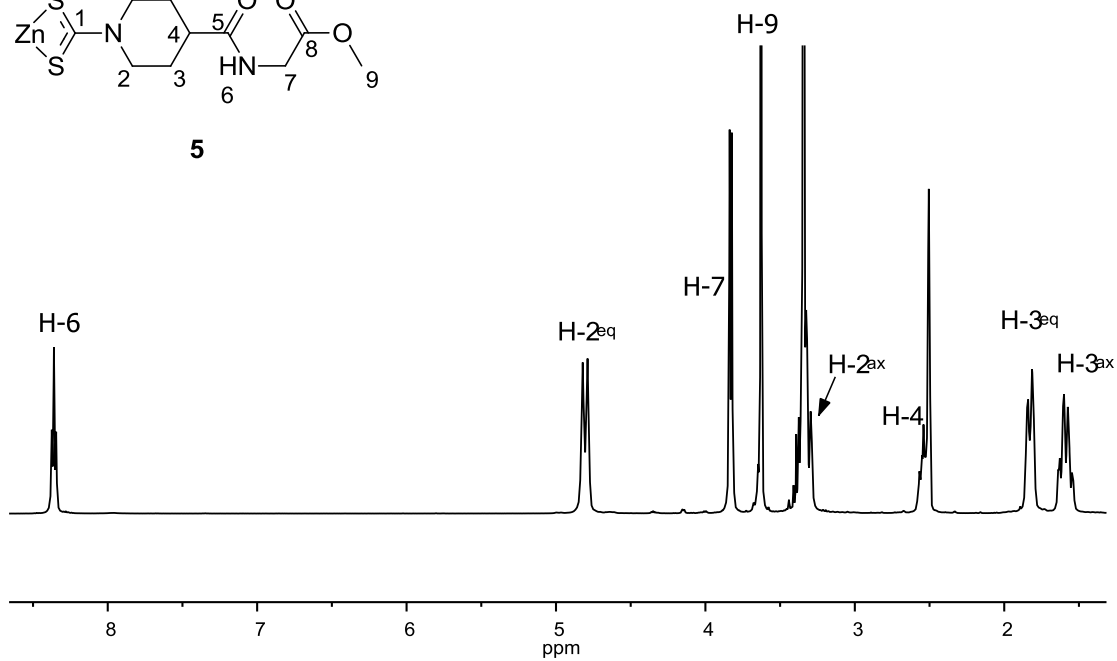
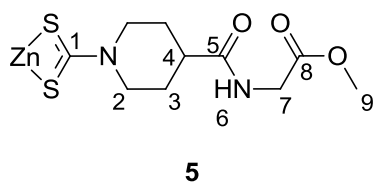
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆)



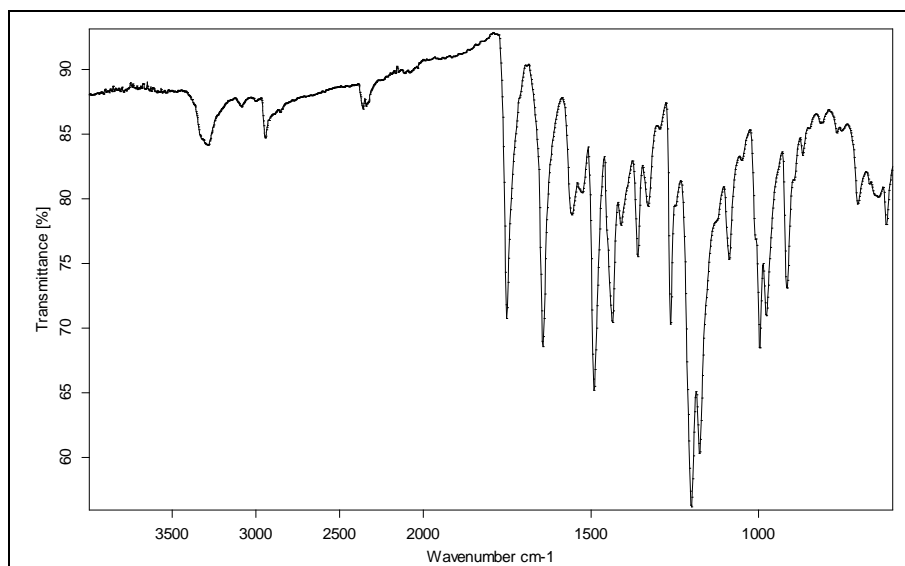
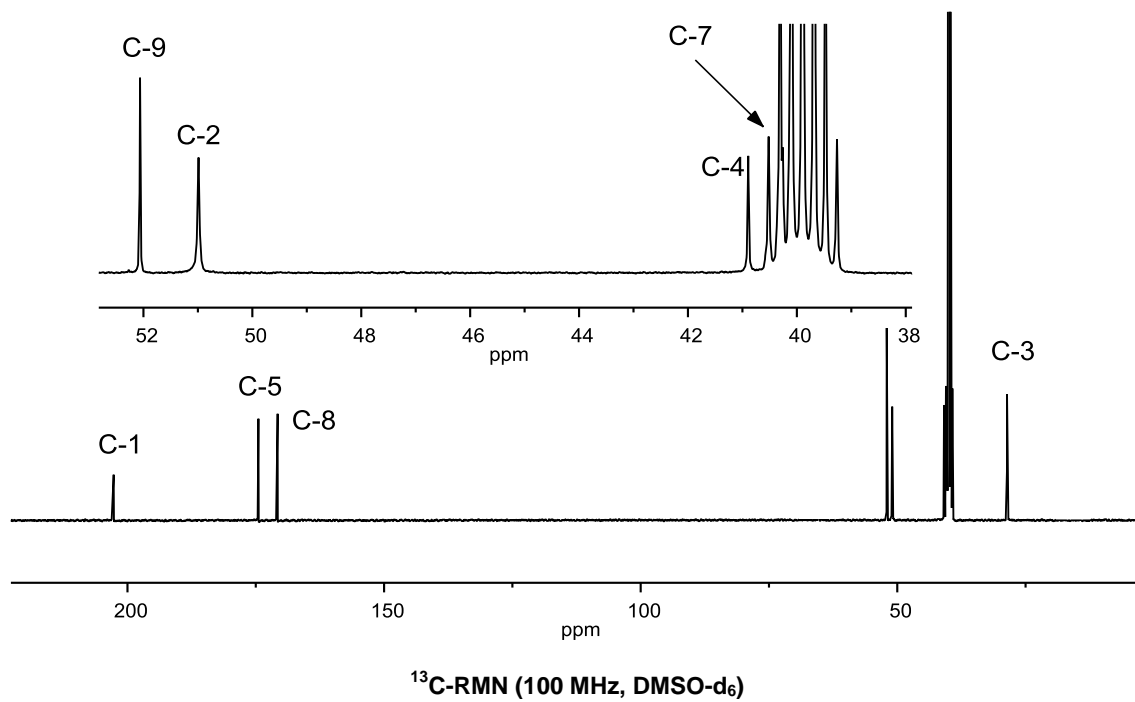
¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆)



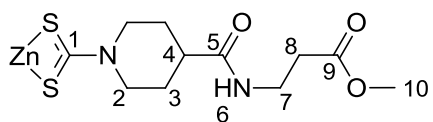
IR (ATR)



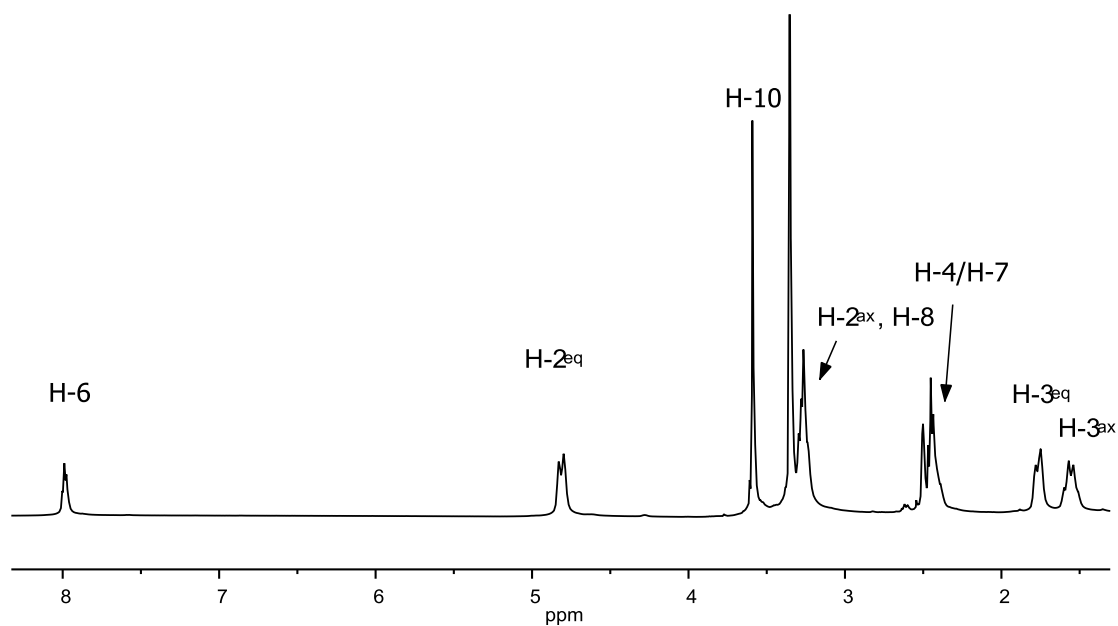
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6)



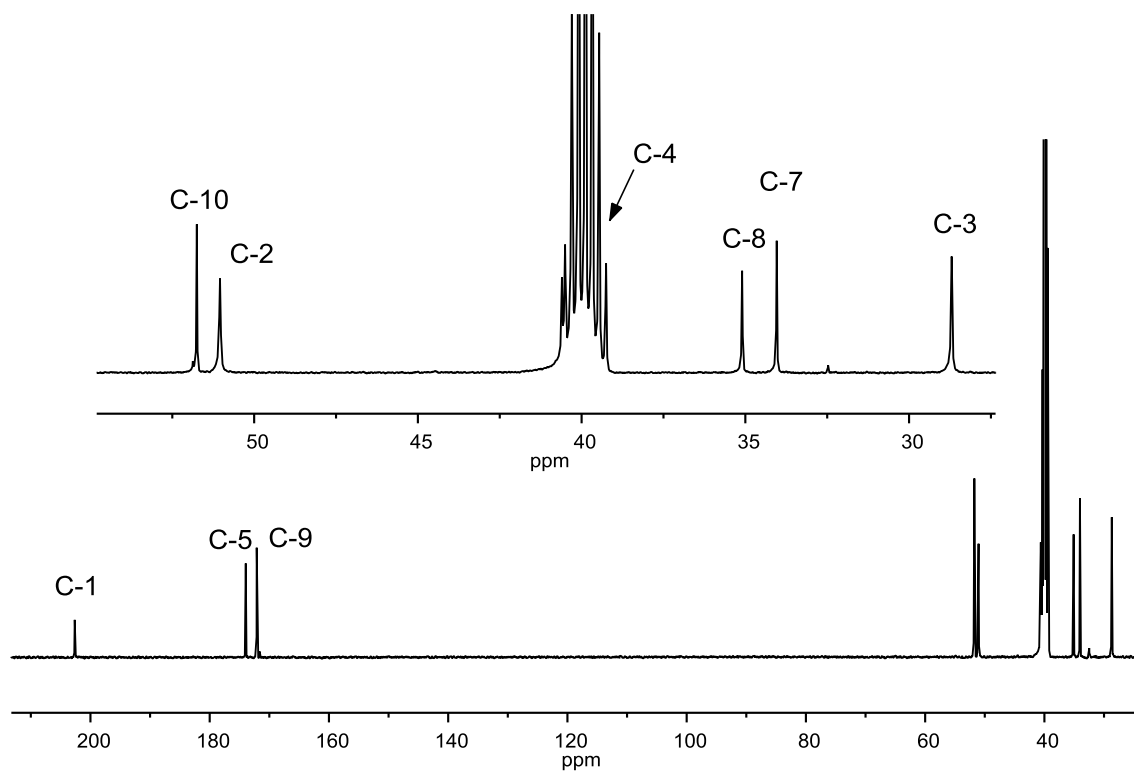
IR (ATR)



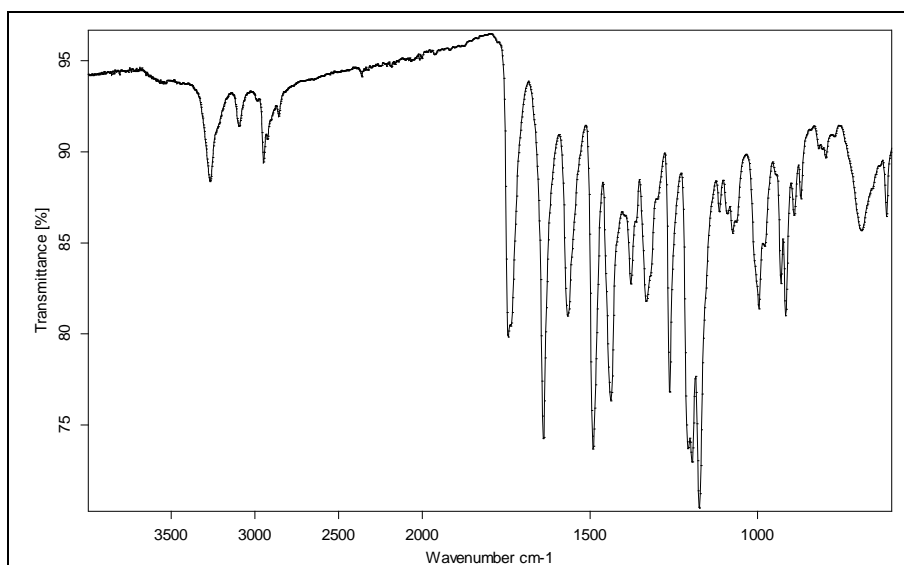
6



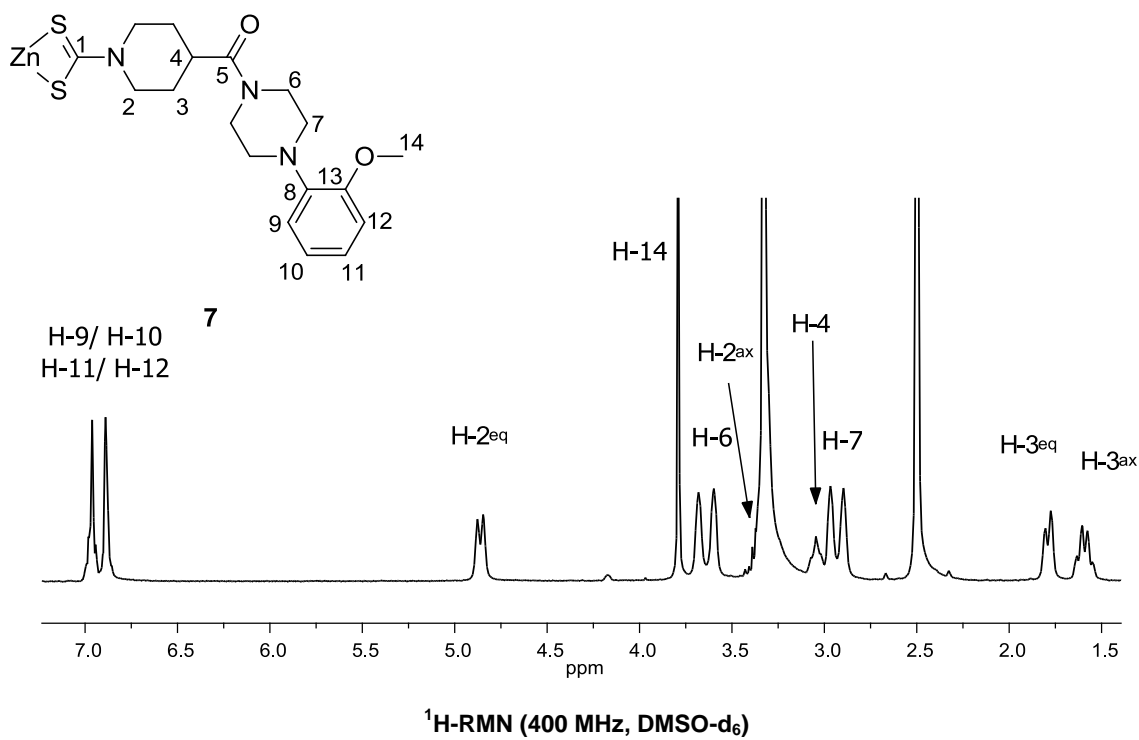
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆)

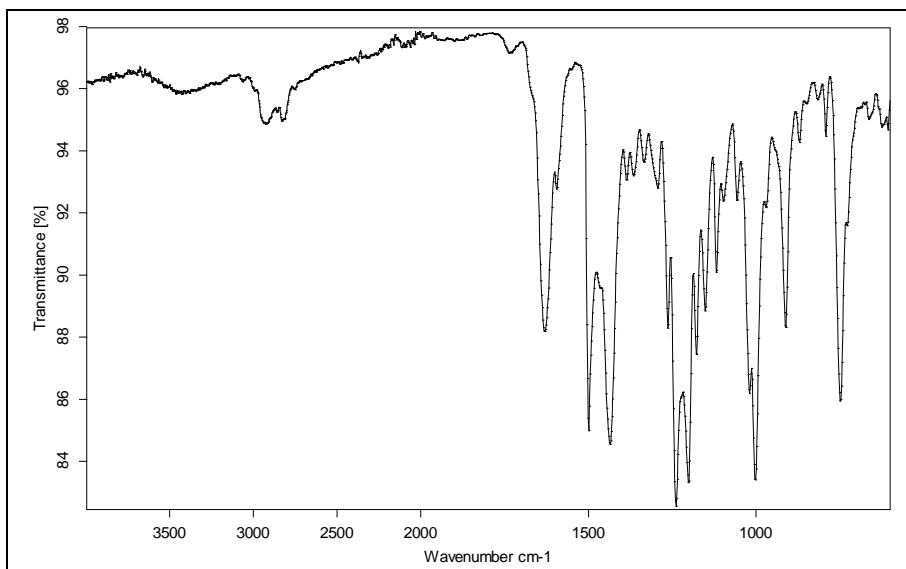
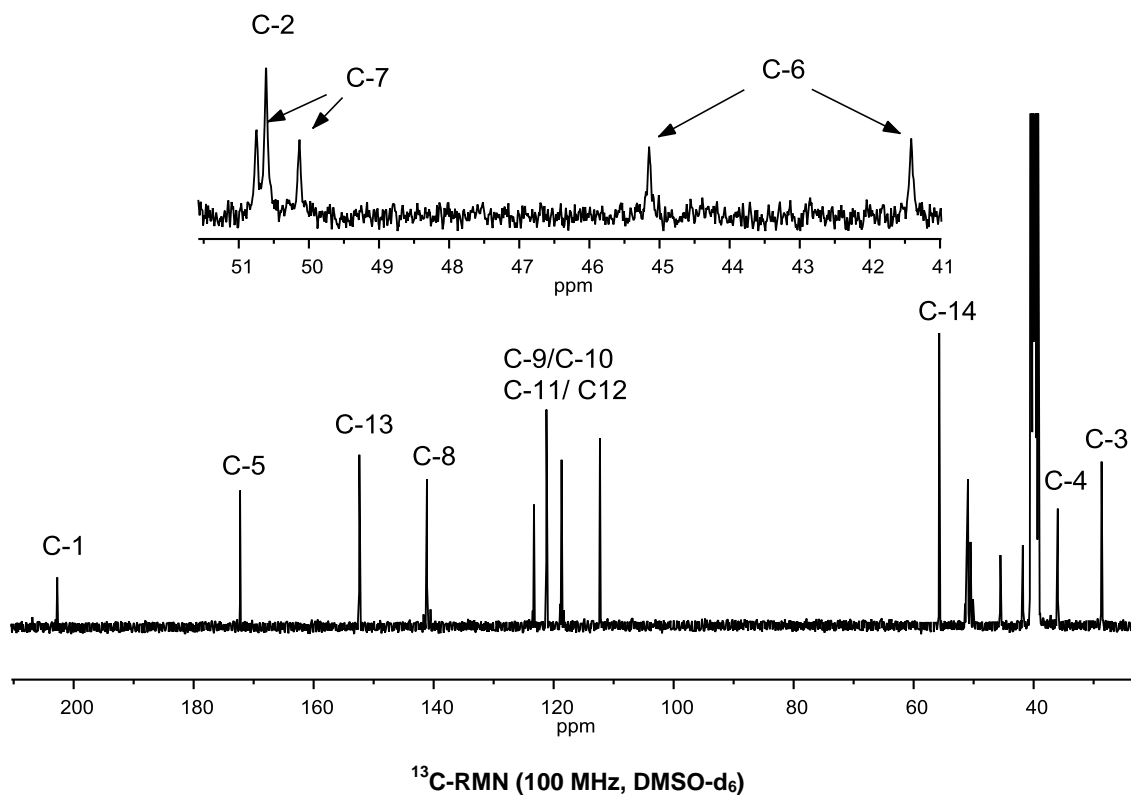


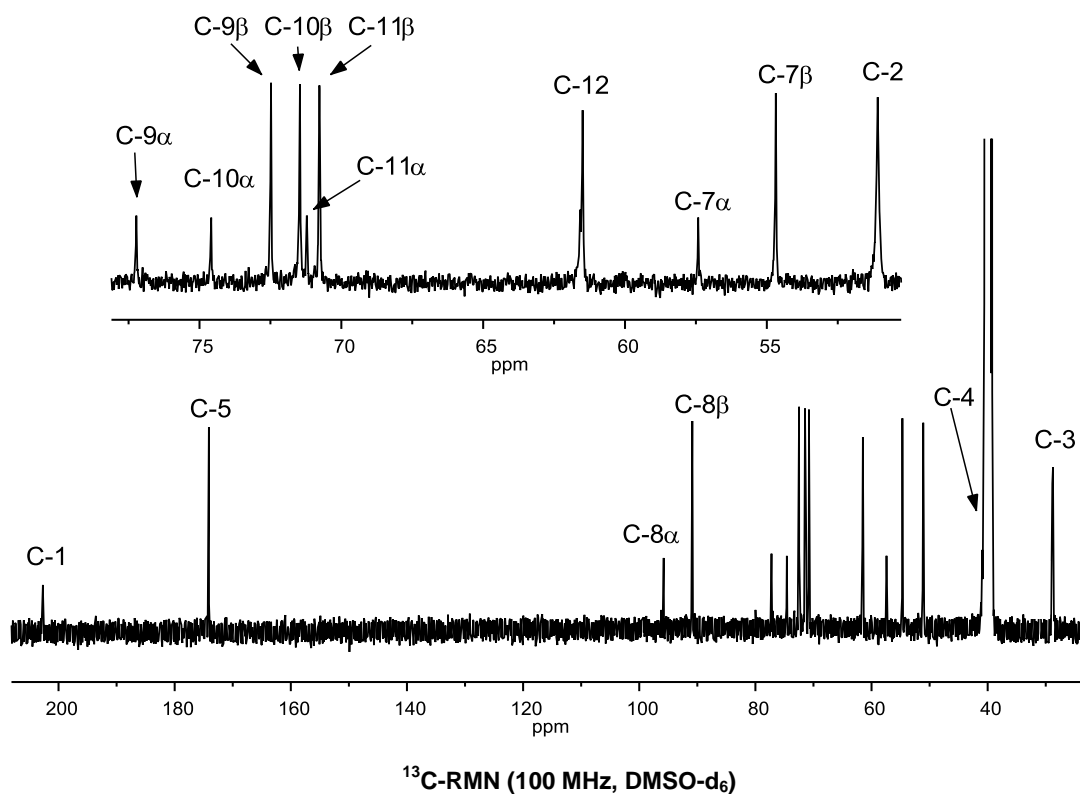
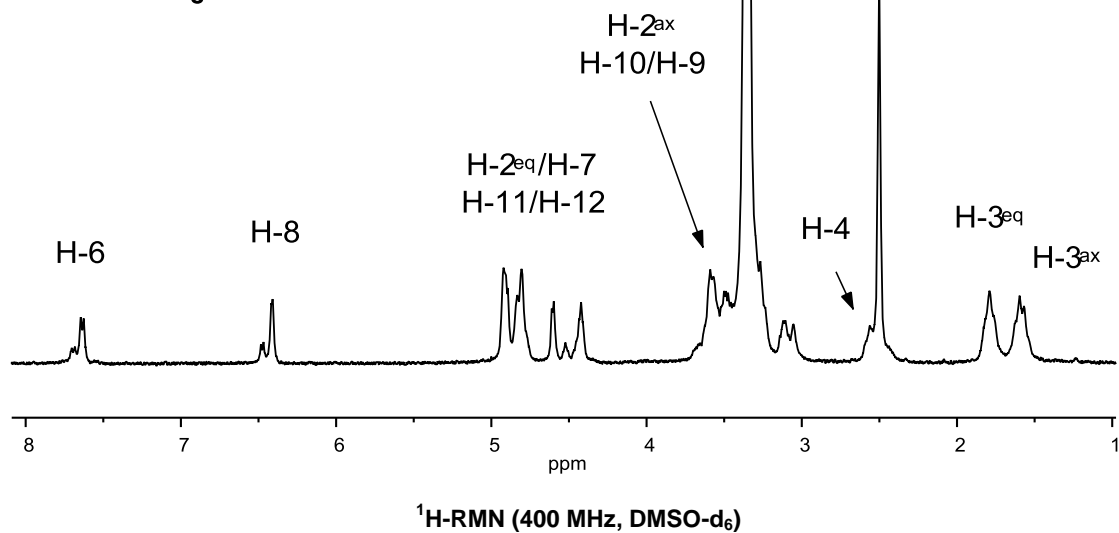
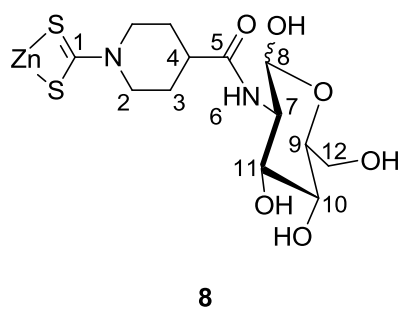
¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆)

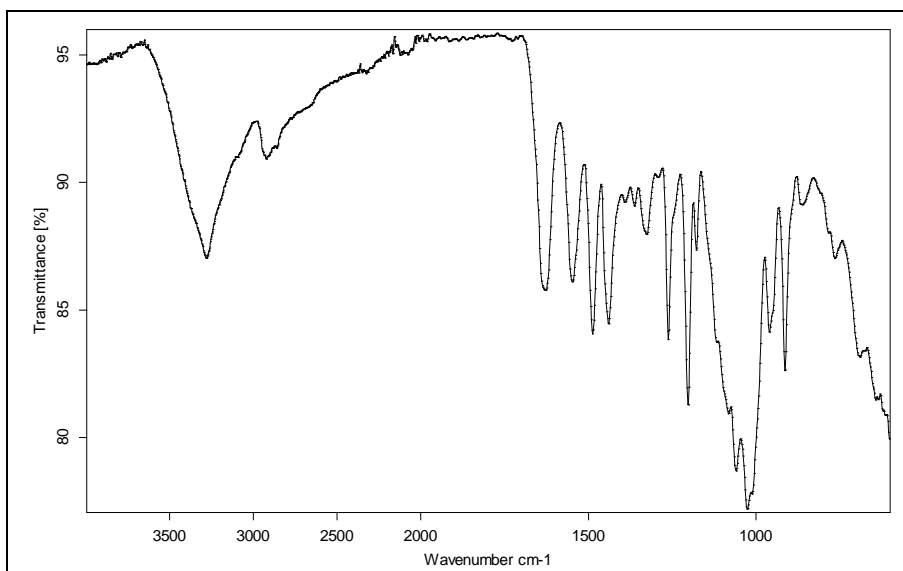


IR (ATR)

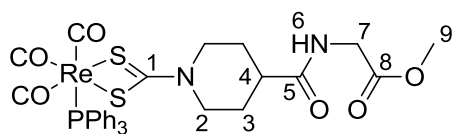




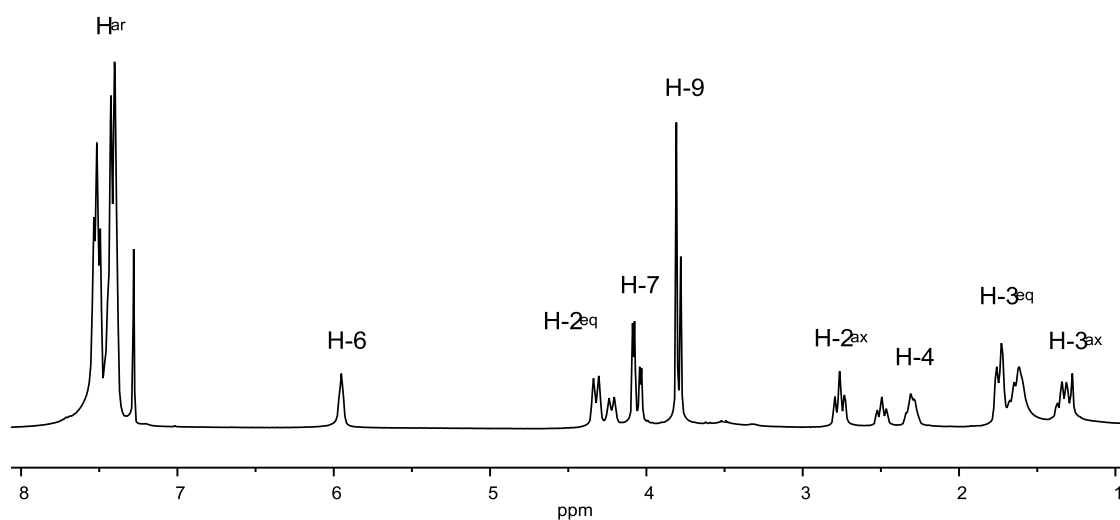




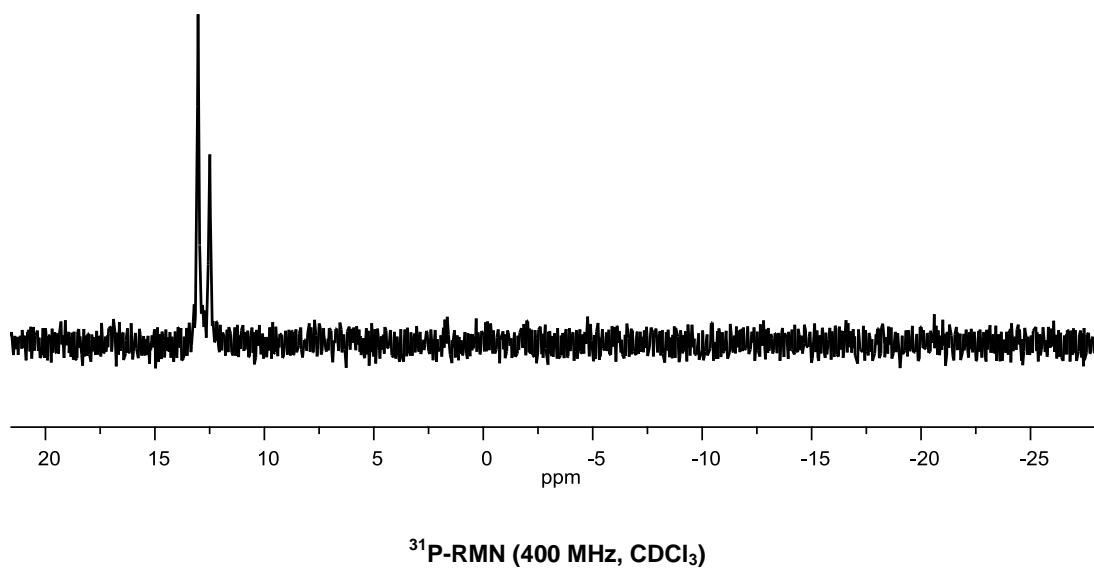
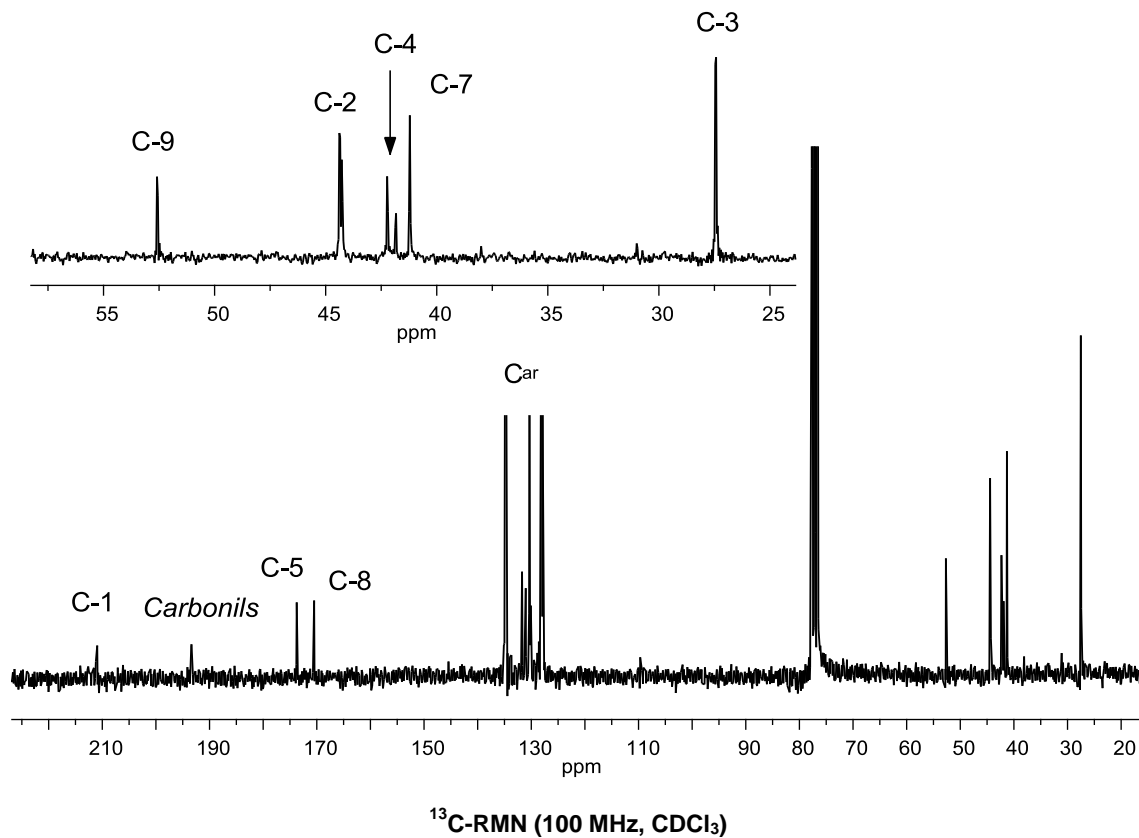
IR (ATR)

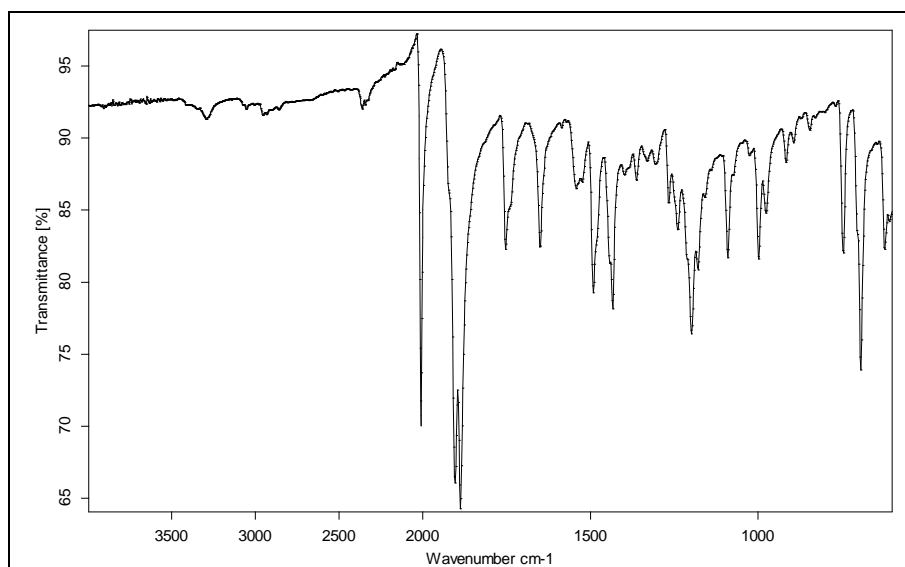


9

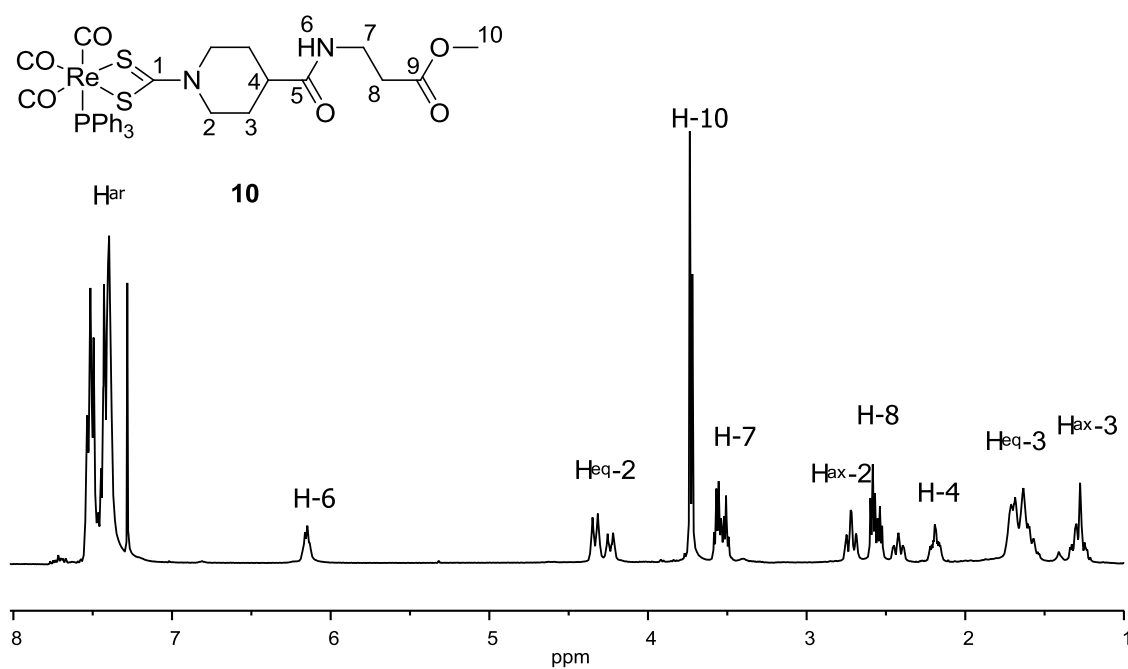


$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3)

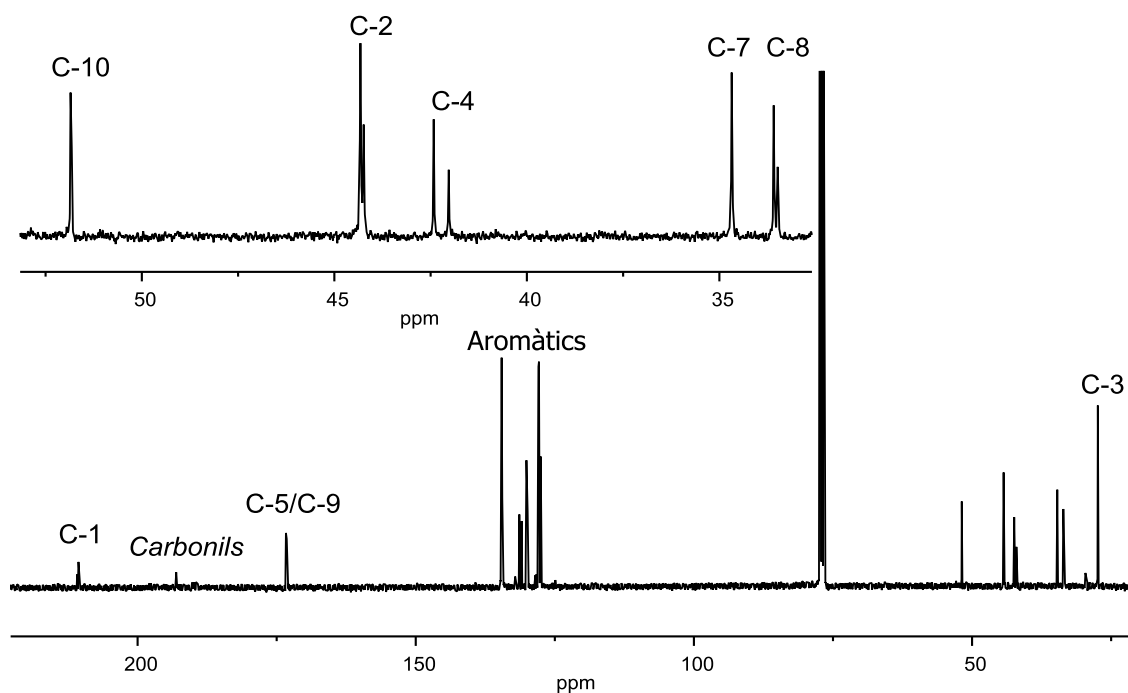




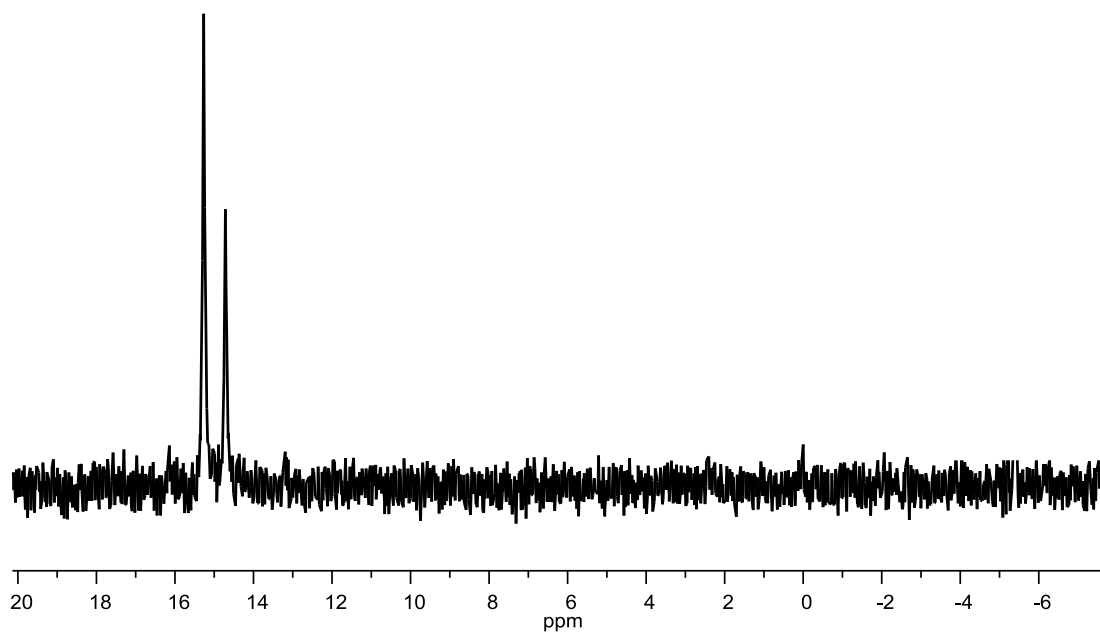
IR (ATR)



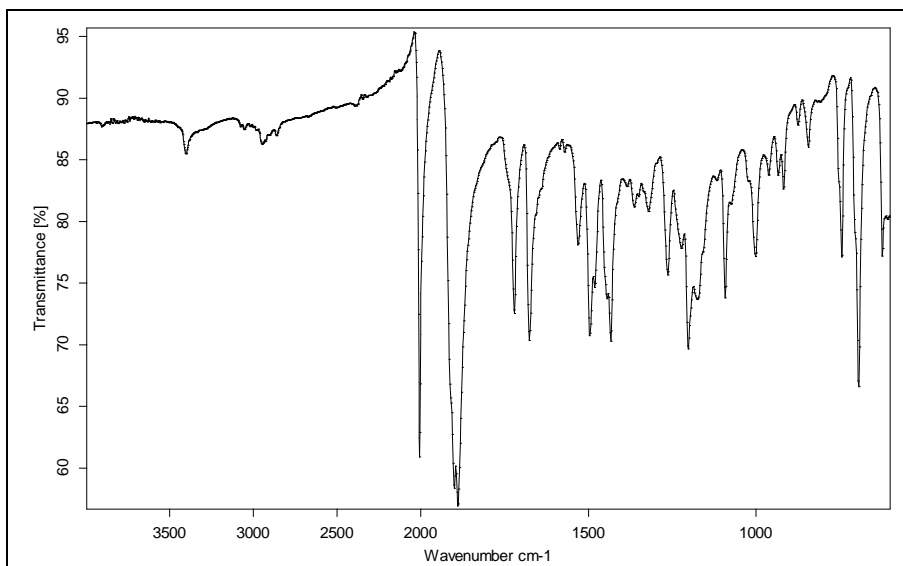
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3)



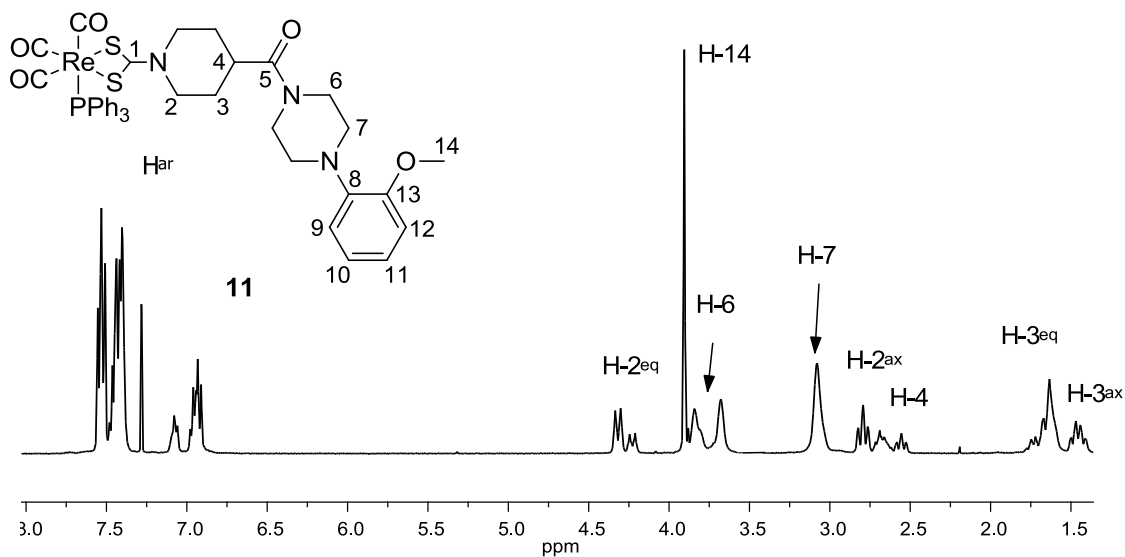
^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3)



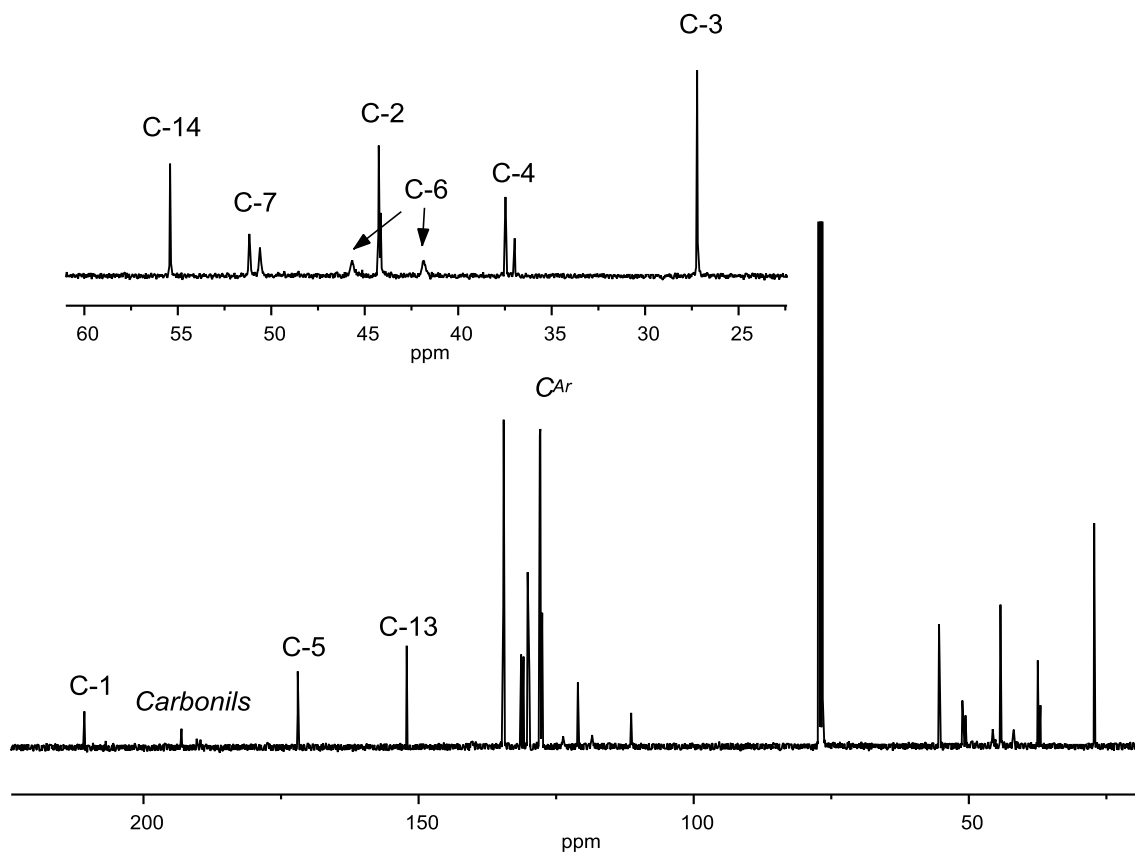
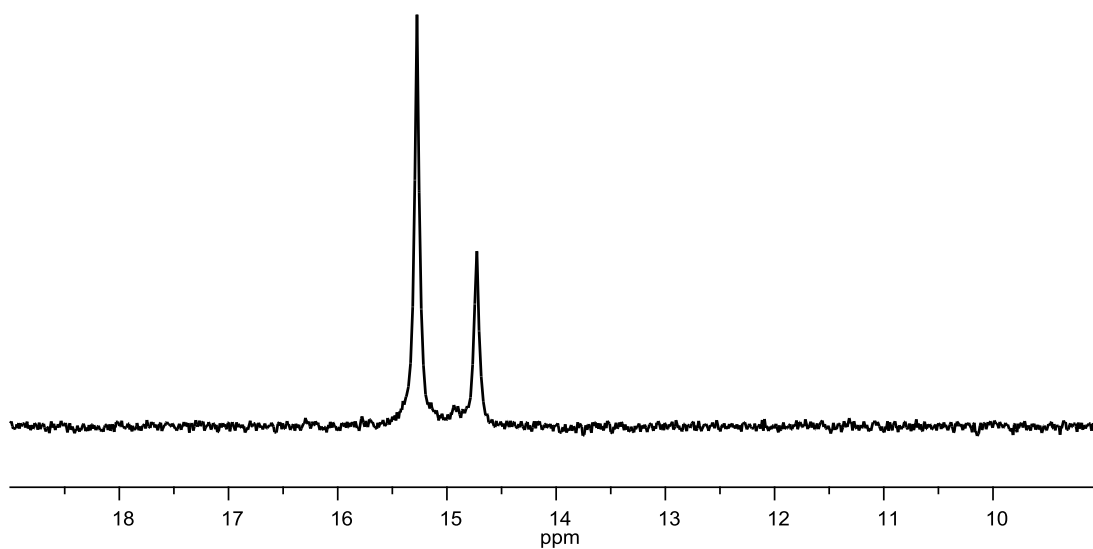
^{31}P -RMN (400 MHz, CDCl_3)

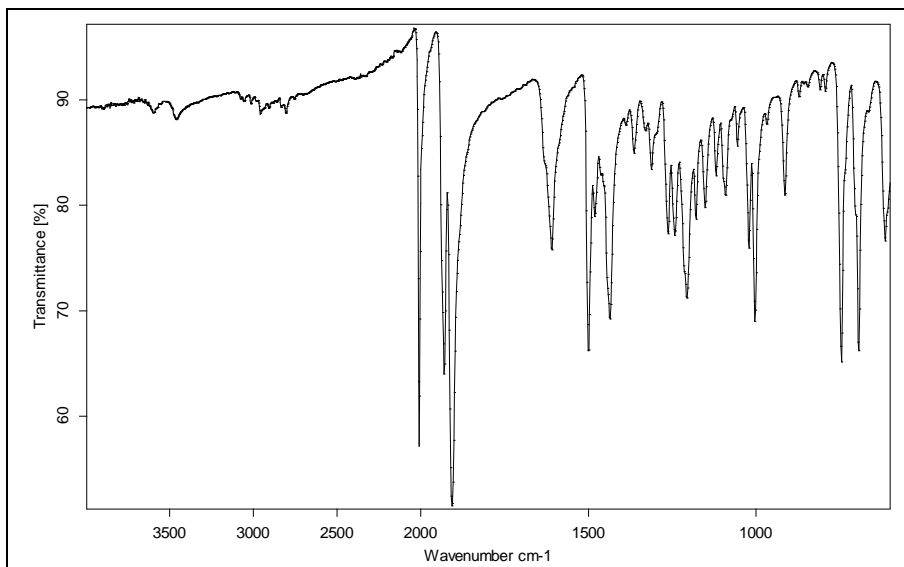


IR (ATR)

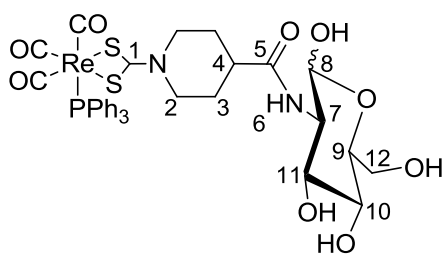


¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)

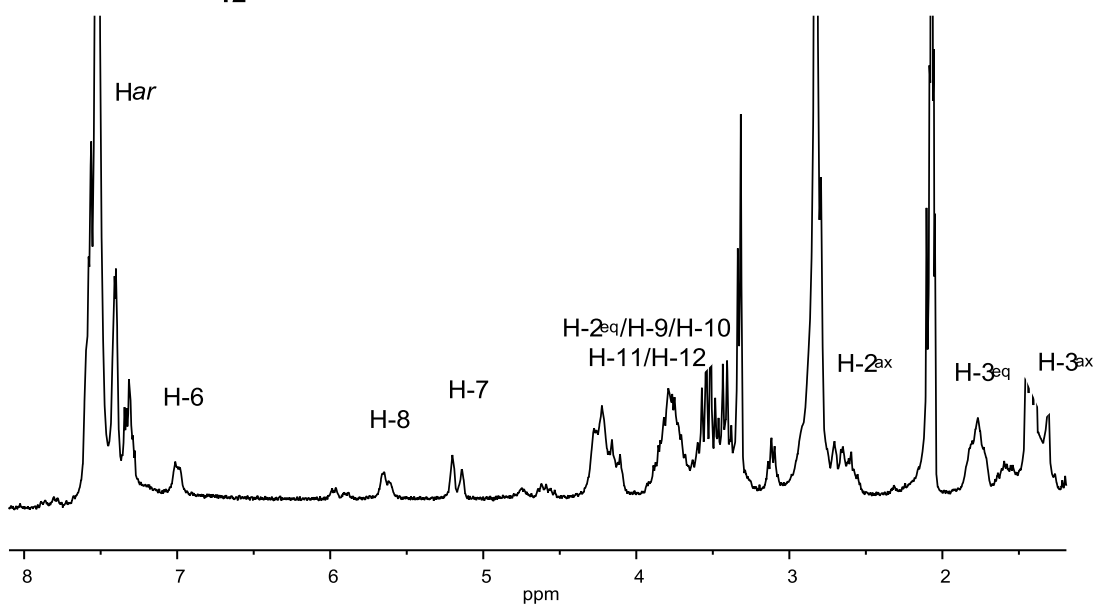
 ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) ^{31}P -RMN (400 MHz, CDCl_3)



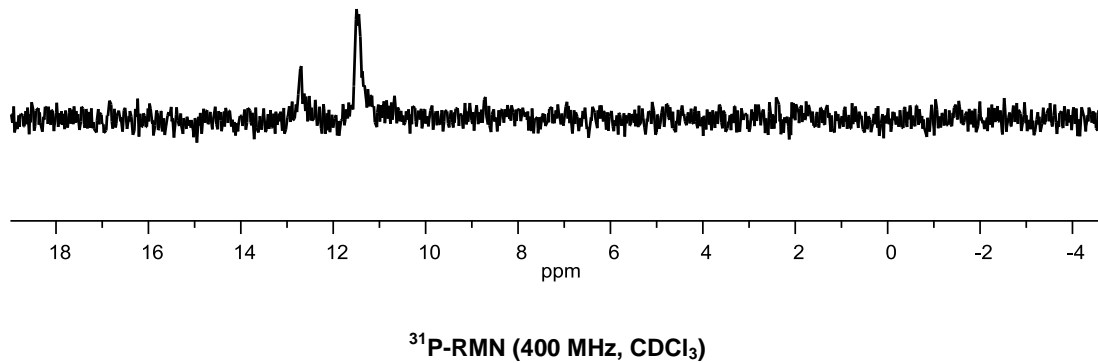
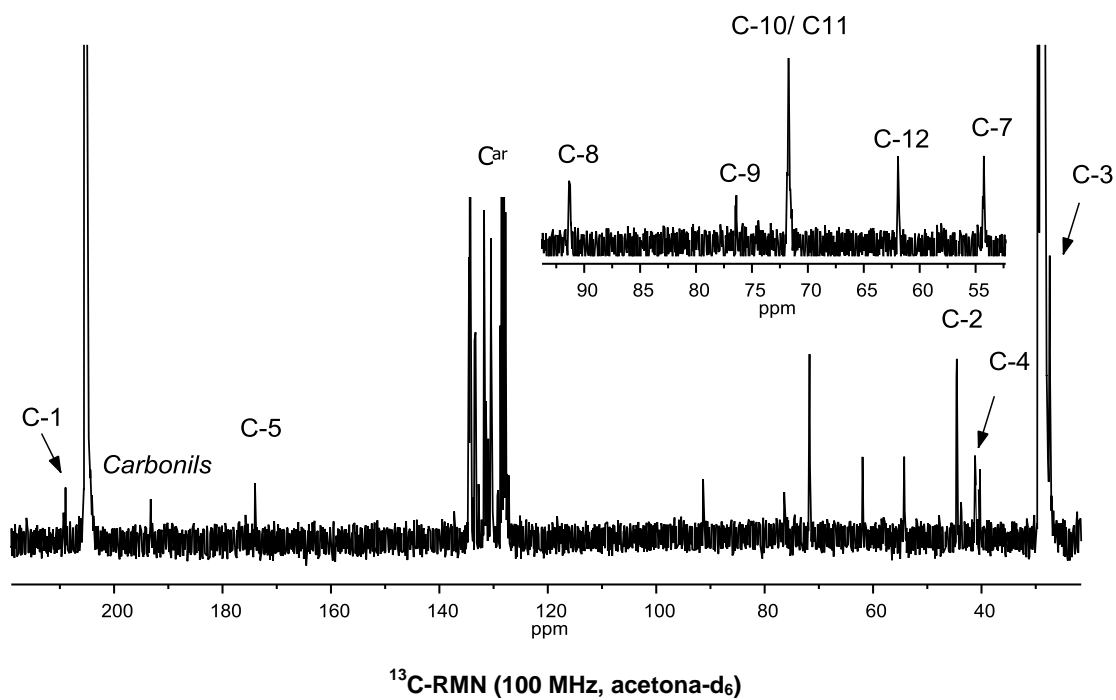
IR (ATR)

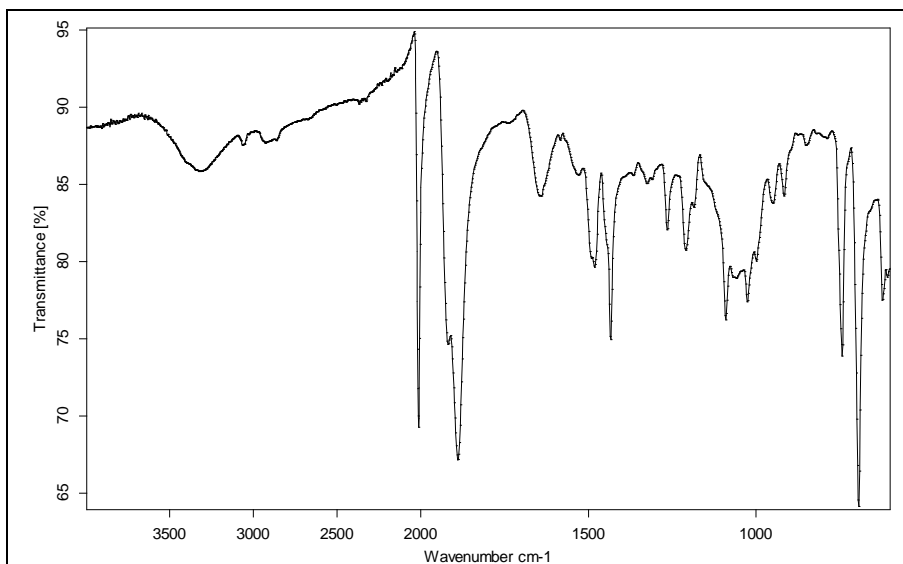


12



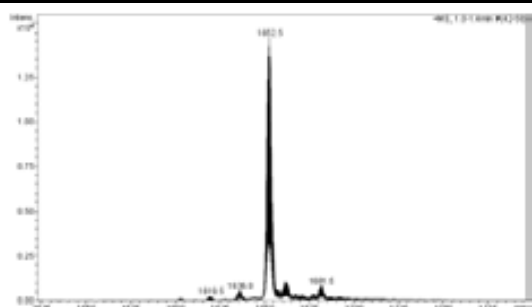
¹H-RMN (400 MHz, acetona-d₆)



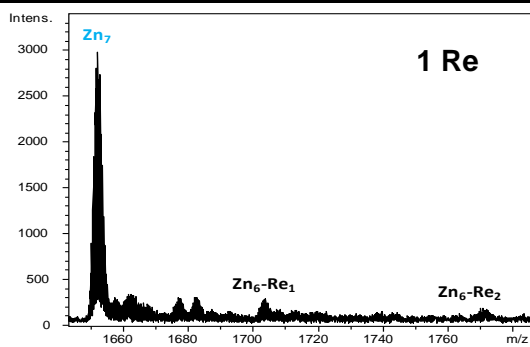


IR (ATR)

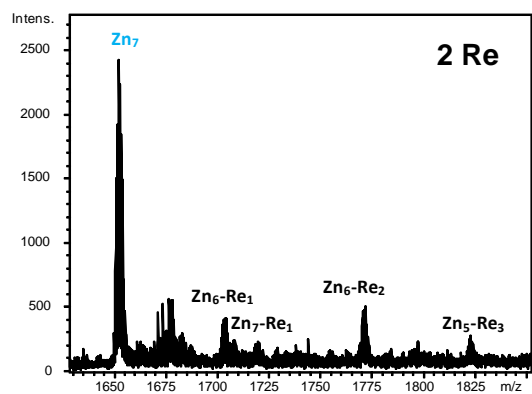
Valoració MT1 amb $fac\{-Re(CO)_3\}$



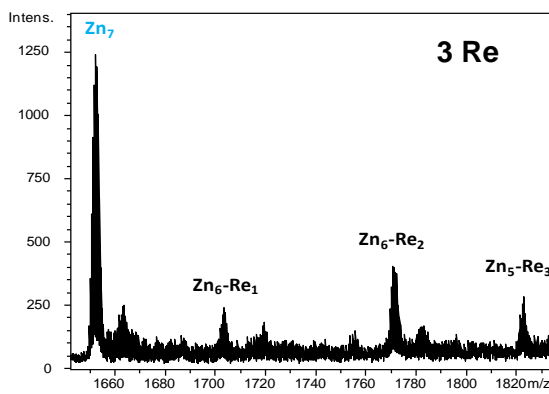
MT1 inicial



1 Re

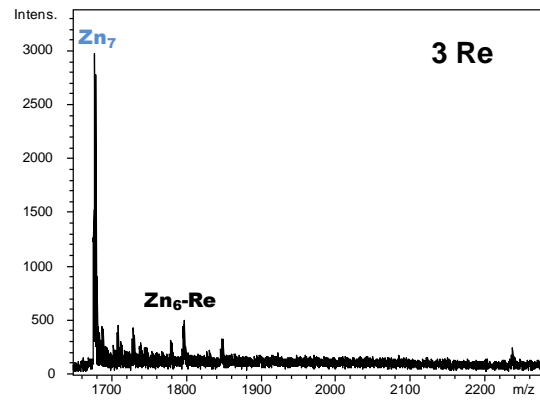
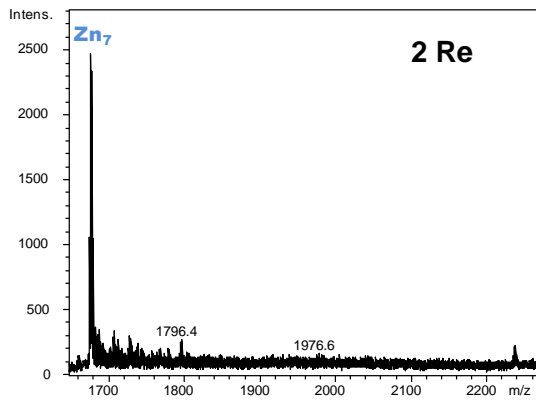
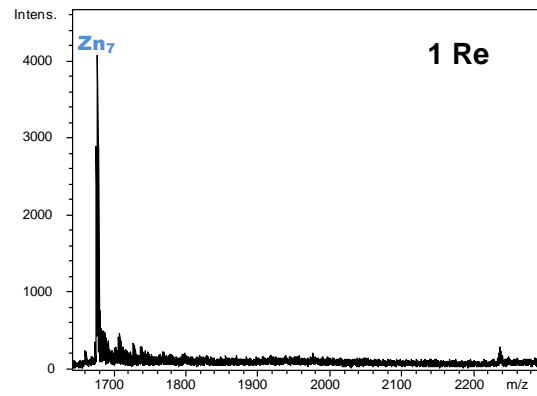
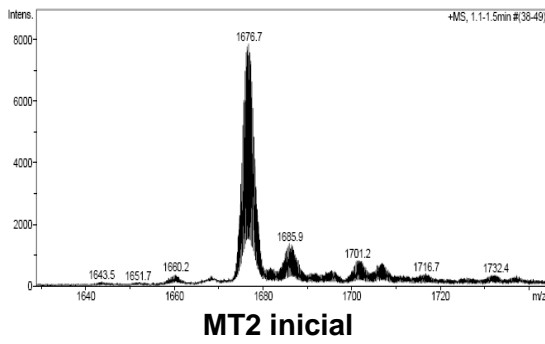


2 Re

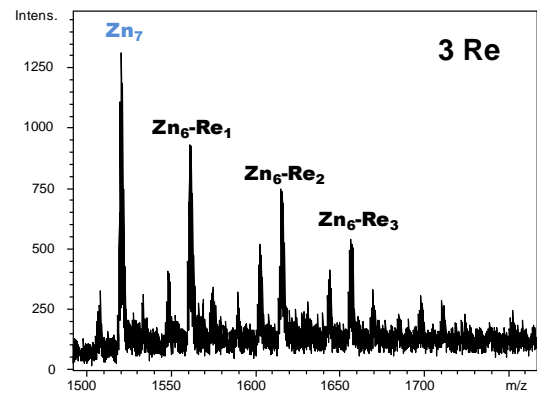
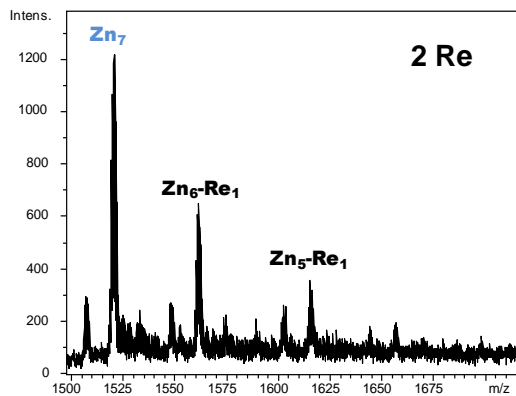
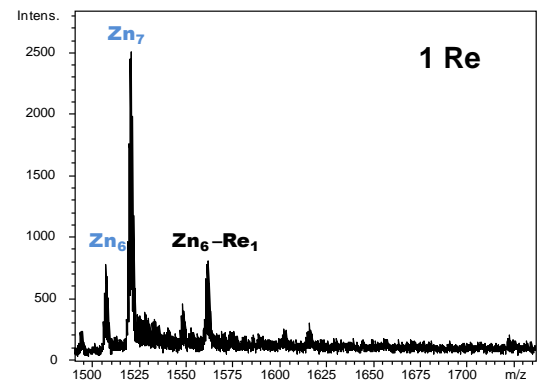
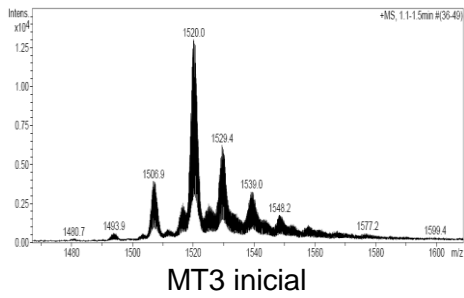


3 Re

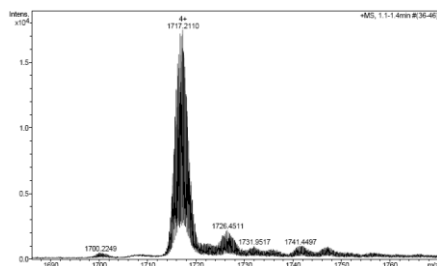
Valoració MT2 amb $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$



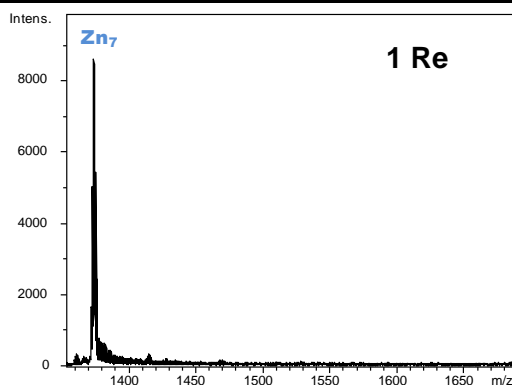
Valoració MT3 amb $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$



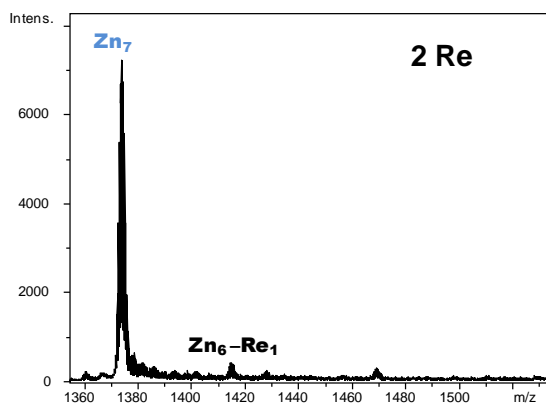
Valoració MT4 amb $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$



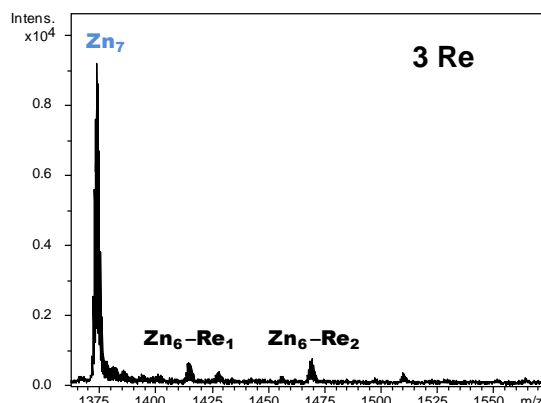
MT4 inicial



1 Re

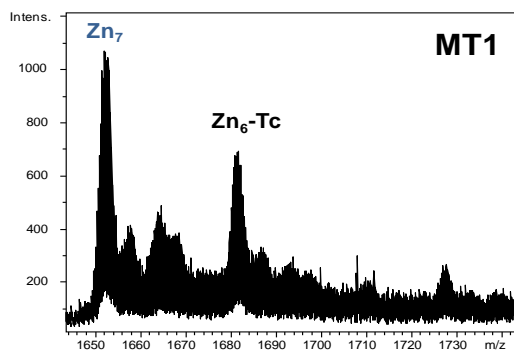


2 Re

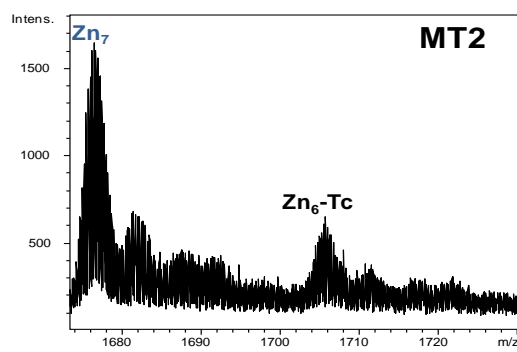


3 Re

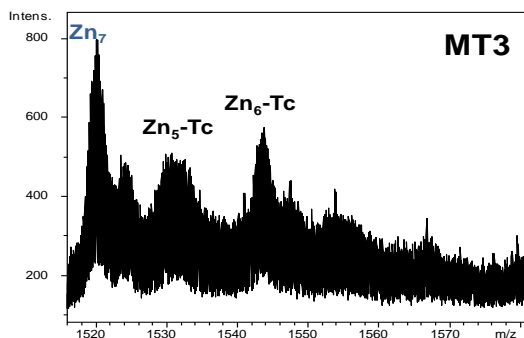
Valoració MTs amb $fac\text{-}\{^{99}\text{Tc}(\text{CO})_3\}$



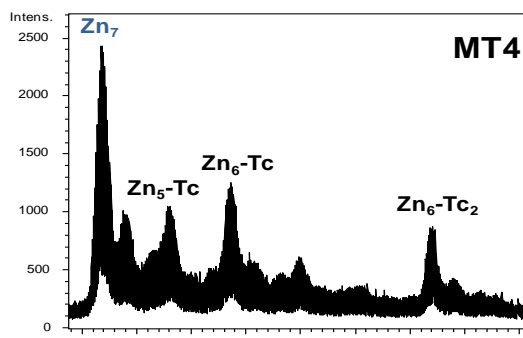
MT1



MT2



MT3



MT4

DADES CRISTAL-LOGRÀFIQUES

Distàncies d'enllaç (Å) i angles (graus) seleccionat pel complex **3**, **4** i **10**:

Complex	M-S		S-M-S		M-X		X-M-X	
3	Zn-S11	2.4780(5)	S11-Zn-S12	75.29(2)				
	Zn-S12	2.3457(6)	S11-Zn-S21	109.53(2)				
	Zn-S21	2.3433(5)	S11-Zn-S22	164.69(2)				
	Zn-S22	2.8162(5)	S11-Zn-S22 ⁱ	108.85(2)				
	Zn-S22 ⁱ	2.3972(5)	S12-Zn-S21	131.47(2)				
			S12-Zn-S22	93.83(2)				
			S12-Zn-S22 ⁱ	118.49(2)				
			S21-Zn-S22	69.49(2)				
			S21-Zn-S22 ⁱ	105.71(2)				
		S22-Zn-S22 ⁱ	85.70(2)					
4	Zn-S11	2.413(2)	S11 Zn S12	75.93(8)				
	Zn-S12	2.364(3)	S11-Zn-S21	103.36(8)				
	Zn-S21	2.369(2)	S11-Zn-S22	157.73(9)				
	Zn-S22	2.753(2)	S11-Zn-S22 ⁱⁱ	112.54(9)				
	Zn-S22 ⁱⁱ	2.371(2)	S12-Zn-S21	135.22(9)				
			S12-Zn-S22	93.61(8)				
			S12-Zn-S22 ⁱⁱ	120.87(8)				
			S21-Zn-S22	70.11(7)				
			S21-Zn-S22 ⁱⁱ	101.09(9)				
		S22-Zn-S22 ⁱⁱ	89.72(8)					
10	Re1-S11	2.483(3)	S11-Re1-S12	70.18(8)	Re1-C11	1.87(2)	C11-Re1-C12	90.3(5)
	Re1-S12	2.518(3)			Re1-C12	1.90(2)	C11-Re1-C13	88.4(4)
					Re1-C13	1.91(2)	C12-Re1-C13	91.7(5)
					Re1-P1	2.499(2)	S11-Re1-C13	89.5(4)
							S12-Re1-C13	89.8(3)
							S11-Re1-P1	90.38(8)
							S12-Re1-P1	85.40(8)
							S11-Re1-C11	173.9(4)
							S12-Re1-C12	165.6(3)
							C13-Re1-P1	174.9(3)
	Re2-S21	2.499(3)	S21-Re2-S22	69.66(9)	Re2-C21	1.91(2)	C21-Re2-C22	90.0(5)
	Re2-S22	2.510(3)			Re2-C22	1.87(2)	C21-Re2-C23	89.9(5)
					Re2-C23	1.90(2)	C22-Re2-C23	92.9(5)
					Re2-P2	2.487(2)	S21-Re2-C23	88.3(4)
							S22-Re2-C23	91.7(4)
							S21-Re2-P2	91.27(8)
							S22-Re2-P2	82.82(9)
							S21-Re2-C21	173.8(3)
							S22-Re2-C22	164.8(3)
						C23-Re2-P2	174.3(4)	

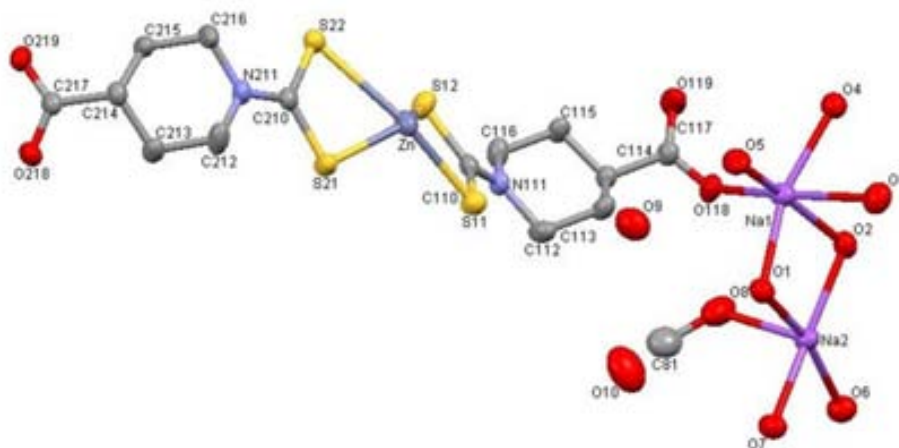
(i) = 1-x, 2-y, 1-z

(ii) = 1-x, 1-y, 1-z

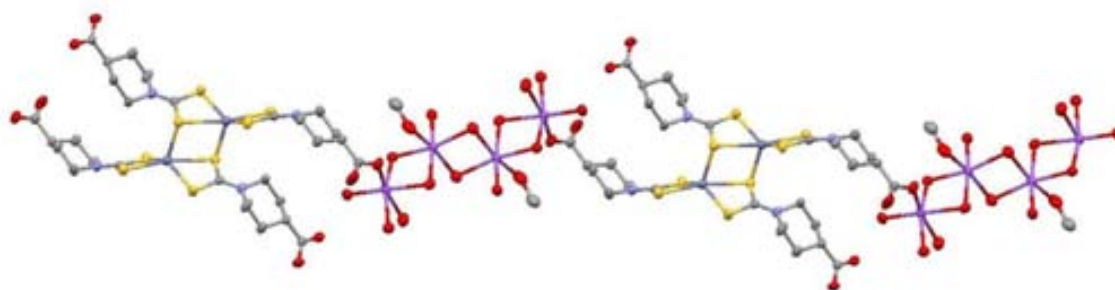
Dades cristal·logràfiques i paràmetres de refinament d'estructura pels complexos **3**, **4** i **10**;

	3	4	10
Empirical formula	C ₂₉ H ₇₆ N ₄ Na ₄ O ₂₇ S ₈ Zn ₂	C ₅₀ H ₆₁ N ₁₁ O ₁₆ S ₈ Zn ₂	C ₃₂ H ₃₂ N ₂ O ₆ PreS ₂
Formula weight	1392.12	1459.32	821.89
Temperature/K	296(2)	100(2)	294(2)
Wavelength/Å	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P -1	P 21/c	P 21/n
a/ Å	6.6256(3)	14.919(3)	21.3425(15)
b/ Å	11.4304(6)	11.373(3)	10.2797(7)
c/ Å	20.0706(10)	18.544(4)	31.001(2)
α/deg	95.927(1)	90	90
β/deg	94.450(1)	92.240(4)	100.394(2)
γ/deg	95.064(1)	90	90
V/Å ³	1500.21(13)	3144.0(12)	6689.8(8)
Z	1	2	8
$\rho_{\text{calc}} / \text{Mg/m}^3$	1.541	1.541	1.632
Absorption coefficient / mm ⁻¹	1.185	1.102	3.850
F(000)	726	1508	3264
Crystal size / mm	0.30 x 0.24 x 0.04	0.45 x 0.15 x 0.04	0.31 x 0.20 x 0.03
Theta range for data collection/deg	1.80 to 28.88	2.10 to 29.05	1.27 to 29.05
Index ranges	-6<=h<=8, -15<=k<=15, -23<=l<=25	-20<=h<=12, -14<=k<=15, -25<=l<=22	-26<=h<=28, -13<=k<=14, -42<=l<=23
Reflections collected	8215	16517	35951
Independent reflections	6948 [R(int) = 0.0134]	7603 [R(int) = 0.2095]	16380 [R(int) = 0.1356]
Completeness to theta = 25.00°	99.1 %	100.0 %	99.9 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	Semi-empirical from equivalents	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.9537 and 0.6857	0.9569 and 0.6204	0.8932 and 0.3815
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	6948 / 46 / 410	7603 / 12 / 389	16380 / 0 / 793
Goodness-of-fit on F ²	1.042	0.970	0.937
Final R indices [I>2σ(I)]	R(F) = 0.0321, R _w (F ²) = 0.0847	R(F) = 0.1037, R _w (F ²) = 0.1618	R(F) = 0.0730, R _w (F ²) = 0.0942
R indices (all data)	R(F) = 0.0382, R _w (F ²) = 0.0882	R(F) = 0.2548, R _w (F ²) = 0.2094	R(F) = 0.1906, R _w (F ²) = 0.1219
Extinction coefficient	0.0042(5)	0.0043(5)	--
Largest diff. peak and hole/ e.Å ⁻³	0.398 and -0.353	0.928 and -0.795	0.935 and -0.875

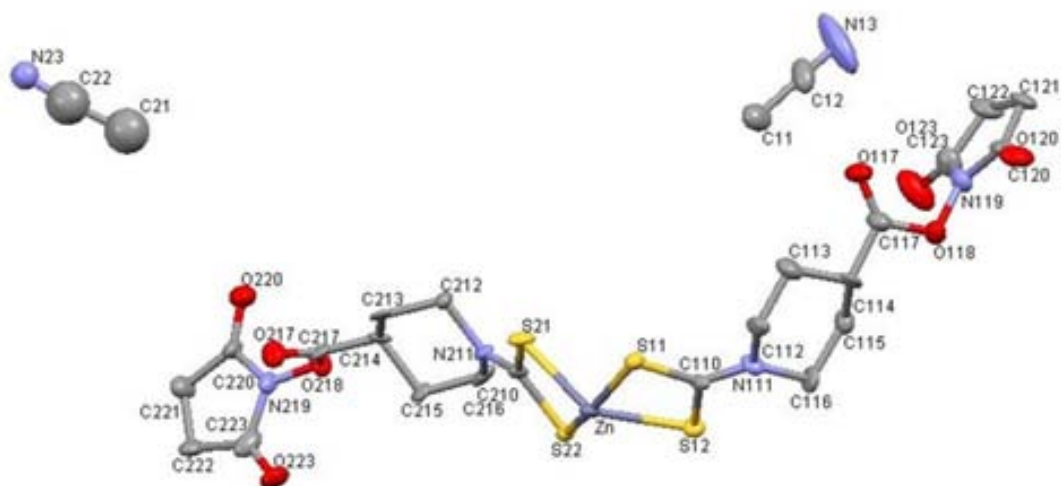
Gràfic *Ellipsoid plot* (50% probabilitat) de la unitat asimètrica del complex **3**, mostrant l'etiquetatge dels àtoms. El desordre MeOH/aigua està present en els llocs de coordinació. Per tant, $\text{sof}(\text{O8})=1$, $\text{sof}(\text{C81})=0.5$, and $\text{sof}(\text{O10})=0.5$.



Gràfic *Ellipsoid plot* (50% probabilitat) de la unitat asimètrica del complex **3**, mostrant coordinació octaèdrica en els àtoms de sodi. El complex dinuclear de zinc es troba unit per enllaços O...Na formant una xarxa tridimensional. En la figura, es representa dos dímers i dos ponts formats per sodi en coordinació octaèdrica (a moda d'exemple es mostra una visió parcial de l'infinita cadena). Els grups carboxilats, aparentment no coordinant en el dibuix, participen formant altres ponts donant una xarxa tridimensional.



Gràfic *Ellipsoid plot* (50% probabilitat) de la unitat asimètrica del complex **4**, mostrant l'etiquetatge dels àtoms. Una molècula d'acetonitril C21-C22-N23 és desordenada sobre un centre d'inversió i s'ha perfeccionat mitjançant factors isotròpics de desplaçament.



Gràfic *Ellipsoid plot* (50% probabilitat) de la unitat asimètrica del complex **10**, mostrant l'etiquetatge dels àtoms.

