

### Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

I tumori al cervello rappresentano circa l'1.4% dei tumori. Il tempo di sopravvivenza medio dei pazienti affetti da questo tipo di tumori dipende marcatamente dal sotto-tipo istologico del tumore. Infatti, i meningiomi, che rappresentano circa il 32% dei tumori al cervello, sono per la gran parte (96%) non-maligni e quindi trattabili tramite chirurgia e/o convenzionale radioterapia. Al contrario, il **glioblastoma multiforme** (GBM), il più comune tumore del cervello, è un tumore molto aggressivo, finora risultato resistente a qualsiasi tipo di trattamento. La sopravvivenza media al GBM, trattato con chirurgia e/o radiazione convenzionale, è inferiore a 12 mesi. Essendo dei tumori con alto grado di infiltrazione nel tessuto, la loro rimozione chirurgica raramente riesce ad essere completa. D'altra parte, l'abbinamento di alte dosi di radiazioni porta tipicamente a danni neurologici.

In questo campo la BNCT sta dando risultati incoraggianti. La BNCT è una cosiddetta **terapia binaria**, che richiede cioè la combinazione di due componenti che, presi singolarmente, non sono efficaci e neppure tossici (in questo senso, la PDT è una terapia ternaria, in quanto richiede la combinazione di luce, foto-sensibilizzatore e ossigeno).

I due componenti chiave della BNCT sono i nuclei di  $^{10}\text{B}$  e neutroni aventi un'energia cinetica di circa 0.025 eV, che vengono comunemente definiti **neutroni termici**. Il nucleo di  $^{10}\text{B}$  è un nuclide non radioattivo (rappresenta circa il 20% del boro) e possiede una **sezione d'urto** per neutroni termici (*cross section*) molto elevata, diversi ordini di grandezza più grande di quella di altri nuclidi comuni nella materia vivente come  $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ , e  $^{16}\text{O}$ . Questa è una proprietà molto importante poiché garantisce che reazioni nucleari indesiderate conseguenti alla cattura di neutroni da parte dei nuclidi endogeni, che sono molto più abbondanti nei tessuti rispetto al  $^{10}\text{B}$ , saranno minimizzate. La tabella riporta la sezione d'urto per i neutroni termici per una serie selezionata di nuclidi.

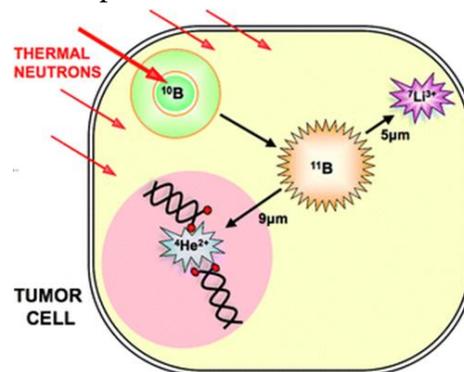
Nuclide	Sezione d'urto (barns)	Abb. Nat. (%)
$^1\text{H}$	$3.3 \times 10^{-1}$	99.8
$^6\text{Li}$	$9.4 \times 10^2$	7.5
$^{10}\text{B}$	$3.8 \times 10^3$	19.8
$^{12}\text{C}$	$3.4 \times 10^{-3}$	98.9
$^{14}\text{N}$	1.8	99.6
$^{16}\text{O}$	$1.8 \times 10^{-4}$	99.8
$^{126}\text{I}$	$6.0 \times 10^3$	—*
$^{135}\text{Xe}$	$2.6 \times 10^6$	—*
$^{157}\text{Gd}$	$2.6 \times 10^5$	15.7

I neutroni termici possiedono energie cinetiche troppo basse per causare qualsiasi danno significativo ai tessuti, ma la loro capacità di penetrazione è molto limitata. I neutroni cosiddetti **epitermici**, cioè con energie cinetiche fra 0.5 e 1000 eV sono più penetranti (fino a 6 – 8 cm dalla superficie) e normalmente vengono usati in clinica per trattare in modo non-invasivo tumori profondi. Le numerose collisioni che i neutroni epitermici hanno con gli atomi H nei tessuti li rallentano al rango di neutroni termici; questa conversione dei neutroni da epitermici a termici è in realtà essenziale affinché la reazione di cattura dei neutroni proceda in modo efficace.

La cattura del neutrone termico trasforma il nucleo di  $^{10}\text{B}$  in  $^{11}\text{B}^*$  (uno stato nucleare eccitato), il quale ha un tempo di vita molto breve e decade generando due particelle ad alta energia (la reazione rilascia 2.31 MeV), il nucleo di  $^7\text{Li}$  e una particella  $\alpha$  ( $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ , figura), oltre a raggi  $\gamma$ . Tali particelle, a causa della loro elevatissima **energia lineare** (sono definite *high linear energy transfer (LET) particles*), sono in grado di distruggere i componenti cellulari (figura). Avendo cammini liberi molto corti, < 10  $\mu\text{m}$  (si valuta fra 5 e 9  $\mu\text{m}$ ), il loro effetto citotossico è sostanzialmente confinato nella cellula in cui si trovava il nucleo di  $^{10}\text{B}$ .

Ovviamente bisogna introdurre nelle cellule tumorali dei

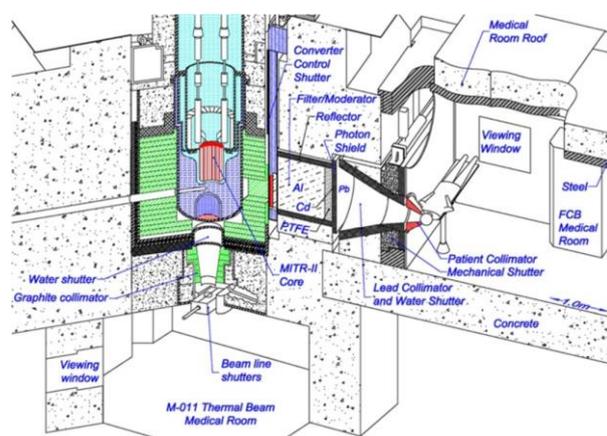
La cattura del neutrone termico trasforma il



composti contenenti boro in quantità sufficiente. Il vantaggio di una terapia binaria è che, se si riesce a localizzare con precisione uno dei due componenti, l'altro può essere somministrato in modo più diffuso: comunque risponderanno solo (o prevalentemente) le cellule dove si è accumulato il primo componente. Questo meccanismo permette, in linea di principio, di apportare il danno selettivamente al tessuto malato risparmiando quello sano circostante. Addirittura, consentirebbe anche di distruggere cellule tumorali di cui non si conosce l'esistenza o la posizione, e quindi non asportabili per via chirurgica. Rispetto alla radio-immunoterapia (vedi dopo), in questo caso non vengono somministrati nuclei radioattivi che emettono particelle  $\alpha$  o  $\beta$ , ma le particelle  $\alpha$  vengono generate *in situ*, in linea di principio prevalentemente nelle cellule tumorali. Il GBM è stato scelto come bersaglio principale di questa terapia sperimentale per le sue caratteristiche: è un tumore che metastatizza poco, ma infiltra molto il tessuto cerebrale, quindi sembra particolarmente adatto alla NCT. Inoltre non vi sono trattamenti efficaci, per cui un qualsiasi miglioramento indotto dalla NCT sarebbe evidente.

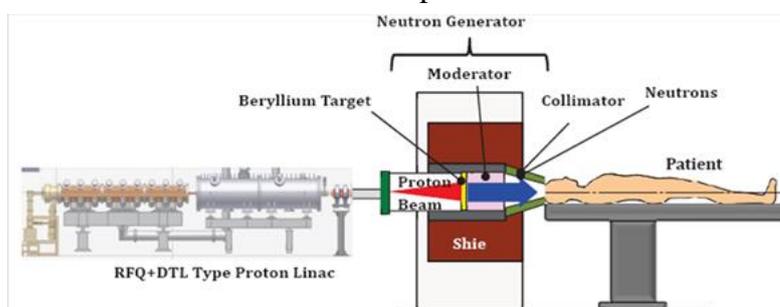
Dal punto di vista chimico, il boro forma legami stabili con C, N e O e quindi può essere incorporato all'interno di opportune molecole per BNCT. Gli agenti BNCT devono soddisfare un certo numero di **criteri** per massimizzare il danno alle cellule tumorali e minimizzare al contempo quello alle cellule sane: 1) il composto deve consentire di raggiungere una concentrazione di boro sufficientemente elevata nel tumore (ca. 20 – 35  $\mu\text{g}$  di  $^{10}\text{B}$  per grammo di tumore, cioè  $10^9$  atomi/cellula) per massimizzare la probabilità che avvenga una reazione di cattura di neutrone e anche per minimizzare la radiazione di fondo che deriva dalla comunque inevitabile cattura dei neutroni termici da parte dei nuclei endogeni. In queste concentrazioni ca. l'85% della dose di radiazione ionizzante deriverebbe dalla cattura dei neutroni da parte del  $^{10}\text{B}$  (il resto viene originata dalla cattura di neutroni da parte degli altri nuclei presenti, in particolare H e N, e quindi è indiscriminata). Concentrazioni cellulari di boro inferiori sono accettabili quando però il  $^{10}\text{B}$  sia localizzato vicino a componenti cellulari chiave come il DNA. 2) L'agente deve permanere all'interno della cellula per un tempo sufficiente da permettere l'irraggiamento del tumore con i neutroni termici. 3) L'agente dovrebbe essere sufficientemente selettivo da raggiungere un rapporto di concentrazione fra tumore e tessuto sano  $> 1:1$ , possibilmente 3 5 : 1, e dovrebbe anche essere eliminato rapidamente dal sangue in modo che il rapporto tumore/sangue sia  $> 1:1$  (questo garantisce che il danno ai vasi sanguigni intorno al tumore sia limitato). 4) Per i tumori del sistema nervoso centrale l'agente deve essere sufficientemente lipofilo da riuscire ad attraversare la barriera ematoencefalica (BBB), sebbene nei pazienti affetti da GBM questa sia spesso compromessa dal tumore stesso nelle sue vicinanze. Inoltre ci deve essere un bilanciamento fra lipofilità e idrofilicità: se l'agente  $^{10}\text{B}$  è troppo idrofilo non riuscirà ad attraversare la BBB, ma se è troppo lipofilo il composto si legherà in modo non specifico a proteine o rimarrà intrappolato nelle membrane cellulari. 5) La tossicità generale deve essere sufficientemente bassa in modo da permettere che il trattamento sia tollerato.

La generazione di neutroni epitermici è ovviamente una parte essenziale della terapia e vi pone dei seri limiti, anche di costo. La tipica sorgente di neutroni è un reattore nucleare (cioè i neutroni derivano da una reazione di fissione nucleare) e alcuni sono stati progettati e costruiti appositamente per questo tipo di utilizzo. Attualmente, il reattore più evoluto per questo tipo di utilizzo si trova all'MIT (figura) ed è in grado di generare un flusso di neutroni epitermici molto intenso, tanto che la dose terapeutica viene somministrata in soli 10–15 minuti. Questo implica che la terapia non avviene in ambito ospedaliero, e ciò pone dei seri limiti di praticità. Recentemente sono state sviluppate delle nuove tecnologie basate sull'uso di acceleratori lineari di

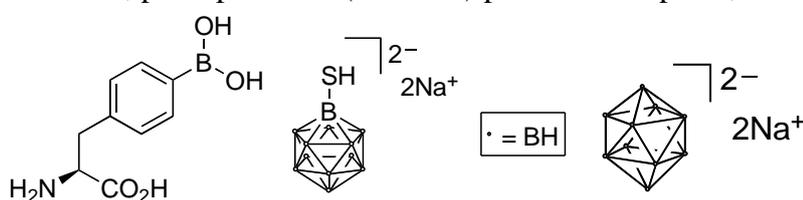


particelle cariche, come quello mostrato schematicamente in figura, che potrebbero venire utilizzati in futuro come sorgenti di neutroni per NCT ed essere inseriti in un contesto ospedaliero, date le dimensioni ridotte e la ridotta pericolosità rispetto ai reattori a fissione. Il limite attuale di questi generatori è che producono dei flussi di neutroni di bassa intensità rispetto ai reattori nucleari. Un grosso problema è quello di determinare e standardizzare la dose di radiazione.

Soltanto due agenti contenenti  $^{10}\text{B}$  sono stati finora impiegati in studi clinici di BNCT: l'analogo boronato della L-fenilalanina, L-4-diidrossiboril-fenilalanina (**BPA**, figura) e il borano a geometria



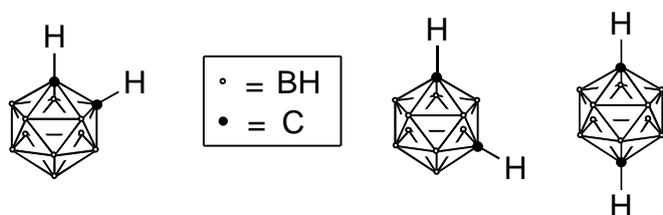
poliedrica sodio mercaptoundecaidrododecaborato( $2^-$ ) (**BSH**, figura). Un terzo agente,  $\text{Na}_2[\text{B}_{10}\text{H}_{10}]$  (GB-10, figura), è stato usato per uno studio clinico nel secolo scorso negli USA che si rivelò un fallimento, principalmente (si ritiene) perché il composto, sebbene si localizzi preferenzialmente nel



tumore rispetto al cervello sano, rimane comunque abbondante nel sangue e il flusso di neutroni generava un danno eccessivo alla vascolatura cerebrale. Da notare che questi cluster boro-idruri sono

notevolmente stabili dal punto di vista chimico e anche rispetto all'idrolisi. Sebbene BPA e BSH siano studiati da molti anni come agenti BNCT, il meccanismo tramite il quale si accumulano selettivamente nei tumori non è ancora ben noto. Si ritiene che BPA entri nelle cellule sfruttando il processo di trasporto degli aminoacidi. Il suo *uptake* in vivo è più veloce nei tumori GBM che nel tessuto sano. BSH non è in grado di attraversare la BBB o le membrane cellulari, ma sembra che raggiunga i tumori GBM sfruttando le rotture nella BBB che essi causano. La selettività di BSH è attribuita alla formazione di ponti disolfuro con tioli delle proteine. Allo stato attuale, BPA e BSH vengono usati sia separatamente che in combinazione nel trattamento del GBM, del melanoma maligno e di numerosi altri tipi di tumori. In genere BSH viene somministrato 12 ore prima dell'irraggiamento con neutroni e BPA un'ora prima. Bisogna sottolineare che né BPA né BSH soddisfano pienamente i criteri esposti sopra per un agente BNCT ottimale, in particolare per quanto riguarda la selettività verso il tessuto tumorale.

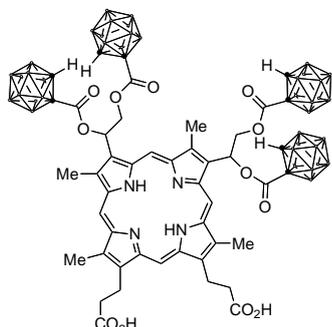
Sono stati sintetizzati e studiati in vitro molti nuovi agenti potenzialmente utilizzabili in BNCT. Per portare un elevato numero di atomi di  $^{10}\text{B}$  nella molecola sono molto sfruttati i cluster noti come *closo*-carborani, come quello di BSH, dei poliedri di formula  $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}$  che occupano circa il volume generato dalla rotazione di un anello fenilico e possono esistere in tre isomeri, a seconda delle posizioni relative dei due atomi di carbonio. È possibile rimuovere selettivamente un singolo



atomo di boro generando delle specie anioniche dette *nido*-carborani. Mentre i *closo*-carborani neutri sono idrofobici, i *nido*-carborani anionici sono ben solubili in acqua. La chimica di queste specie è molto ben sviluppata e ne permette la derivatizzazione. Oltre a numerose piccole molecole contenenti

boro, sono stati investigati molti derivati con composti di boro coniugati a una serie di *targeting vectors*, con strategie simili a quelle già viste in altri casi, allo scopo di migliorare il *targeting* delle cellule tumorali. Come *targeting vectors* sono stati utilizzati peptidi lineari e ciclici (in particolare quelli con elevata affinità per recettori sovra-espressi nelle cellule tumorali, e.g. il recettore della somatostatina, il *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR), e l'*epidermal growth factor*

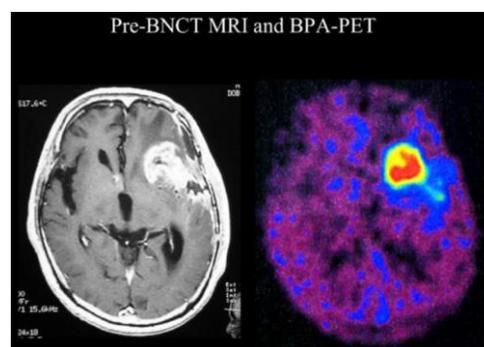
*receptor* (EGFR)), proteine, anticorpi, zuccheri, porfirine naturali e sintetiche, alchilanti del DNA, intercalanti, liposomi e nanoparticelle. Senza entrare in dettagli, essendo esempi ancora lontani da qualsiasi applicazione (o anche investigazione) clinica, ricordiamo complessi di Pt(II) tipo cisplatino funzionalizzati con carborani, per sfruttare la coordinazione del Pt al DNA, porfirine variamente funzionalizzate con carborani in posizioni periferiche (un esempio è riportato in figura)



per sfruttare l'*uptake* preferenziale delle porfirine nei tumori ed eventualmente combinare BNCT con PDT.

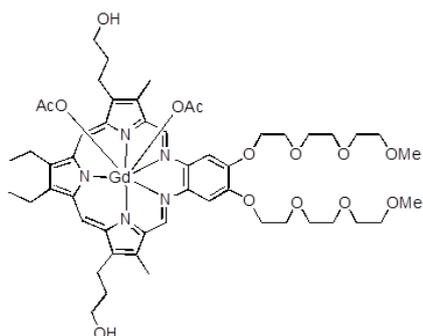
Un grosso problema nella BNCT è quello di determinare la biodistribuzione e l'*uptake* nel tumore del  $^{10}\text{B}$  in vivo, senza dover ricorrere a biopsie. È evidente che il dosaggio ottimale dell'agente BNCT e il tempo che deve intercorrere tra la sua somministrazione e l'irraggiamento con il flusso di neutroni nonché la sua durata dipendono sulla determinazione accurata dei livelli di boro in vivo. Attualmente nella BNCT si usano dei protocolli che determinano il livello di boro nel sangue tramite analisi ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) o ICP-AES (*Atomic Emission Spectroscopy*), ma questa non è ovviamente una

misura diretta della concentrazione del boro nel tumore. La stragrande maggioranza degli studi per arrivare all'*imaging* degli agenti boronati in vivo riguardano tecniche di *radio-labeling*, cioè l'incorporazione di radionuclide (sia negli agenti BNCT esistenti che nuovi) adatto per SPECT (e.g.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) o PET (e.g.  $^{18}\text{F}$ ). Ad esempio, usando  $^{18}\text{F}$ -BPA si è potuto confermare, tramite PET, l'accumulo preferenziale dell'agente nel GBM *in vivo*, già osservato tramite analisi diretta del boro in tessuto derivante da biopsie (figura, a sinistra l'immagine MRI, a destra quella PET).



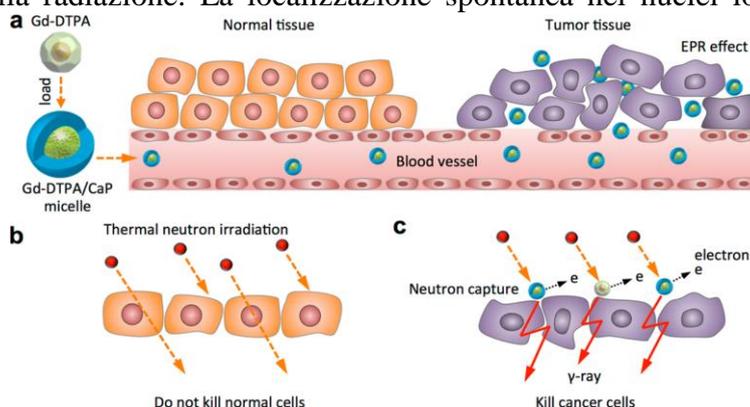
### Gadolinium Neutron Capture Therapy (GdNCT)

Il  $^{10}\text{B}$  non è l'unico nuclide ad avere un'elevata sezione d'urto per i neutroni termici. Il nuclide non radioattivo  $^{157}\text{Gd}$  (vedi tabella) è quello che possiede la più grande sezione d'urto per neutroni fra tutti gli elementi. Sulla base di questo solo parametro, l'utilizzo di  $^{157}\text{Gd}$  al posto di  $^{10}\text{B}$  dovrebbe portare ad un aumento di 66 volte del numero di eventi positivi per cellula (a parità di concentrazione dei nuclidi). Inoltre il Gd ha il vantaggio di poter essere utilizzato per l'*imaging* MRI, quindi – nell'ipotesi che un agente di Gd si accumuli selettivamente nel tumore – potrebbe consentire di visualizzare il tumore e di poter effettuare una NCT "guidata". La cattura di neutroni termici da parte del gadolinio porta però a una diversa reazione nucleare rispetto al boro: si forma il nucleo eccitato  $^{158}\text{Gd}^*$  che emette raggi X e raggi  $\gamma$  ad alta energia (ca. 7.9 MeV) e decade all'isotopo stabile  $^{158}\text{Gd}$ . Tuttavia, in un processo secondario percentualmente molto minore, il nucleo eccitato  $^{158}\text{Gd}^*$  reagisce con gli elettroni di core dell'atomo, portando all'emissione di elettroni ad elevata energia, i cosiddetti **elettroni Auger e Coster-Kronig (ACK)**. Per ogni evento di cattura di neutrone si generano circa cinque elettroni ACK, ma il loro percorso medio, a causa della loro bassa energia, è soltanto di pochi nanometri. Di conseguenza, se si vuole sfruttare efficacemente la reazione di cattura del neutrone il  $^{157}\text{Gd}$  deve essere localizzato molto vicino a componenti cellulari critici della cellula tumorale, in particolare al DNA. Se si riuscisse a superare questa evidente difficoltà, si avrebbe il vantaggio che il danno sarebbe estremamente focalizzato. Viceversa, i raggi  $\gamma$  emessi hanno energia molto elevata e sono in grado di danneggiare cellule anche relativamente lontane (cammino medio più di 100  $\mu\text{m}$ ); tuttavia la loro LET (*Linear Energy Transfer*) è minore e così pure il loro impatto distruttivo a livello biologico. Nell'ipotesi di riuscire a collocare il  $^{157}\text{Gd}$  nel nucleo della cellula, l'elettrone ACK emesso interagisce rapidamente con una molecola d'acqua, producendo un radicale idrossile, molto reattivo, che a sua volta propaga a distanza molto ravvicinata il danno ossidativo, portando a rotture nella doppia elica del DNA. Al

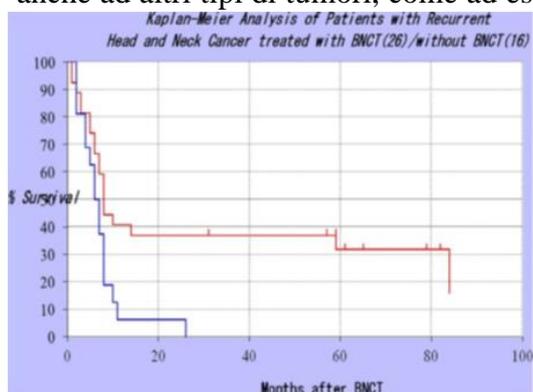
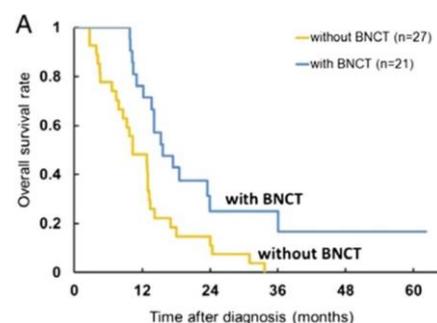


momento i composti di Gd in grado di localizzarsi nel nucleo delle cellule sono molto pochi, e nessuno in concentrazione sufficiente per permettere studi di terapia GdNCT. Un esempio è Gd-texaphyrin (figura), analogo del composto Lu-texaphyrin già incontrato nella terapia fotodinamica. Gd-texaphyrin, come molte porfirine, ha una buona selettività per il nucleo delle cellule tumorali e, oltre a essere tracciabile tramite MRI, è stato anche studiato come possibile radiosensibilizzatore in combinazione con la normale radioterapia. Il meccanismo proposto per la radiosensibilizzazione prevede che il composto

sia in grado di catturare gli elettroni solvatati generati dalla radiazione ionizzante, generando in situ ROS e quindi amplificando l'effetto della radiazione. La localizzazione spontanea nei nuclei lo renderebbe in linea di principio adatto per GdNCT ma, come già sottolineato, la concentrazione di Gd nei nuclei non è sufficientemente elevata. Esempi più recenti hanno puntato ad accumulare nuclei di Gd, ad esempio incorporando il classico agente MRI Gd-DTPA in micelle; queste si dovrebbero accumulare nel tessuto tumorale sfruttando l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) permettendo di visualizzarlo via MRI e di effettuare la terapia NCT (figura).



In conclusione, non è ancora chiaro – sebbene siano passati più di 50 anni dai primi studi clinici – se la BNCT si stabilirà come una terapia di prima linea per il trattamento dei GBM (o di altri tumori localizzati). In pratica, fino a qualche anno fa i risultati di tutti gli studi di Fase I (tossicità) e di Fase II (efficacia) non avevano ancora mostrato alcun vantaggio della BNCT tale da giustificare studi di Fase III (terapia BNCT a confronto con la migliore terapia disponibile). Al momento la BNCT sembra essere usata come terapia di prima linea, in combinazione con chemioterapia e radioterapia convenzionale, solo in Giappone dove sono stati ottenuti dei risultati incoraggianti (figura, seppure mai risolutivi per il GBM). Gli studi clinici sperimentali sono stati estesi anche ad altri tumori della testa e del collo, su pazienti già trattati senza successo con le terapie convenzionali, con risultati in certi casi molto incoraggianti, come mostra la figura successiva. È possibile che in futuro vengano estesi anche ad altri tipi di tumori, come ad esempio i melanomi, che hanno attualmente prognosi infauste e trattamenti inefficaci. Naturalmente, la generazione dei neutroni pone dei limiti pratici ed economici, ma soprattutto i due composti boronati utilizzati nella terapia, BPA e BSH, non sembrano essere all'altezza. È necessario sviluppare nuovi agenti boronati che devono avere una selettività maggiore per il tessuto tumorale e riuscire ad accumulare quantità maggiori di boro nelle cellule tumorali (come già detto, almeno 20–35  $\mu\text{g/g}$ , cioè  $10^9$  atomi/cellula), oltre a rispettare gli altri criteri elencati prima, in modo da rendere il trattamento più efficace.



### Chemoradiotherapy of Glioblastoma

