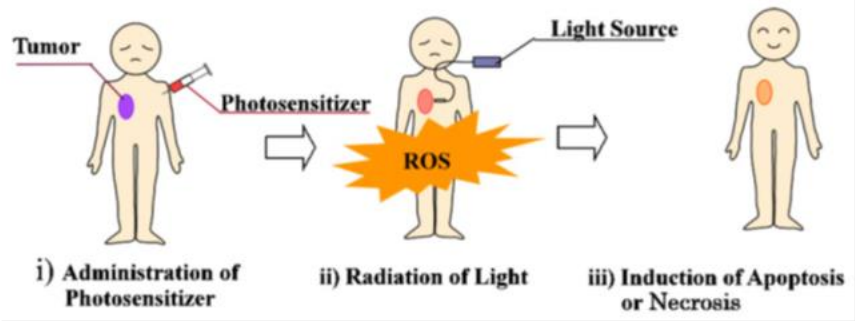
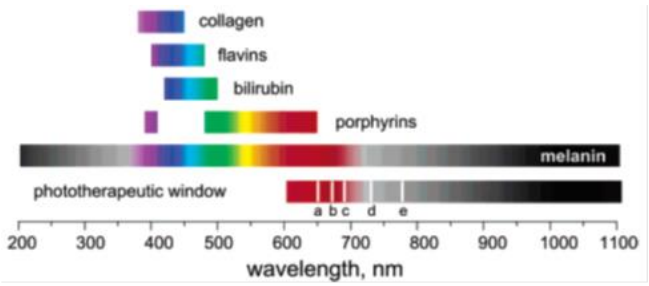
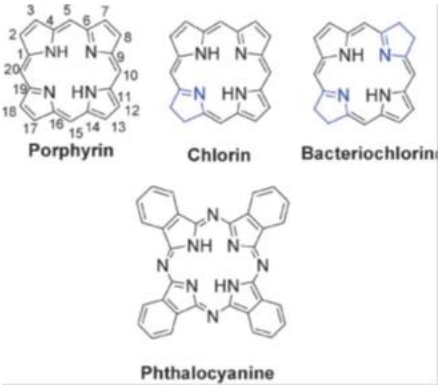
Terapia fotodinamica (*Photo-Dynamic Therapy*, PDT)

La terapia fotodinamica (PDT) è un terapia usata (fino dagli anni 1990) per il trattamento dei tessuti tumorali, in particolare per quei tipi di cancro che consentono l'irraggiamento luminoso (anche tramite fibre ottiche o endoscopi), come i tumori della pelle, ma anche tumori ai polmoni, alla vescica, alla prostata e all'apparato urinario, all'esofago e quelli oftalmologici, purché siano localizzati e non penetrino troppo in profondità nel tessuto. La PDT utilizza dei foto-sensibilizzatori (PS), cioè delle molecole in grado di assorbire la luce visibile in un intervallo opportuno per indurre la generazione di ROS (*Reactive Oxygen Species*) e quindi citotossicità e morte delle cellule cancerogene per apoptosi o necrosi (figura). Oltre a uccidere direttamente le cellule, la PDT può anche danneggiare i vasi sanguigni nel tumore, inducendo il cosiddetto *vascular shutdown*, impedendo così al cancro di ricevere i nutrienti necessari per la sua crescita. Rispetto ai convenzionali trattamenti anticancro (chemioterapia), la PDT ha il vantaggio di possedere un preciso **controllo spazio-temporale del trattamento**, che può anche essere ripetuto: il foto-sensibilizzatore viene attivato solo nelle zone irraggiate permettendo, in linea di principio, di distruggere il tessuto malato senza danneggiare troppo quello sano. Inoltre, in certi casi può essere utilizzata in zone non operabili chirurgicamente. Il foto-sensibilizzatore ideale deve essere non-tossico in assenza di luce, generare una limitata fotosensibilizzazione della pelle, e accumularsi velocemente e selettivamente nel tessuto tumorale. La somministrazione può avvenire per via topica (e.g. per malattie della pelle) o, più comunemente, per iniezione endovenosa. Dal punto di vista terapeutico, l'intervallo di lunghezze d'onda utili per l'attivazione del foto-sensibilizzatore è **fra 600 e 900 nm** (*PDT window*) perché questa radiazione è assorbita meno dai cromofori endogeni presenti nell'organismo (luce con lunghezza d'onda inferiore a 580 nm viene fortemente assorbita dall'emoglobina), cioè è più penetrante, e tuttavia è sufficientemente energetica da permettere la formazione dei ROS. Si valuta che la penetrazione nei tessuti della luce fra 630 e 800 nm vada da 3 a 8 millimetri. Quindi un buon foto-sensibilizzatore deve assorbire il più intensamente possibile in quell'intervallo di frequenze. La figura riporta le caratteristiche spettrali dei principali cromofori endogeni, la finestra terapeutica per PDT e le regioni di assorbimento caratteristiche delle principali classi di fotosensibilizzatori tetrapirrolici (figura) che verranno trattate in seguito: a) porfirine, b) clorine, c) batterioclorine d) ftalocianine. Porfirine, clorine e batterio-clorine sono molecole aromatiche (figura) che hanno rispettivamente 22, 20 e 18 elettroni π. Oltre ad avere una intensa banda di assorbimento intorno a 400 nm (banda Soret, $\varepsilon \sim 5\times10^5$ M^{-1} cm^{-1}), esse hanno delle bande satelliti meno intense a lunghezze d'onda maggiori, le cosiddette **bande Q**, usabili per la PDT. Le bande Q tipicamente cadono nell'intervallo 600 – 650 nm per le porfirine, 630 – 700 nm per le clorine e 700 – 800 nm per le batterio-clorine. Le ftalocianine sono dei macrocicli tetrapirrolici in cui gli atomi C nelle posizioni *meso* (5, 10, 15 e 20) sono sostituiti da N; gli assorbimenti alla massima lunghezza d'onda cadono

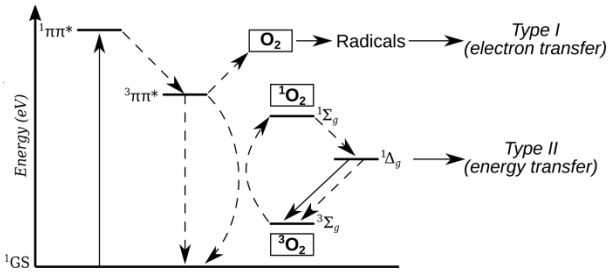






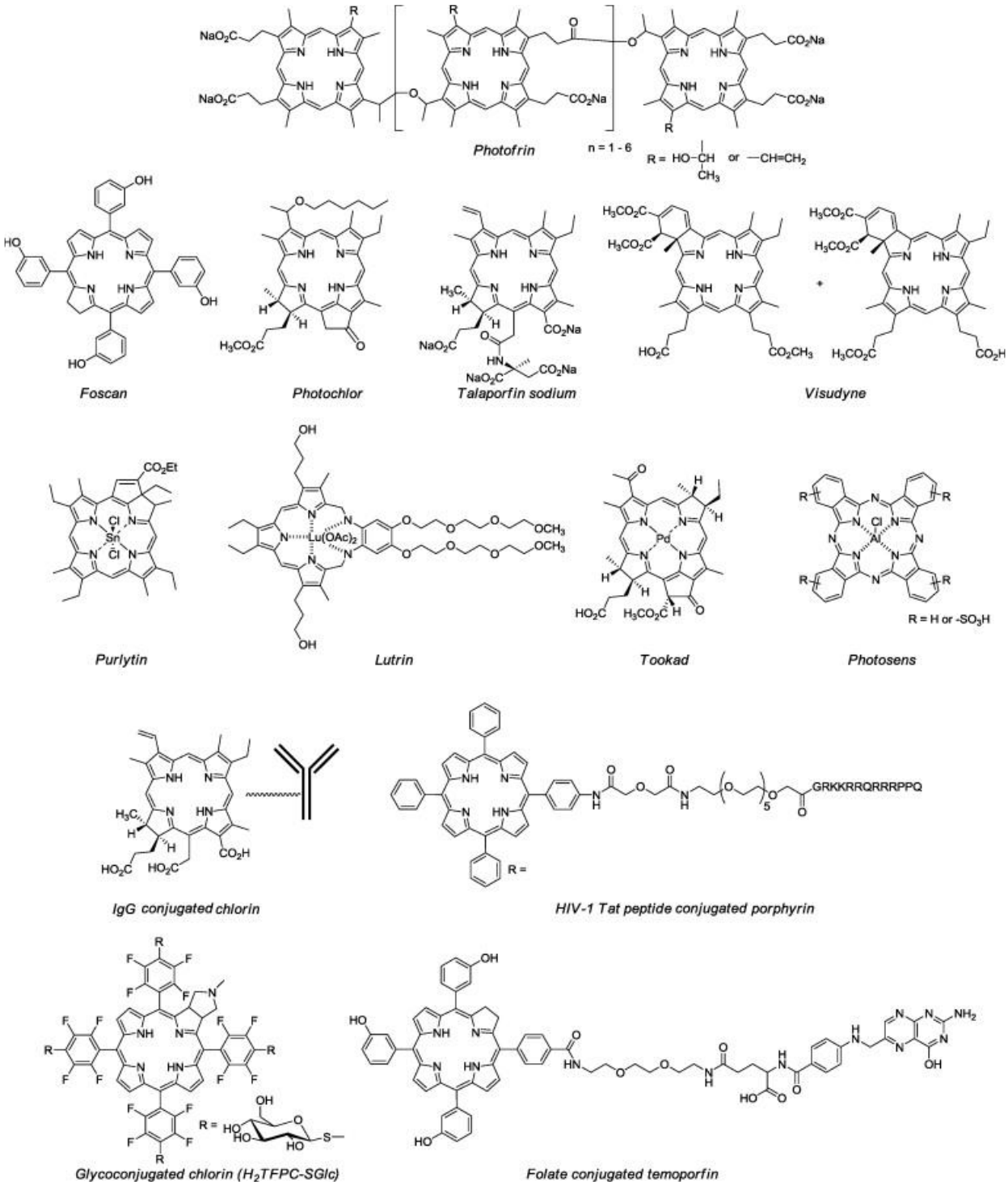
intorno a 700 nm. Come sorgenti di luce si usano tipicamente dei laser, ma alternative (e.g. LED) sono possibili. Secondo numerosi studi, la citotossicità indotta dalla PDT nelle cellule è dovuta principalmente alla generazione di **ossigeno di singoletto**, **$^1O_2$**, che è il ROS prevalente nel cosiddetto **meccanismo di tipo II**. In tale meccanismo, largamente prevalente nei tumori che presentano livelli normali di ossigeno, cioè non anossici o ipossici, il foto-sensibilizzatore, nel suo stato eccitato di tripletto, può trasferire energia (*energy transfer*) a vicine molecole di ossigeno nel loro stato fondamentale di tripletto, $^3O_2$, eccitandole allo stato di singoletto, $^1O_2$, molto reattivo. Per poter fare questo trasferimento di energia, lo stato eccitato di tripletto del foto-sensibilizzatore deve avere un'energia >94 kJ mol^{-1} rispetto al *ground state*, che è pari all'energia minima necessaria per generare $^1O_2$. L'ossigeno di singoletto è un ossidante molto potente e agisce in maniera indiscriminata. Il tempo di vita di $^1O_2$ (stato $^1\Delta_g$) nei sistemi cellulari è notevolmente più corto che in acqua o in solventi organici, e va da 100 ns nella regione lipidica delle membrane a 250 ns nel citoplasma. Quindi si valuta che possa diffondere in uno spazio di raggio ca. 45 nm dal punto in cui viene generato. Poiché il diametro delle cellule umane va da circa 10 a 100 μm, il sito dove $^1O_2$ viene generato determina quali strutture cellulari siano raggiungibili. Quindi la PDT, secondo questo meccanismo classico, è una **terapia ternaria**, in quanto richiede tre componenti: foto-sensibilizzatore, luce e ossigeno.

Un foto-sensibilizzatore ideale, oltre ad assorbire ad alte lunghezze d'onda, dovrebbe avere una elevata resa quantica di $^1O_2$: una resa quantica pari a 1 significherebbe che per ogni fotone assorbito si genera una molecola di $^1O_2$. Un meccanismo alternativo è quello detto di **tipo I**, nel quale il foto-sensibilizzatore dal suo stato eccitato di tripletto induce trasferimento di elettroni (anziché solo di energia) producendo radicali come il superossido $O_2^{\bullet-}$, idrossile OH• e perossido di idrogeno H_2O_2. Entrambi i meccanismi richiedono la presenza di ossigeno nel tessuto tumorale. La figura riporta il cosiddetto **Diagramma di Jablonski** (semplificato) per un generico foto-sensibilizzatore e i due tipi di meccanismi della PDT. C'è generale consenso che il meccanismo di tipo II sia prevalente e che l'ossigeno di singoletto danneggi soprattutto grassi insaturi e alcune catene laterali di amminoacidi e le basi azotate degli acidi nucleici.



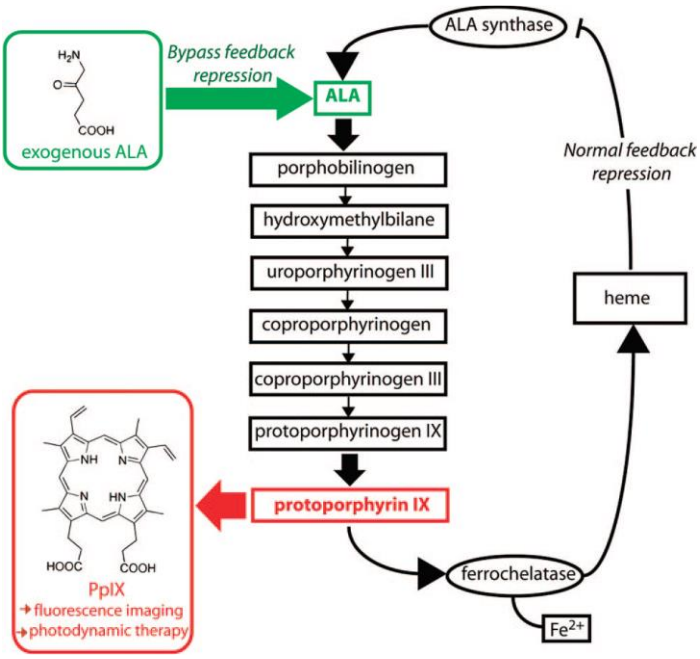
Un parametro importante nella PDT è il tempo ottimale che deve intercorrere tra la somministrazione del foto-sensibilizzatore e l'irraggiamento.

Il primo foto-sensibilizzatore approvato dalla FDA per il trattamento del cancro, e quindi considerato un agente PDT di prima generazione, è un derivato dell'ematoporfirina, il **Photofrin®** (figura), che consiste di una miscela di dimeri e oligomeri nei quali unità porfiriniche sono legate fra loro tramite diversi tipi di legami (etere, estere, C–C). Il tipico trattamento avviene come segue: Photofrin viene iniettato endovena (dose 2–5 mg/kg) e l'irraggiamento con luce a 630 nm avviene dopo 24–48 h dall'iniezione. Photofrin è stato approvato per uso clinico nel trattamento del tumore ai polmoni, cancro all'esofago e alla vescica e per malattie della pelle sia di tipo cancerogeno che no. Sebbene Photofrin sia un foto-sensibilizzatore efficace, esso presenta dei notevoli limiti: oltre a non essere una sostanza pura e ben definita dal punto di vista chimico, assorbe relativamente poco (ε a 630 nm = 1170 M^{-1}cm^{-1}) a lunghezze d'onda elevate, cioè assorbe luce poco penetrante. Dal punto di vista clinico, avendo un tempo di *clearance* molto lungo, induce foto-sensibilizzazione della pelle per lunghi periodi dopo il trattamento (4 – 8 settimane).

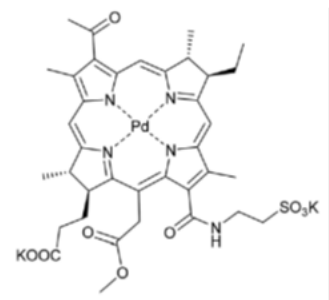


I cosiddetti **agenti PDT di seconda generazione** includono il **Foscan** (o temoporfin) che è una *meso*-tetraidrossifenil-clorina che si accumula nei tumori ed ha un'eccellente foto-tossicità. Il Foscan, che viene irradiato in una banda Q a 652 nm ($\varepsilon = 3.0 \times 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$) è stato utilizzato nel trattamento (sperimentale) del tumore alla prostata. Il Foscan, avendo caratteristiche fotofisiche decisamente migliori del Photofrin, (assorbe a λ maggiori, con ε più grande e ha una resa quantica di ossigeno di singoletto molto più elevata) permette di usare dosi minori (0.15 mg/kg) e tempi di irraggiamento più brevi. Come Photofrin, però, induce la fotosensibilizzazione della pelle per parecchie settimane dopo il trattamento. Il **Photochlor** (o **HPPH**), ottenuto funzionalizzando un derivato della clorofilla, la feoforbide α, è molto lipofilo, si accumula fortemente nei tumori e non presenta gli effetti di foto-sensibilizzazione di Photofrin e Foscan. A causa della sua elevata preferenza per i tessuti tumorali, viene molto studiato per la preparazione di coniugati di tipo

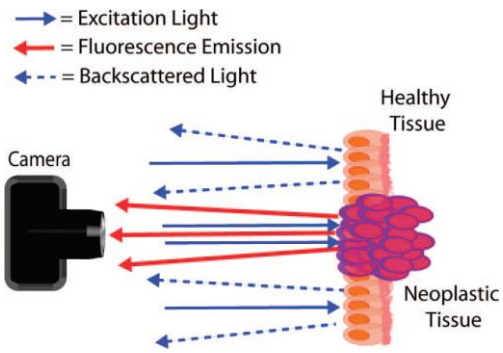
teranostico (vedi dopo). Tumori della pelle primari e secondari e altre malattie cutanee (con l'eccezione dei melanomi maligni pigmentati che, a causa della melanina, non consentono una efficace penetrazione della luce) vengono trattati col metodo **ALA-PDT** (approvato da FDA nel 2000), dove ALA (o Levulan) è l'acido 5-aminolevuleico, il bio-precursore della protoporfirina IX, una porfirina endogena, importante precursore di gruppi prostetici biologicamente essenziali come l'eme, il citocromo c e le clorofille (ad esempio la protoporfirina IX viene convertita in un gruppo eme dall'azione dell'enzima ferrochelatasi, che inserisce un atomo di Fe al centro della protoporfirina). Si è visto che la somministrazione di ALA induce – tramite il processo di biosintesi cellulare dell'eme (figura) – la produzione della protoporfirina IX, a cui fa seguito l'irraggiamento (circa 4 h dopo la somministrazione di ALA). Vari studi hanno dimostrato che il trattamento ALA-PDT è efficacie, sicuro e generalmente bel tollerato dai pazienti. ALA o il simile metilammino-levulinato (MAOP, Metvix) hanno un uso topico.

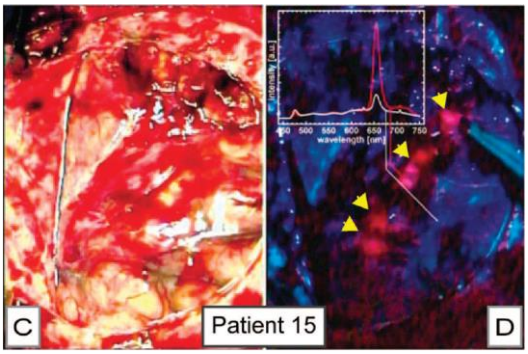


Alcuni macrocicli pirrolici per PDT contengono all'interno un **atomo metallico**, che in generale – per il ben noto *heavy atom effect* – facilita il passaggio del PS dallo stato eccitato di singoletto a quello di tripletto (*inter-system crossing*), e quindi favorisce la generazione di $^1O_2$. Il **lutezio-Motexafin** (LuTex), un membro della famiglia di porfirine espanse note come texapirine (hanno 5 atomi N anziché 4, come le 5 punte della stella della bandiera texana), è un foto-sensibilizzatore che agisce prevalentemente a livello vascolare ed è in fase sperimentale contro il tumore della prostata. Un composto molto promettente è il **TOOKAD-solubile** (figura), una versione più solubile di quello riportato nella figura generale), che ha già raggiunto la fase 3 di studio clinico per il trattamento PDT del tumore della prostata. È una palladio-batteriofeoforbide (un altro macrociclo tetrapirrolico derivante dalla clorofilla). Il ruolo del Pd all'interno del macrociclo è quello di contribuire a ottimizzare le proprietà fotofisiche del sistema ed è sufficientemente inerte da non venire rimosso durante la terapia. Anche il TOOKAD è un foto-sensibilizzatore che agisce a livello vascolare. Un altro esempio di macrociclo metallato, in fase di studio clinico per vari tipi di tumori è la stagno etil etioporporina (**Purlytin**). Fra gli agenti per PDT di seconda generazione ci sono anche delle metallo-ftalocianine. Le ftalocianine sono state molto studiate in questo ambito negli ultimi anni poiché presentano proprietà fotofisiche e fotochimiche ottimali: hanno intense bande di assorbimento nel rosso, tra 670 e 770 nm, e in presenza di un opportuno atomo metallico centrale come zinco, alluminio o silicio, hanno stati eccitati di tripletto con tempi di vita lunghi e generano ossigeno di singoletto con resa quantica elevata. Il derivato benzoporfirinico **Visudyne**, inizialmente sviluppato per la terapia fotodinamica di tumori, viene utilizzato principalmente per **PDT oculare** in quanto vi si accumula preferenzialmente; nel 2000 è stato approvato per il trattamento della degenerazione maculare senile (AMD). Il composto viene somministrato per endovena (0.3 mg/kg) e poi attivato dopo 3 – 5 h con un oftalmoscopio dotato di un laser che emette a 690 nm. Da notare che questa è, al momento, l'applicazione più importante della PDT, con milioni di casi trattati, ed è l'unica in cui la PDT viene usata in prima istanza (*first-line treatment*), cioè rappresenta la migliore terapia



disponibile. L'uso della PDT nel trattamento dei tumori è spesso di tipo palliativo (cioè ne attenua i sintomi e/o ne rallenta la crescita) e su tumori avanzati.
Gli agenti per PDT di seconda generazione sono stati sviluppati con un approccio cosiddetto "passivo", basato soprattutto su correlazioni struttura-attività. Ad esempio, si è visto che foto-sensibilizzatori che contengano gruppi idrofobici su un lato della molecola e sostituenti idrofili sul lato opposto sono più attivi di quelli in cui tali sostituenti sono inseriti sul cromoforo senza un ordine preciso. L'approccio "attivo", o *targeted*, che sostanzialmente vorrebbe indirizzare il foto-sensibilizzatore su determinati recettori che sono sovra-espressi nelle cellule tumorali, ha prodotto qualche agente di **terza generazione** con risultati incoraggianti *in vitro*, ma con limitata attività e selettività verso il tumore *in vivo*. L'approccio è simile a quello che si vedrà per i radiofarmaci, cioè generare dei coniugati nei quali il foto-sensibilizzatore è legato a un *targeting vector* che lo porti specificamente sul tumore (e.g. colesterolo, farmaci antitumorali, intercalanti del DNA, peptidi, anticorpi monoclonali, folato…). Alcuni esempi di PS di terza generazione sono riportati nelle ultime due righe della figura grande.
Si è verificato sperimentalmente che i foto-sensibilizzatori per PDT basati su porfirine (e.g. Photofrin, le batterio-clorine,…) hanno la capacità di accumularsi specificamente nei tumori, tanto da venire definiti ***tumor avid***. Questo fatto, sfruttando l'emissione di fluorescenza e fosforescenza di questi foto-sensibilizzatori, potrebbe permettere l'*imaging* di fluorescenza dei tumori (cioè la diagnosi) ed è particolarmente utile durante la chirurgia "guidata", per definire il limite fra tessuto tumorale e quello sano (*tumor margin resection*, figura). In altre parole i PS combinano in un'unica molecola le potenzialità di essere usati come terapeutici e come diagnostici. La precisa individuazione dei margini tra tessuto sano e tessuto tumorale diventa particolarmente importante nella chirurgia dei tumori cerebrali, dove l'eccesso di rimozione di tessuto sano può avere conseguenze molto gravi. La figura mostra, per un paziente trattato con Foscan, la differenza tra una sezione di cervello, esposta durante un intervento chirurgico, irradiata con luce bianca (a sinistra) e con luce blu (cioè nella banda Soret) a destra; la fluorescenza evidenzia il residuo tessuto tumorale, invisibile in luce bianca. Sfortunatamente, il Photofrin e la maggior parte dei foto-sensibilizzatori *tumor avid* che assorbono a lunghezze d'onda elevate (e quindi penetranti) hanno degli *Stokes shifts*, cioè differenza fra la frequenza delle bande di assorbimento e di emissione, molto piccoli e ciò ne limita l'applicabilità per l'*imaging* (cioè la diagnosi) dei tumori non superficiali. Nel caso della chirurgia guidata tuttavia, dal momento che si devono individuare tessuti esposti, non serve una grande penetrazione e si irradia nella banda Soret (cioè nel blu). Un simile approccio viene condotto anche con ALA. Infatti, la somministrazione di ALA fa aumentare l'accumulo di porfirine endogene, come la Protoporfirina IX, nel tessuto tumorale, consentendo (con i limiti espressi sopra) di visualizzare le regioni neoplastiche a causa della loro fluorescenza. Questo fenomeno è stato applicato clinicamente (la tecnica si chiama *fluorescent diagnosis*, FD) per individuare tumori al cervello, esofago, utero e pelle. Si sta cercando di sfruttare la selettività spontanea delle porfirine per i tessuti tumorali coniugandole a cromofori con caratteristiche di emissione più favorevoli.

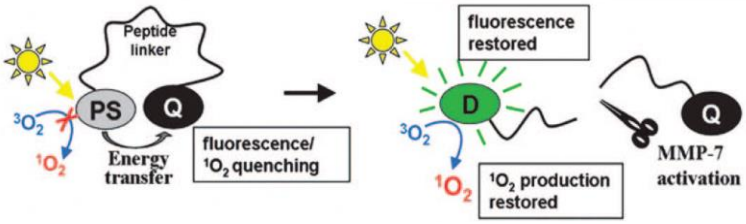




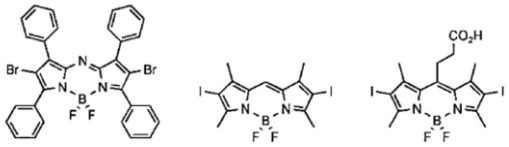
Si sta anche cercando di sfruttare questa caratteristica delle porfirine per sviluppare degli agenti bimodali, **teranostici**, coniugando un foto-sensibilizzatore per PDT (terapeutico) con un agente per *imaging* MRI (complessi di Gd), PET, SPECT (vedi dopo). In altre parole, le porfirine *tumor avid* possono, in linea di principio, essere sfruttate esse stesse come *targeting vectors* per portare degli

agenti di *imaging* nei tumori. Nel caso di coniugati con radio-diagnostici, l'idea è quella di sviluppare una molecola che possa prima venire usata in dose molto bassa, marcata radioattivamente, per il *radio-imaging* e vedere come si distribuisce, e poi somministrarla senza marcatura radioattiva, in dose più elevata, per la terapia PDT. Chiaramente il tempo di bio-distribuzione del coniugato deve essere compatibile col tempo di semi-vita fisico del nuclide radioattivo (vedi dopo).

Si stanno anche cercando di sviluppare dei foto-sensibilizzatori che vengano **attivati specificamente**, sia per l'*imaging* di fluorescenza che per la PDT, nel sito di interesse (*site-activated constructs*). Il concetto è illustrato nella figura: nella molecola di partenza il PS è posto vicino a un *quencer* (Q) che ne inibisce l'attività tramite un processo di trasferimento di energia. Quando uno specifico enzima (e.g. sovra-espresso in un tumore, oppure un enzima specifico dei batteri e non presente nelle cellule di mammiferi, se si volesse sfruttare la PDT come metodo anti-batterico) rompe il legame chimico che tiene vicini PS e Q, l'attività del foto-sensibilizzatore viene ripristinata. Da notare che, in linea di principio, in questa strategia non serve la *targeted delivery* del foto-sensibilizzatore, in quanto la specificità viene ottenuta tramite l'attivazione selettiva nel tessuto malato. Nella realtà, non è facile individuare dei *bio-marker* che siano altamente specifici per i tumori e spesso l'attivazione selettiva dovrebbe sfruttare differenze modeste di un qualsivoglia *molecular target* fra tessuto sano e malato.



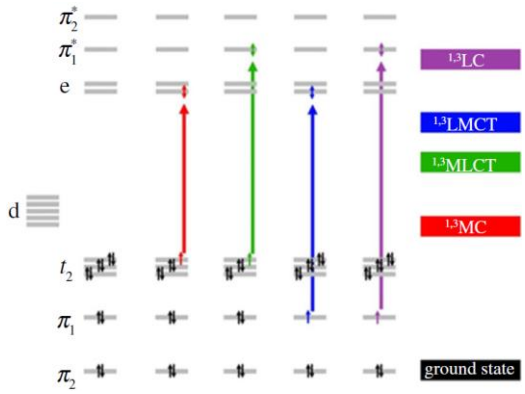
C'è anche parecchio lavoro di ricerca per sviluppare agenti per PDT non-porfirinoidi. Fra le numerose classi di cromofori investigate (nessun agente ancora approvato per l'uso clinico), ricordiamo soltanto i derivati del boro-dipirrometene (**BODIPY**, figura). L'inserimento di atomi pesanti, in questo caso alogeni, ha sempre lo scopo di favorire l'*inter-system crossing* verso lo stato eccitato di tripletto.



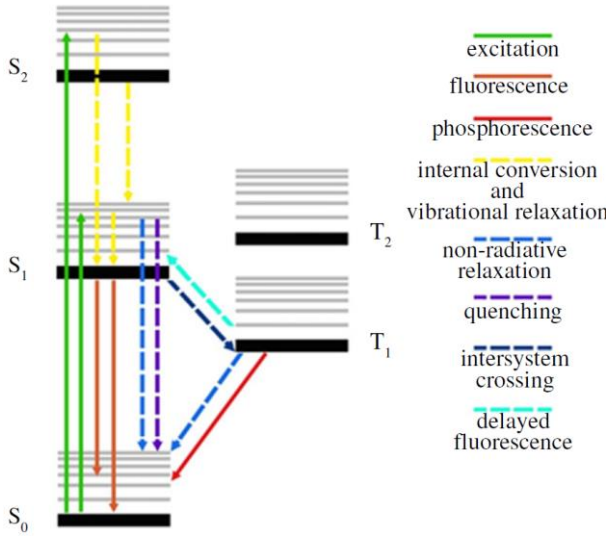
In conclusione, sebbene la PDT presenti degli indubbi vantaggi rispetto alle terapie antitumorali convenzionali (e.g. effetti collaterali molto contenuti, nessun effetto immuno-soppressivo) essa è ancora molto poco applicata rispetto ai trattamenti ben conosciuti, cioè chemio e radio-terapia. La causa principale sta nel fatto che la PDT – come già detto – ha un carattere multi-fattoriale: dopo aver scelto il foto-sensibilizzatore e la sorgente luminosa più adatti, l'esito della procedura dipende ancora dalla dose del foto-sensibilizzatore, dalla presenza di ossigeno molecolare nei tessuti malati, dal tempo che intercorre tra la somministrazione del PS e quella della luce, dalla quantità e dalla velocità di somministrazione della luce. Quindi non è solo necessario stabilire quale PS sia più adatto per un certo tipo di tumore, ma anche individuare e validare dei **protocolli standardizzati** che siano efficaci e affidabili. Al momento, la carenza di procedure standardizzate rende anche molto difficile il confronto tra diversi esperimenti.

Composti metallici foto-attivabili

In generale, si può affermare che le molecole, quando sono in uno stato elettronico eccitato, hanno distribuzioni elettroniche differenti rispetto al loro stato fondamentale, e così anche geometrie differenti in termini di lunghezze e angoli di legame. Per quanto riguarda i complessi dei metalli di transizione, la figura riassume schematicamente il diagramma degli orbitali molecolari per un complesso ottaedrico d^6 a basso spin, e le possibili transizioni elettroniche che portano a stati eccitati. Come riassunto nel **Diagramma di Jablonski** riportato nella figura successiva, l'assorbimento di energia luminosa porta a popolare livelli elettronici eccitati, e si può monitorare il ritorno allo stato fondamentale che può avvenire, oltre che tramite processi non-radiativi, anche tramite l'emissione di **fluorescenza** da uno stato eccitato di singoletto, ed eventualmente anche tramite l'emissione di **fosforescenza** da uno stato eccitato di tripletto, se questo si popola tramite un processo di *intersystem crossing*. Il passaggio singoletto→tripletto viene favorito dall'accoppiamento spin-orbita, che è tanto più rilevante quanto più l'atomo metallico è pesante (*heavy atom effect*). Da notare che gli stati eccitati di tripletto possono avere geometrie differenti sia rispetto al *ground state* che rispetto agli stati eccitati di singoletto.



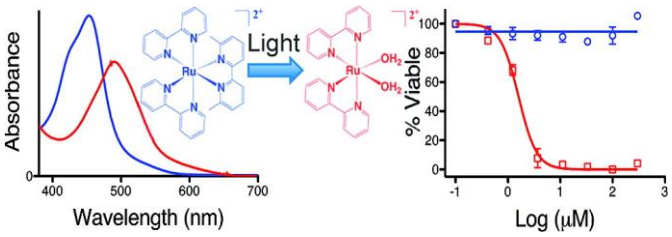
In prima approssimazione, si può distinguere il tipo di reattività tipica di un complesso eccitato a seconda del tipo di eccitazione che ha subìto, o più precisamente del tipo di stati eccitati che vengono popolati in seguito all'eccitazione.



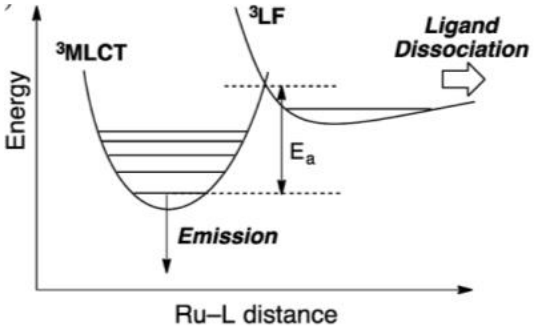
Una transizione di tipo d – d (o *Metal Centred*, MC o anche detta *Ligand Field*, LF), poco intensa in quanto proibita secondo Laporte (e, a volte, anche per lo spin, a seconda del numero di elettroni d e della configurazione elettronica alto spin o basso spin) porta a popolare orbitali di antilegame M–L, ad esempio in un complesso ottaedrico gli orbitali e_g. Ciò può portare a reazioni di dissociazione dei leganti (**foto-dissociazione**) o di isomerizzazione del complesso (**foto-isomerizzazione**), magari indotta da una dissociazione. Infatti, in uno stato elettronico eccitato, soprattutto se si popolano orbitali con carattere antilegante M–L, le lunghezze metallo–legante si possono allungare, spesso selettivamente, rendendo il rilascio e lo scambio dei leganti non solo più facile, ma anche selettivo. L'effetto dell'eccitazione elettronica sulla velocità di scambio dei leganti può essere enorme: reazioni di sostituzione su centri metallici relativamente inerti, che richiedono magari ore per avvenire allo stato fondamentale, possono avvenire invece in nanosecondi in uno stato eccitato. Per queste reazioni si definisce la resa quantica (*quantum yield*) come la quantità di reazione per mole di fotoni assorbiti, cioè in pratica la resa quantica definisce l'efficienza della foto-reazione.

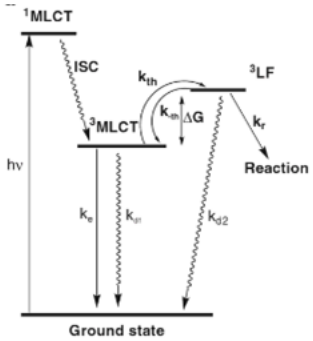
Invece l'eccitazione di una transizione a trasferimento di carica (molto più intensa perché permessa) comporta formalmente lo spostamento di un elettrone da orbitali del metallo ad orbitali dei leganti (MLCT) o viceversa (LMCT). Una transizione MLCT corrisponde formalmente alla ossidazione del metallo e riduzione di un legante. Normalmente questi assorbimenti possono dare origine a **reazioni redox**, cioè a veri trasferimenti di elettroni, purché lo stato eccitato (normalmente di tripletto) abbia un tempo di vita sufficientemente lungo da permettergli di incontrare la molecola *partner* da ridurre. La rottura omolitica di un legame è anche possibile. Per complessi in cui le bande di assorbimento CT siano ben separate da quelle MC si può effettuare un irraggiamento selettivo,

controllando così il tipo di foto-reazione (se a livello degli stati eccitati non c'è troppo mescolamento): per esempio, per i complessi di Co(III) l'irraggiamento nella banda LMCT tipicamente induce foto-riduzione generando specie di Co(II) e leganti ossidati, mentre irraggiamento in una transizione MC (i.e. d – d) causa foto-sostituzione.
Per quanto riguarda la radiazione eccitante, per sfruttare la fotochimica dei complessi metallici dal punto di vista biomedico, cioè *in vivo*, valgono le regole riportate per la PDT. Cioè si dovrebbe usare di preferenza luce verso il rosso dello spettro, perché non è essa stessa dannosa per i tessuti ed è più penetrante. Per alcuni complessi, soprattutto se portano contemporaneamente leganti donatori e accettori fortemente coniugati, usando degli impulsi laser molto ravvicinati è possibile ottenere anche la ***two-photon excitation***, in cui due fotoni, di solito di lunghezza d'onda >600 nm, vengono assorbiti in sequenza dalla stessa molecola che raggiunge in due *step* successivi lo stato eccitato dove l'avrebbe portata l'assorbimento di un singolo fotone di frequenza doppia. In questo modo è teoricamente possibile usare luce nel rosso, o anche nel NIR, per eccitare bande che assorbono luce poco penetrante. Il parametro che stabilisce se un complesso è adatto a questo tipo di eccitazione, è la sua sezione d'urto (*cross-section*) per la *two-photon excitation*. Per poter avere la *two-photon excitation* però la sorgente luminosa deve avere una elevata densità di fotoni, in pratica si devono usare dei laser al femtosecondo. Inoltre, dal momento che i due fotoni devono essere assorbiti dalla molecola quasi simultaneamente, il volume di eccitazione è molto più piccolo che per la consueta eccitazione a fotone singolo, cioè il raggio laser deve essere molto focalizzato.
La **dissociazione foto-indotta di leganti** può essere considerata sotto **due punti di vista**. Il primo è quello in cui, partendo da un complesso coordinativamente saturo e inerte si vogliono liberare, tramite la luce, dei siti di coordinazione per permettere al centro metallico di interagire con delle biomolecole, in altre parole si fa una foto-attivazione del complesso tramite dissociazione foto-indotta di uno o più leganti. Da sottolineare che questo meccanismo, al contrario della PDT, non richiede la generazione di ROS e quindi non dipende dalla presenza di ossigeno nel tessuto. Il secondo punto di vista è invece rivolto verso il legante che viene rilasciato, che è l'agente biologicamente attivo. Questo principio si chiama anche *photo-uncaging* (e vale in generale per qualsiasi molecola). L'approccio del *photo-uncaging* è molto utilizzato anche in chimica puramente organica: un frammento attivo viene inattivato (*caged*) legandolo covalentemente a un gruppo protettivo foto-labile. Nell'approccio della chimica inorganica, un legante biologicamente attivo viene inattivato dalla sua coordinazione a un centro metallico inerte e stabile al buio, cioè il frammento metallico è il gruppo protettivo foto-labile. L'irraggiamento con la luce provoca il rilascio (*uncaging*) del legante. In questo caso il frammento metallico che si genera non deve interferire (e.g. non deve essere tossico) o, nella migliore delle ipotesi, può contribuire all'attività del legante rilasciato. In tutti e due i casi, come già visto per la PDT, la foto-attivazione è un metodo elegante per convertire pro-farmaci non tossici in specie attive (e.g. citotossiche) in modo controllato sia dal punto di vista spaziale che temporale. Da notare però che mentre la PDT è un processo di tipo catalitico (cioè il PS viene eccitato molte volte, fino al suo *photobleaching*), il *photo-uncaging* è stechiometrico. La ricerca in questo settore è molto attiva, ma al momento non c'è nessuna applicazione farmacologica, per cui non si entra in dettaglio ma vengono forniti solo alcuni esempi rappresentativi.
Tra i molti esempi di foto-attivazione di complessi coordinativamente saturi ed inerti noti in letteratura ne citiamo uno solo, illustrato schematicamente nella figura. Normalmente i complessi polipiridilici, coordinativamente saturi, di Ru(II) del tipo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ sono molto foto-stabili. Tuttavia, se vengono introdotte delle distorsioni nella geometria ottaedrica essi diventano foto-labili e rilasciano un legante. Tutti i complessi di Ru(II) di questo tipo possiedono intense bande MLCT nel visibile; l'eccitazione in queste bande porta a popolare uno stato di tripletto (^{3}MLCT). Nei complessi

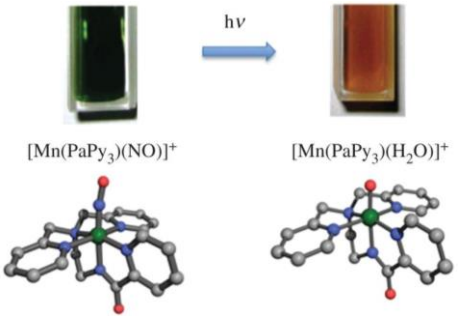


geometricamente distorti, l'energia di uno stato di tripletto d–d non-emissivo e di carattere dissociativo, ^{3}d–d*, detto anche *ligand field triplet* (^{3}LF), in cui le distanze di legame sono solitamente più lunghe rispetto sia al *ground state* che al ^{3}MLCT (figura), risulta abbassata rispetto a $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (a causa della minore sovrapposizione fra orbitali d del metallo e orbitali del legante) e quindi può venire popolato termicamente dallo stato eccitato ^{3}MLCT, il che porta alla rapida formazione dei prodotti di foto-dissociazione (figura). Così il complesso $[Ru(bpy)_2(6,6'Me_2bpy)]^{2+}$, presenta una geometria ottaedrica distorta a causa dei metili del 6,6′Me_2bpy che puntano verso gli altri due bpy. Il complesso è stabile e non citotossico al buio (curva blu). Tuttavia, quando viene irradiato con luce visibile per λ >450 nm rilascia rapidamente (10 min) il 6,6′Me_2bpy generando il di-acquo complesso $[Ru(bpy)_2(OH_2)_2]^{2+}$ che è citotossico, con valori micromolari di IC_{50} (curva rossa), molto probabilmente perché si coordina al DNA (come avviene in esperimenti *in vitro*). Da notare che l'attività citotossica e la capacità di interagire col DNA dopo foto-eccitazione permangono anche in presenza di elevate concentrazioni di glutatione, che invece è noto disattivare il cisplatino (tramite coordinazione della cisteina). La differenza di tossicità tra condizioni di luce e buio viene detto **indice di fototossicità** (*Phototoxicity Index*, PI), ed è un parametro molto importante per stabilire la bontà di un complesso foto-attivabile.



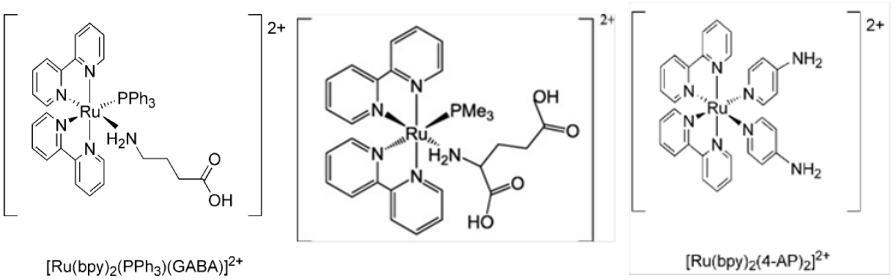


Nel secondo approccio, cioè il rilascio foto-indotto di molecole bio-attive, c'è ad esempio molto interesse nel rilascio controllato di piccole molecole, come NO e CO, entrambi prodotti endogeni in molti organismi, umani inclusi, che hanno funzioni cito-protettive (CO), e operano come messaggeri secondari e trasmettitori di segnali nelle cellule (NO, vedi dopo). Il monossido di carbonio inoltre riduce i processi infiammatori e diminuisce il rigetto degli organi trapiantati. Il rilascio deve essere in qualche modo attivato (*triggered*). Così, accanto a complessi che portano leganti NO (*nitrosili*) o CO (*carbonili*) e che sono in grado di rilasciarli chimicamente, ad esempio in seguito a variazioni di pH o altri parametri fisiologici, o per sostituzione di altri leganti o per azione di enzimi, (i cosiddetti *NORM* e *CORM*, *NO Releasing Molecules* e *CO Releasing Molecules*), si studiano dei derivati che possano rilasciare queste molecole in seguito a foto-eccitazione (*photo-NORM* e *photo-CORM*). L'esempio in figura mostra la variazione di colore di un nitrosile di Mn in seguito al rilascio foto-indotto di NO.



Composti metallici in grado di rilasciare o catturare NO, cioè di regolare il livello di ossido d'azoto, vengono attivamente studiati per il trattamento delle **malattie cardiovascolari**. Infatti, la concentrazione di NO modula la vasodilatazione: al crescere del livello di NO aumenta la vasodilatazione e quindi aumenta la circolazione del sangue e diminuisce la pressione. Il nitroprussiato di sodio, $Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$, fa diminuire rapidamente la pressione arteriosa. Un suo aspetto negativo è che oltre a NO rilascia nel sangue anche il tossico cianuro (CN^-). Come appena detto, per superare questi effetti negativi vengono studiati sia nitrosili di Fe che di Ru e altri metalli come potenziali nuovi *NO-releasing molecules*, anche in seguito a foto-attivazione (*photo-NORM*). D'altra parte, in alcune condizioni patologiche, rare ma molto gravi, come nella sindrome da shock tossico (*toxic shock syndrome*, TSS), provocata da una tossina di origine batterica, la pressione del sangue è estremamente bassa e deve venire rialzata rapidamente per stabilizzare il paziente. In questo caso sono stati studiati dei composti di metalli, in particolare di rutenio, che

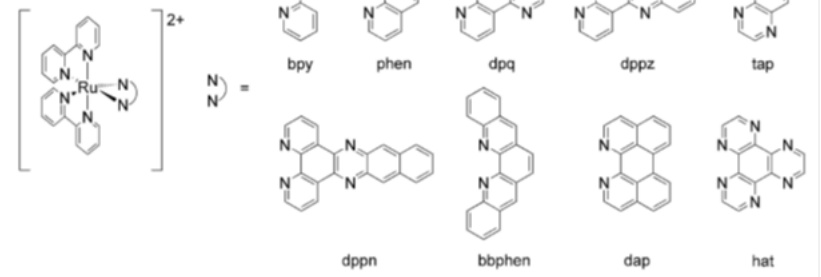
agiscano da *scavenger* dell'NO in eccesso, coordinandolo rapidamente, in modo da far risalire la pressione sanguigna.

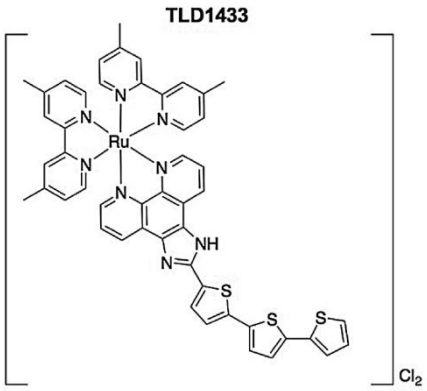


Oltre a queste piccole molecole, sono stati preparati complessi per il rilascio foto-indotto di altre molecole biologicamente attive (che si devono comportare anche come leganti). Un settore di ricerca molto importante nel quale vengono studiati questi composti metallici *caged* è quello delle neuroscienze. Il rilascio rapido e localizzato di **molecole neuro-attive** da precursori inattivi viene utilizzato per studiare la distribuzione dei recettori, cinetiche di *ion channels*, e altri processi. In questi sistemi, un fattore molto importante è la velocità con la quale il composto bio-attivo viene rilasciato dalla sfera di coordinazione del metallo, in quanto essa definisce – dal punto di vista delle cinetiche – il tipo di processi che possono venire studiati o controllati.

Sono stati studiati dei complessi di Ru(II) (figure) in grado di foto-dissociare l'acido γ-amminobutirrico (GABA) che è il principale neurotrasmettitore inibitore, o la 4-amminopiridina (4AP) che blocca dei canali del potassio, o ancora il glutammato, che è il più diffuso neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi e di conseguenza la capacità di rilasciarlo in modo spazio-temporale controllato può risultare cruciale per il controllo dei circuiti neuronali. Ad esempio, il complesso di Ru(II) *cis*-$[Ru(bpy)_2(PMe_3)(GluH_2)](PF_6)_2$ riportato in figura rilascia rapidamente il glutammato quando irradiato con luce visibile, fino a 530 nm.

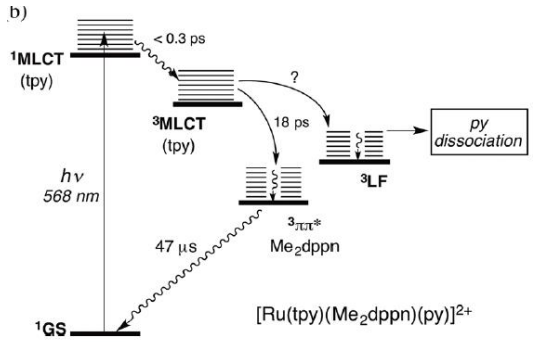
Vi sono anche dei complessi che hanno caratteristiche di assorbimento che li rendono utilizzabili come foto-sensibilizzatori in PDT (soprattutto con leganti aromatici fortemente delocalizzati). In questo caso i complessi devono essere stabili e anche foto-stabili, inerti e non tossici al buio. I complessi polipiridilici di Ru(II) del tipo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ sono stati molto studiati *in vitro* quali foto-induttori di rotture nel DNA (*DNA cleaving agents*) tramite un processo mediato dall'ossigeno. Lo stato eccitato di tripletto (in assenza di distorsioni, vedi prima) riesce a generare $^1O_2$. Se uno dei tre leganti bis-iminici ha una vasta area aromatica (figura), si comporta da efficiente intercalante tra le basi del DNA e quindi l'ossigeno di singoletto viene generato nelle immediate vicinanze del DNA. Normalmente si irradia il complesso nella banda MLCT che cade intorno a 500 nm. Nel 2016 il composto di Ru(II) denominato **TLD1433** (figura) è stato introdotto in fase clinica I in Canada, e attualmente è in fase II come agente per terapia PDT (irradiando a 530 nm) contro un tipo di tumore alla vescica (Non-Muscle Invasive Bladder Cancer). Questo è il primo esempio di un composto inorganico introdotto in fase clinica come agente PDT.

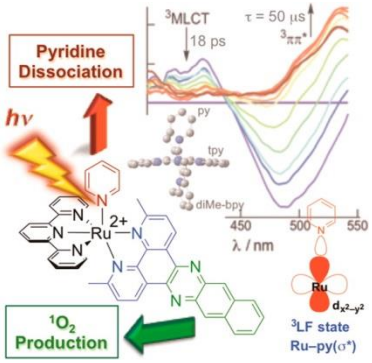


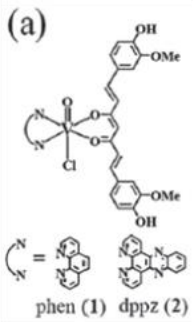
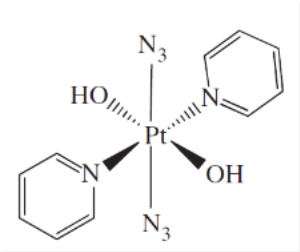


Dal punto di vista fotofisico, se si vuole generare $^1O_2$, bisogna cercare di fare in modo che il complesso possieda uno stato eccitato di tripletto ^{3}MLCT (o $^3\pi$–π^*, cioè centrato sul legante) a bassa energia e quindi lungo tempo di vita, cioè il contrario di quando si vuole invece provocare la foto-dissociazione di un

legante (in quel caso si deve abbassare l'energia del ^{3}LF). Modulando opportunamente la natura dei leganti, cioè scegliendo dei leganti ampiamente aromatici che assorbano nel visibile per dare delle bande $^3\pi$–π^* a bassa energia, il loro ingombro sterico e le distorsioni della geometria ottaedrica, è possibile modulare l'energia degli stati eccitati del complesso in modo di avere una foto-reattività "doppia", cioè sia foto-dissociazione che generazione di ossigeno di singoletto, come illustrato pittoricamente nella figura colorata e, tramite il Diagramma di Jablonsky, nell'altra. In questo modo è possibile, in linea di principio, aggredire la cellula tumorale con due meccanismi diversi. Infine, non solo complessi polipiridilici di Ru(II) sono in grado di foto-generare ossigeno di singoletto. Ad esempio, il complesso ottaedrico col gruppo vanadile e la curcumina (cur), [VO(cur)(dppz)Cl] (figura) ha un'attività PDT maggiore del farmaco Photofrin® quando irradiato con luce visibile tra 400 e 700 nm.







Un altro possibile meccanismo di foto-attivazione di complessi metallici è la **foto-riduzione**. È chiaro che la presenza di bande di assorbimento LMCT favorisce la possibilità che avvenga foto-riduzione del centro metallico. Ad esempio, il diazido complesso di Pt(IV) *trans,trans,trans*-$[Pt(OH)_2(N_3)_2(py)_2]$ (figura) è stabile al buio, anche in presenza di glutatione, ma quando viene irradiato con luce verde o blu (320 – 400 nm) subisce foto-riduzione a specie di Pt(II) (la fonte di elettroni sono le azidi, N_3^-, con generazione di N_2) e induce *cross-links* nel DNA, probabilmente dovuti alla specie *trans*-$\{Pt(py)_2\}^{2+}$. Soprattutto, il complesso di Pt(IV) è non-citotossico al buio nei confronti di diverse linee cellulari tumorali, ma diventa molto citotossico (IC_{50} micromolari) in seguito ad irraggiamento con luce visibile blu, con PI anche >150 in certe linee cellulari.