



MARTA E. ALBERTO, BRUNA C. DE SIMONE, TIZIANA MARINO,  
GLORIA MAZZONE, EMILIA SICILIA, MARIROSA TOSCANO, NINO RUSSO  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE CHIMICHE  
UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA  
NRUSSO@UNICAL.IT

## TEORIA DEL FUNZIONALE DELLA DENSITÀ E TERAPIA FOTODINAMICA: UN MATRIMONIO PROMETTENTE

*Il contributo che la chimica teorica e computazionale apporta alla comprensione dei meccanismi elementari alla base della terapia fotodinamica (PDT) ed alla progettazione di nuovi farmaci da utilizzare nella procedura medica ad essa correlata è brevemente riassunto. In particolare si mostrerà come la teoria del funzionale della densità (DFT) sia capace di riprodurre con ottime approssimazioni i parametri fotofisici significativi per la PDT in tempi di calcolo ragionevoli che consentono lo studio di molecole di media-grande dimensione. Tutto ciò permette di indirizzare la sintesi di nuovi farmaci che possiedano le proprietà richieste per le successive prove in vitro ed in vivo.*

### Introduzione

L'elioterapia, denominata terapia fotodinamica nel XX secolo, ha radici millenarie che risalgono alle antiche società cinesi, indiane, egiziane, romane e greche. I protomedici avevano empiricamente scoperto che la luce solare combinata con alcune sostanze naturali sciolte in acqua avevano proprietà curative e, in particolare, potevano essere utilizzate con successo per il trattamento di alcune malattie della pelle. Ma le basi scientifiche della terapia fotodinamica (PDT) hanno iniziato a svilupparsi nel 1900 quando Raab notò che la luce solare danneggiava alcune specie di micro-

bi se nella soluzione era presente l'acridina [1]. Nel 1901 Finsen notò che in determinate circostanze la luce infrarossa impediva la forma-

zione delle pustole del vaiolo [2] e nel 1903 von Tappeiner e Jesionek proposero l'uso combinato di eosina e luce visibile per la cura del tumore della pelle [3]. A partire da queste scoperte la ricerca e la sperimentazione di fotosensibilizzatori capaci di agire su tumori ed altre malattie si sono fortemente sviluppate e, attualmente, la PDT è considerata una promettente procedura medica efficace e non invasiva [4]. Nonostante il gran numero di ricerche in questo campo, i farmaci utilizzati nei protocolli clinici sono pochi e riguardano essenzialmente composti di tipo porfirinico. In Tab. 1 sono riportati alcuni far-

Composto	Nome	$\lambda_{\max}$ (nm)	Tipo di tumore
Porfimer sodium	Photofrin	630	polmone, vescica, esofago
Temoporfin	Foscan	652	polmone, collo, testa
Verteporfin	Visudine	688	pelle, pancreas
Talaporfin	Laserphyrin	660	pancreas, fegato
Padeliporfin	Stakel WST11	762	prostata

Tab. 1 - Composti utilizzati in PDT

L'articolo è basato sulla relazione presentata durante il XXVI Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana di Paestum (SA) (10-14 settembre 2017) in occasione del conferimento a Nino Russo della Medaglia d'Oro "A. Avogadro".



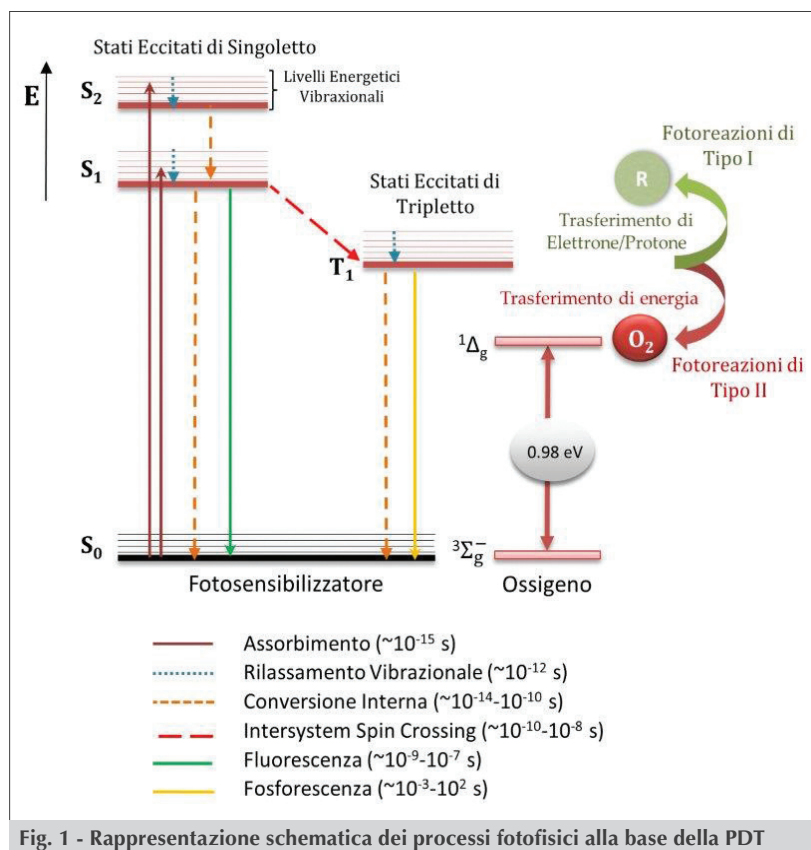
maci attualmente utilizzati nelle terapie anticancro.

Il numero limitato di fotosensibilizzatori approvati in ambito clinico e il crescente interesse per questa tecnica miniminvasiva hanno fortemente stimolato nuove ricerche sia di base che applicative. In questo contesto le scienze chimiche giocano un ruolo fondamentale, grazie anche alla progettazione razionale di nuovi farmaci per la PDT che permette di selezionare quelli che possiedono proprietà chimico-fisiche adatte prima delle fasi di sintesi e caratterizzazione chimica e di test biologici e medici. In particolare, le ricerche più recenti si sono essenzialmente concentrate sull'analisi di nuovi composti non appartenenti alla famiglia delle porfirine e sul miglioramento della loro efficacia terapeutica.

In questo articolo riassumeremo brevemente il contributo che la chimica teorica e computazionale può dare allo sviluppo di nuovi farmaci come fotosensibilizzatori in terapia fotodinamica, sfruttando la nostra esperienza pluriennale in questo campo. Per i dettagli computazionali di ogni molecola riportata rimandiamo ai rispettivi lavori scientifici riportati in bibliografia.

### La Terapia Fotodinamica (PDT)

Il trattamento consiste nell'iniettare nel paziente il fotosensibilizzatore (P) e nell'irradiare, dopo un intervallo di tempo sufficiente a farlo accumulare nel tessuto, con luce di una specifica lunghezza d'onda, la zona interessata. L'intervallo di lunghezze d'onda utili per l'attivazione del fotosensibilizzatore è compreso fra 500 e 850 nm (finestra terapeutica) per essere certi che la radiazione non venga assorbita dai cromofori endogeni presenti nell'organismo ma riesca a penetrare nei tessuti. L'azione fotodinamica (vedi Fig. 1) inizia con l'assorbimento di un fotone che eccita il P dal suo stato elettronico fondamentale  $S_0$  ad uno stato eccitato  $S_1$ . A questo punto lo stato eccitato può decadere in quello fondamentale tramite un processo di fluorescenza oppure popolare uno stato di tripletto  $T_1$  attraverso un processo



non radiativo di "intersystem spin crossing" (ISC). Lo stato  $T_1$ , a sua volta, può decadere nello stato  $S_0$  tramite fosforescenza oppure trasferire l'energia alle molecole di ossigeno presenti nel tessuto portando  $O_2$  dal suo stato fondamentale  $^3\Sigma_g^-$  a quello eccitato  $^1\Delta_g$ . La produzione dell'ossigeno singoletto sarà possibile solo se l'energia del tripletto è sufficiente a far avvenire la transizione  $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g$  dell'ossigeno molecolare (0,98 eV) (fotoreazioni di Tipo II indicati nella Fig. 1). Quest'ultimo è molto reattivo ed è l'agente citotossico usato nella PDT per indurre la necrosi e/o l'apoptosi delle cellule tumorali che presentano livelli normali di ossigeno. Alternativamente, il fotosensibilizzatore nello stato eccitato di tripletto può interagire direttamente con un substrato biologico tramite trasferimento di un elettrone o di un protone, generando radicali (neutri o carichi) che a loro volta possono reagire rapidamente con biomolecole o con molecole di ossigeno (se presente) producendo radicali come il superossido  $O_2^{\cdot-}$ , idrossile  $OH^{\cdot}$  e perossido di idrogeno  $H_2O_2$  (fotoreazioni di Tipo I in Fig. 1). In PDT si preferisce operare con le reazioni

di tipo II poiché l'azione dell'ossigeno singoletto è più mirata e selettiva.

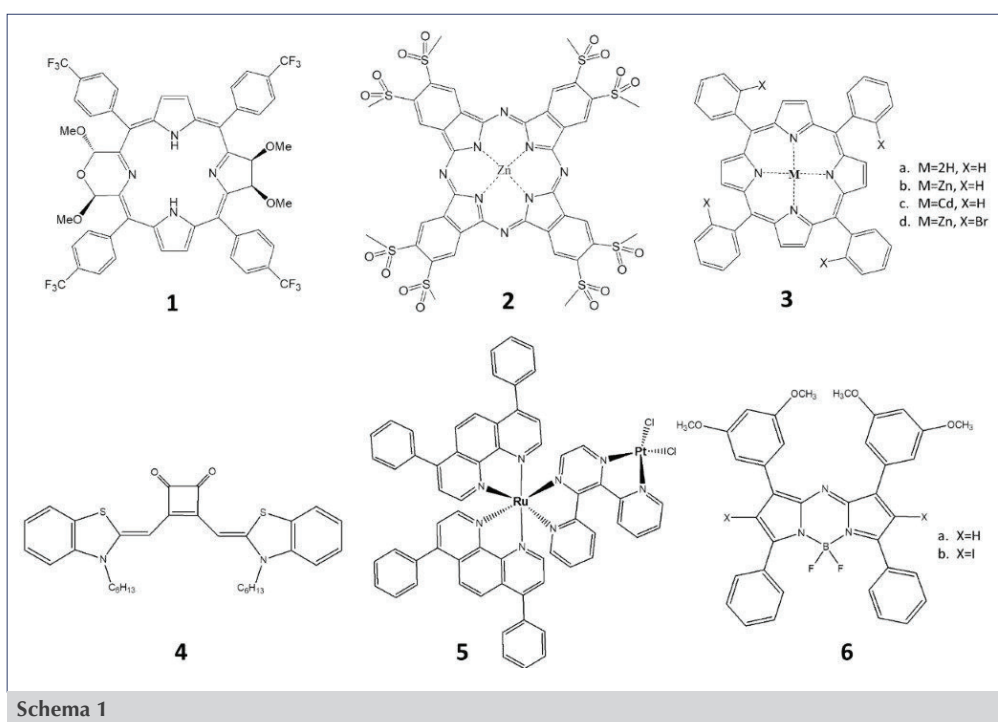
## Risultati e discussione

Dall'analisi dei processi implicati e seguendo le indicazioni bio-mediche [5, 6] si possono individuare le principali proprietà che il potenziale farmaco deve possedere per essere un efficace P in PDT. In particolare, P deve soddisfare i seguenti requisiti: possedere stabilità chimica e solubilità in acqua; non presentare citotossicità prima dell'irradiazione con la luce; avere capacità di accumularsi rapidamente nei tessuti tumorali ed elevata velocità di espulsione dal corpo; essere caratterizzato da un alto coefficiente di assorbimento; assorbire la radiazione in un intervallo di lunghezze d'onda comprese tra 500-850 nm per poter penetrare nei tessuti; avere alta capacità di generare molecole di ossigeno eccitate. La capacità di generare ossigeno singoletto con alte rese dipende dall'efficacia del processo di ISC, la cui cinetica, secondo un'espressione approssimata della regola d'oro di Fermi [7], è definita dalla seguente equazione:

$$K_{isc} = \frac{4\pi^2}{h} |\langle \Psi_{S_n} | \hat{H}_{so} | \Psi_{T_m} \rangle|^2 \cdot FCWD;$$

$$FCWD \propto \left[ -\frac{(\Delta E_{S-T})^2}{4\lambda k_B T} \right]$$

L'efficienza dell'ISC dipende dal valore dell'accoppiamento relativistico spin-orbita  $\langle \Psi_{S_n} | \hat{H}_{so} | \Psi_{T_m} \rangle$  e dalla densità degli stati pesata di Franck-Condon che, nell'ambito della teoria di Marcus-Levich-Jortner, a sua volta dipende dalla differenza di energia tra gli stati di singoletto e tripletto  $\Delta E_{S-T}$  coinvolti nel processo di ISC. Gran parte di queste proprietà possono essere previste e calcolate utilizzando metodi quantomeccanici, in particolare quelli basati sulla teoria del funzionale



della densità [8]. Negli ultimi anni il nostro gruppo ha svolto un intenso lavoro di ricerca in questo campo individuando diverse classi di composti (sia di tipo porfirinico che non) che possiedono i requisiti richiesti per essere proposti come P in PDT [9-18] e dimostrando come la DFT e la sua versione dipendente dal tempo (TDDFT) sia una metodica affidabile per la progettazione razionale di questo tipo di farmaci. Nello Schema 1 sono riportate le strutture di alcune delle molecole studiate, mentre nella Fig. 2 vengono comparati i corrispondenti massimi di assorbimento (banda Q) calcolati e misurati. Come si può notare l'accordo è molto soddisfacente e l'errore è compreso tra 0,1 e 0,2 eV.

Tutti i composti, tranne il 4 ed il 5 presentano lunghezze d'onda di assorbimento che cadono all'interno della finestra terapeutica. Il composto 5 è un complesso di rutenio e platino che può svolgere una doppia azione terapeutica. Infatti la coordinazione attorno al platino include due clori (come nel cisplatino) che possono essere idrolizzati e successivamente interagire con l'azoto della guanina con un meccanismo simile a quello seguito dal cisplatino. La sua lunghezza d'onda di assorbimento (circa 500 nm), sebbene sia inferiore a quella suggerita dalla finestra terapeutica, può svolgere attività fotodinamica agendo sugli strati più superficiali dei



tessuti trattati. Nella Fig. 2 sono anche riportati i valori della differenza di energia tra lo stato fondamentale di singoletto ed il primo stato eccitato di tripletto ( $\Delta E_{S_0-T_1}$ ) che, come accennato precedentemente, è un parametro fondamentale per stabilire se il fotosensibilizzatore è capace di innescare le fotoreazioni di Tipo II. Tutti i composti proposti hanno valori di  $\Delta E_{S_0-T_1}$  superiori a 0,98 eV, l'energia necessaria ad

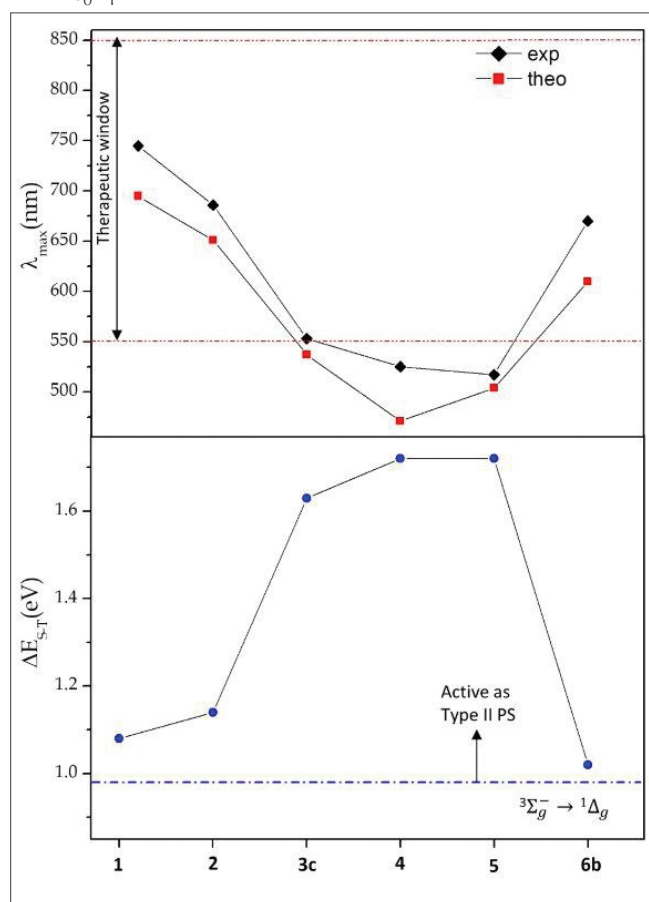


Fig. 2 - Valori calcolati e misurati di  $\lambda_{max}$  e calcolati di  $\Delta E_{S_0-T_1}$ . Per maggiori dettagli vedi [9-16]

	$\langle \Psi_{S_1}   \hat{H}_{so}   \Psi_{T_1} \rangle$	$\Delta E_{S_1-T_1}$
<b>3a</b>	0,09	0,85
<b>3b</b>	0,31	0,68
<b>3c</b>	14,01	0,80
<b>3d</b>	21,59	0,70
<b>6a</b>	0,30	1,18
<b>6b</b>	256,4	0,84

Tab. 2 - Valori di SOC ( $cm^{-1}$ ) e  $\Delta E_{S_1-T_1}$  (eV) tra gli stati eccitati considerati. Per maggiori dettagli vedere [11, 14]

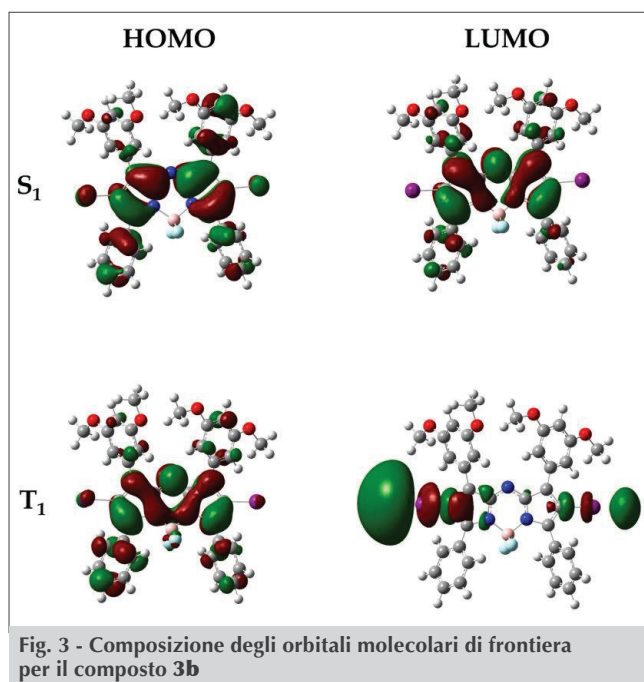


Fig. 3 - Composizione degli orbitali molecolari di frontiera per il composto **3b**

eccitare la molecola di ossigeno dal suo stato fondamentale, inattivo, a quello eccitato, citotossico. Il sistema squarainico (composto **4**) e quelli contenenti metalli pesanti (composti **3c** e **5**) presentano valori di  $\Delta E_{S_0-T_1}$  molto alti. Come precedentemente accennato la produzione di  $O_2^1\Delta_g$  dipende principalmente dai valori di  $\langle \Psi_{S_n} | \hat{H}_{so} | \Psi_{T_m} \rangle$  ma anche da quelli di  $\Delta E_{S_n-T_m}$ . Nella Tab. 2 vengono riportati i valori calcolati per alcuni dei composti esaminati. Si può notare come la tetrafenilporfirina (**3a**) presenti un valore molto piccolo dell'accoppiamento spin-orbita (SOC) considerato e di conseguenza non potrà avere un efficiente ISC. La sua complessazione con lo zinco fa crescere di un ordine di grandezza il valore del SOC ( $0,42 \text{ cm}^{-1}$ ) e rende possibile l'ISC se si considera come valore di riferimento quello del 5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hydroxyphenyl)chlorin (Foscan) (circa  $0,2 \text{ cm}^{-1}$ ) [15], attualmente utilizzato in ambito clinico per il trattamento di alcuni tumori. La presenza di un metallo con peso atomico maggiore come il Cd (**3c**) aumenta considerevolmente il valore del SOC ( $14,09 \text{ cm}^{-1}$ ). Questo fenomeno è conosciuto come "heavy atom effect" [5] e l'aumento del SOC è proporzionale alla quarta potenza del numero atomico ( $Z^4$ ) ed inversamente proporzionale al cubo della media della distribuzione radiale dell'elettrone ( $r^{-3}$ ). Se alla tetrafenilporfirina complessata con lo zinco (**3b**) si sostituisce in posizione *orto* di ciascun fenile

un atomo di bromo (composto **3d** nello Schema 1), il valore dell'accoppiamento spin-orbita aumenta ulteriormente ( $21,59 \text{ cm}^{-1}$ ). L'aumento dei valori di SOC per la presenza di alogeni in una molecola è anche dovuto, come proposto da El-Sayed [19], al cambio della composizione orbitalica degli stati coinvolti nel processo di ISC.

Un ulteriore esempio di come la presenza di un alogeno può determinare consistenti aumenti dei valori delle costanti di accoppiamento spin-orbita è stato verificato per un aza-derivato del 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY), composto **6b** (vedi Tab. 2), nel quale la presenza di due atomi di Iodio (vedi Schema 1) porta il valore del SOC relativo alla transizione  $S_1 \rightarrow T_1$  da  $0,30 \text{ cm}^{-1}$  nel sistema senza alogeni (**6a**) a  $238,80 \text{ cm}^{-1}$ . Il confronto tra le composizioni degli orbitali molecolari coinvolti nelle transizioni spiega bene questo aumento, in accordo con le regole di El-Sayed. Nei composti **3a** e **3b** entrambi gli stati eccitati,  $S_1$  e  $T_1$ , sono generati da una transizione HOMO  $\rightarrow$  LUMO ma, mentre nel primo gli orbitali coinvolti sono tutti di tipo  $\pi$ , nel secondo il LUMO dello stato  $T_1$  assume carattere  $n$  (Fig. 3) per cui la transizione risulta essere  $\pi\pi^* \rightarrow \pi n^*$ .

## Conclusioni

I risultati ottenuti su un gran numero di composti, mostrano che la teoria del funzionale della densità è in grado non solo di riprodurre le proprietà fotofisiche misurate sperimentalmente, ma anche di contribuire al "design" razionale di molecole che possiedono le proprietà richieste per essere proposte come fotosensibilizzatori in terapia fotodinamica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] O. Raab, *Zeitung Biol.*, 1900, **39**, 524.
- [2] N.R. Finsen, *Phototherapy*, Edward Arnold Ed., London, 1901.
- [3] H. von Tappeiner, H. Jesionek, *Munch Med. Wochenschr.*, 1903, **47**, 2042.
- [4] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, *Nature*, 2003, **3**, 380.
- [5] J.M. Dąbrowski, L.G. Arnaut, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 1765.
- [6] C.A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, **96**, 1.
- [7] C.M. Marian, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, 187.
- [8] R.G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, 1989, Oxford University Press, New York.
- [9] G. Mazzone, M.E. Alberto, B.C. De Simone et al., *Molecules*, 2016, **21**, 288.
- [10] M.E. Alberto, B.C. De Simone, G. Mazzone et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 23595.
- [11] B.C. De Simone, G. Mazzone, N. Russo et al., *Molecules*, 2017, **22**, 1093.
- [12] M.E. Alberto, G. Mazzone, A.D. Quartarolo et al., *J. Comput. Chem.*, 2014, **35**, 2107.
- [13] M.E. Alberto, N. Russo, C. Adamo, *Chem. Eur. J.*, 2016, **22**, 9162.
- [14] B.C. De Simone, G. Mazzone, J. Pirillo et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 2530.
- [15] M.E. Alberto, T. Marino, A.D. Quartarolo, N. Russo, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 16167.
- [16] G. Mazzone, A.D. Quartarolo, N. Russo, *Dyes and Pigments*, 2016, **130**, 9.
- [17] G. Mazzone, N. Russo, E. Sicilia, *Can. J. Chem.*, 2013, **91**, 902.
- [18] J. Pirillo, G. Mazzone, N. Russo, L. Bertini, *J. Chem. Inf. Model.*, 2017, **57**, 234.
- [19] M.A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.*, 1968, **1**, 8.

## Density Functional Theory and Photodynamic Therapy: a Promising Marriage

The contribution of theoretical and computational chemistry to understand the elementary mechanisms on which the photodynamic therapy (PDT) is based and to the design of new photosensitizers is briefly described and discussed. In particular, we will show as density functional theory (DFT) is able to reliably reproduce the photophysical parameters significant for PDT with relatively low computational costs allowing the treatment of systems with medium-large molecular size. So, this method can be used to design new photosensitizers to propose for in vitro and in vivo tests.