



Il TRIGA Mark II dell'Università di Pavia

Laura Ciani^a, Silva Bortolussi^{b,c}, Saverio Altieri^{b,c},
Sandra Ristori^{a*}, Cinzia Ferrari^d, Aris Zonta^d,
Piero Baglioni^a, Giacomo Martini^a

^aDipartimento di Chimica & CSGI

Università di Firenze

^bDipartimento di Fisica Nucleare e Teorica

Università di Pavia

^cIstituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN)

Sez. di Pavia

^dDipartimento di Chirurgia Sperimentale

Università di Pavia

*ristori@unifi.it

LA BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY:

RICERCA E APPLICAZIONE CLINICA. PARTE 1

La Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) è una radioterapia sperimentale che si applica in due fasi: arricchimento del tumore con l'isotopo ^{10}B e irraggiamento con neutroni termici. Nella prima parte di questo articolo vengono esposti i principi di base e la storia della BNCT. Sono inoltre descritti i vettori di boro più usati e quelli che offrono maggiori potenzialità di accumulo selettivo. La seconda parte è dedicata agli aspetti biologici e medici della BNCT, con una breve discussione delle prospettive in ambito clinico.

La prima idea di BNCT risale a pochi anni dopo la scoperta del neutrone da parte di Chadwick: nel 1936 Locher propose di utilizzare i neutroni termici per scopi terapeutici. L'idea era di arricchire il tumore con elementi ad alta sezione d'urto di cattura per i neutroni, quali boro, gadolinio o litio e, in seguito, irraggiare il tessuto neoplastico con fasci di neutroni termici [1]. La BNCT si basa quindi sulla possibilità di ottenere alte concentrazioni di ^{10}B nel tumore, utilizzando opportuni trasportatori. Il ^{10}B , un isotopo non radioattivo del boro, ha una sezione d'urto di cattura neutronica molto alta: 3837 b. Irraggiando la parte tumorale arricchita in boro con neutroni di bassa energia, la rea-

zione $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ avviene liberando due particelle altamente ionizzanti, che vengono assorbite all'interno della cellula in cui sono state generate (Fig. 1) [2].

L'attraversamento cellulare da parte delle particelle α e dei nuclei di ^7Li provoca danni non riparabili a strutture sensibili, come il DNA e i mitocondri, causando la morte della cellula stessa. L'idea alla base dell'efficacia terapeutica è ottenere concentrazioni di ^{10}B alte nel tumore e basse nelle cellule sane circostanti, affinché la dose di radiazione assorbita da queste ultime non sia letale. La BNCT può essere una terapia altamente selettiva, perché l'effetto terapeutico e il risparmio delle cellu-

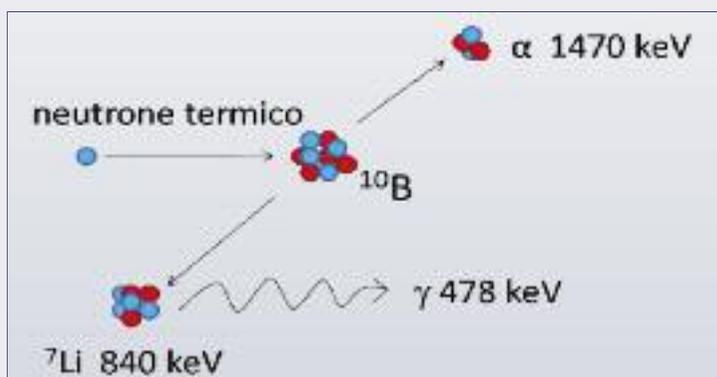


Fig. 1 - Schema della reazione di cattura di un neutrone termico sul ^{10}B . Vengono emesse due particelle ionizzanti in grado di causare danni non riparabili alle cellule

le sane dipendono poco dal fascio di neutroni con cui si irradia la zona, ma dipendono fortemente dalla biodistribuzione della sostanza borurata. Inoltre, se il vettore di boro è riconosciuto specificatamente dalle cellule tumorali, si può irradigare la parte interessata senza che sia necessario conoscere con esattezza numero, forma e distribuzione dei noduli tumorali e delle cellule cancerogene sparse. La selettività e la possibilità di trattare anche noduli tumorali invisibili ai metodi diagnostici oggi disponibili, fanno della BNCT una tecnica promettente per trattare neoplasie considerate incurabili.

La BNCT fu sperimentata per la prima volta negli anni Cinquanta negli USA, presso il Brookhanev National Laboratory (BNL) e il Massachusetts Institute of Technology (MIT), per il trattamento dei gliomi cerebrali. I primi tentativi non ebbero successo a causa della bassa selettività dei vettori di boro usati e perché l'irraggiamento veniva effettuato con neutroni termici, che penetrano poco nei tessuti [3]. Tali problemi furono affrontati e parzialmente risolti negli anni Sessanta, quando un cospicuo numero di pazienti fu trattato in Giappone, utilizzando nuovi composti del boro [4]. Questa fase di applicazione della BNCT fu caratterizzata da risultati clinici ancora poco convincenti, ma diede un grosso impulso alla ricerca. Una terza fase nella storia della BNCT iniziò negli anni Novanta, presso il BNL quando si cominciarono ad usare fasci di neutroni epitermici nel trattamento dei tumori cerebrali. Questi neutroni di energia più alta, si termalizzano nell'attraversare i primi strati di tessuto sano e il cranio, arrivando al tumore con energia e flusso appropriati per innescare la fissione dei nuclei di ^{10}B [5, 6]. In quegli anni si introdusse l'uso del complesso borofenilalanina-fruttosio, che permette di ottenere rapporti più alti di concentrazione tra tumore e tessuto sano. Contemporaneamente iniziarono nuove sperimentazioni al MIT per il trattamento BNCT del melanoma cutaneo e dei gliomi o melanomi intra-cranici [7, 8]. In Europa nascevano analoghi pro-

grammi di ricerca per i tumori cerebrali in Olanda, Svezia e Finlandia [9-11]. Più recentemente è stato aperto un progetto pilota per il trattamento del melanoma cutaneo in Argentina [12].

In Italia la BNCT è stata studiata e applicata per la prima volta presso l'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) e l'Università di Pavia negli anni Ottanta, per curare organi affetti da metastasi diffuse e inoperabili. In particolare è stata messa a punto una tecnica chirurgica con autotrapianto del fegato, che prevede l'irraggiamento dell'organo espianato dal paziente nella colonna termica del reattore nucleare TRIGA Mark II dell'Università di Pavia. Dopo l'irraggiamento il fegato viene re-impianato nel paziente [13, 14]. Questa esperienza ha portato all'applicazione clinica su due pazienti con regressione totale del tumore nell'organo ed ha acceso l'interesse di molti gruppi di ricerca per i diversi aspetti connessi alla BNCT che, essendo una terapia fortemente multidisciplinare, richiede la partecipazione di fisici, chimici, biologi e medici.

I paragrafi seguenti sono dedicati all'attività di ricerca nei vari campi della BNCT. Per motivi di spazio non è stato possibile fare riferimento a tutte le realtà presenti in ambito nazionale e internazionale, ma si è voluto dare alcuni esempi di risultati ottenuti in ciascun ambito da alcuni gruppi di ricerca che lavorano in Italia.

Sorgenti neutroniche

Uno degli aspetti fondamentali della BNCT è la necessità di una fonte di neutroni con energia adatta e di sufficiente intensità. Attualmente, le uniche sorgenti disponibili sono quelle dei reattori nucleari di ricerca, che sono in grado di fornire flussi sufficientemente elevati da permettere un irraggiamento di durata ragionevole, confrontabile con quelli della radioterapia convenzionale. In Italia ci sono 3 reattori che sono stati utilizzati per la BNCT: il TRIGA Mark II dell'Università di Pavia, il TRIGA e il TAPIRO dell'ENEA presso la Casaccia, Roma. Attualmente solo il primo è attivamente usato per la ricerca in BNCT (Fig. 2).

Lo studio della sorgente neutronica e dei dispositivi per l'irraggiamento da costruire all'interno del reattore dipende strettamente dal tipo di applicazione che si vuole realizzare. Infatti, a seconda che il tumore da trattare sia superficiale o interno, si deve decidere se utilizzare fasci di

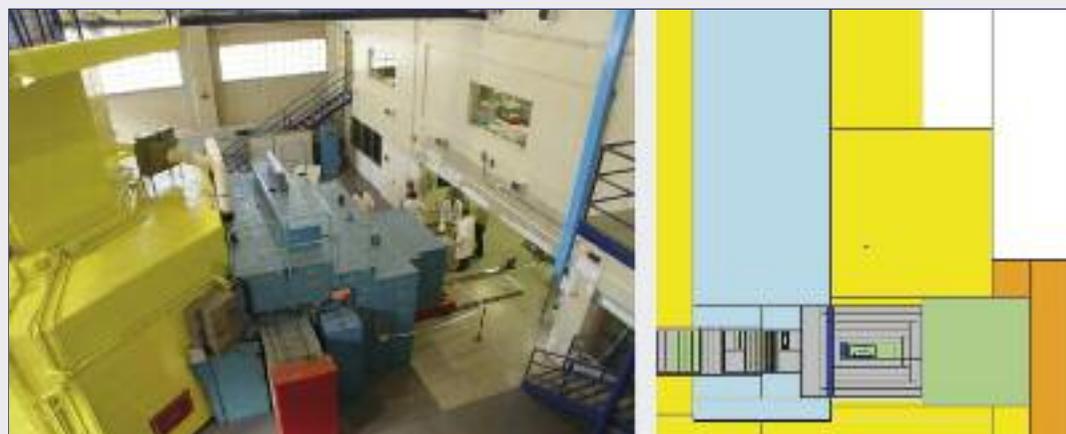


Fig. 2 - Il reattore di ricerca TRIGA Mark II dell'Università di Pavia. A sinistra: foto della colonna termica, dove è stato costruito il dispositivo per l'irraggiamento di organi espianati; a destra: simulazione del reattore, in cui è visibile il nocciolo e la colonna termica di grafite attrezzata per la BNCT

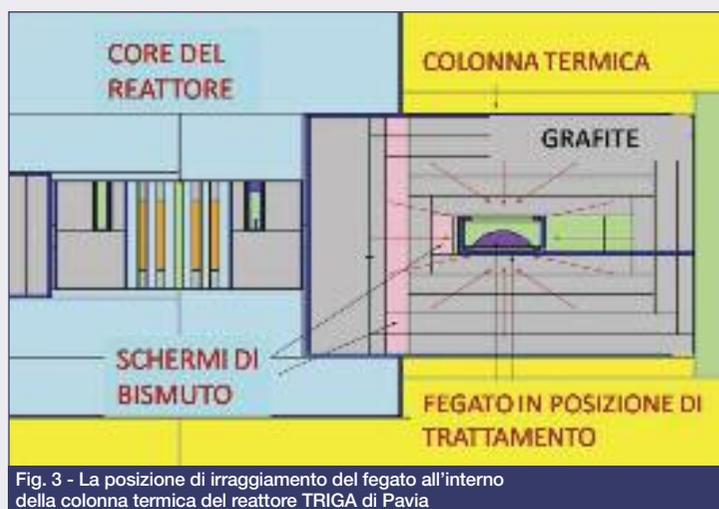


Fig. 3 - La posizione di irraggiamento del fegato all'interno della colonna termica del reattore TRIGA di Pavia

neutroni esterni o effettuare l'autotrapianto. Ad oggi, il reattore TRIGA di Pavia, presenta un canale d'aria nella colonna termica, dove si crea un campo di neutroni termici con cui irraggiare un organo espantato (Fig. 3). All'interno di tale campo, l'organo va irraggiato con un flusso il più uniforme possibile, in modo da trarre il massimo vantaggio dal rapporto di concentrazione del boro tra tessuto tumorale e sano. Infatti, con un flusso uniforme all'interno dell'organo la dose di radiazione assorbita dal tessuto normale è la stessa in tutti i punti e non si corre il rischio di danno letale alle parti sane. La facility di Pavia ha un canale lungo 1 m, con sezione rettangolare di 40x20 cm².

Calcoli Monte Carlo sono stati effettuati per cercare una configurazione della grafite attorno alla posizione di irraggiamento atta a garantire una migliore omogeneità della dose assorbita dall'organo [15]. Allo stesso modo, al TRIGA di Casaccia, sono in corso calcoli per trovare la configurazione più adatta della colonna termica per applicazioni di BNCT a organi espantati [16]. Il reattore TAPIRO è stato utilizzato per studi di BNCT applicata ai tumori cerebrali ed è stata costruita una facility epitermica [17]. Più recentemente è stato usato per esperimenti di radiobiologia utilizzando una colonna termica realizzata in collaborazione con l'INFN di Legnaro [18].

I reattori nucleari offrono flussi elevati di neutroni ma hanno lo svantaggio di essere poco facilmente reperibili sul territorio, non impiegabili all'interno degli ospedali e piuttosto difficili da far accettare a livello psicologico alla popolazione come apparecchiature mediche per il trattamento di tumori. Un'altra strada percorribile è quella di ottenere fasci di neutroni da acceleratori di particelle. Nel mondo questo ramo della ricerca è ampiamente perseguito e in alcuni casi si è dimostrato che i flussi necessari per la terapia sono ottenibili con macchine dedicate. In Italia la ricerca sugli acceleratori per BNCT si divide in due indirizzi: l'ottenimento di un fascio di neutroni da un acceleratore di protoni ad alta intensità costruito presso i Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN (progetto SPES) [19] e la possibilità di ottenere fasci di neutroni dagli acceleratori di elettroni installati presso gli ospedali per la radioterapia convenzionale (progetto PHONES) [20]. Il primo prevede di ottenere neutroni attraverso le reazioni ${}^9\text{Be}(p,xn)$ utilizzando il fascio di protoni a

5 MeV e 30 mA che incidono su un bersaglio spesso di berillio. Lo spettro di neutroni risultante dev'essere termalizzato con un dispositivo appositamente disegnato e abbastanza flessibile da poter modulare lo spettro a seconda dei diversi tumori che si possono trattare. Ad esempio, per melanomi cutanei superficiali è necessario uno spettro prevalentemente termico, per i tumori polmonari invece bisogna ottenere un fascio epitermico. Il secondo progetto parte invece dal presupposto che sarebbe utile poter usare acceleratori già presenti negli ospedali come sorgenti neutroniche. In particolare si sfrutta la risonanza gigante per produrre neutroni in un convertitore su cui incide il fascio di fotoni dall'acceleratore. Il convertitore è modellato per massimizzare la resa dei neutroni e per termalizzarli allo scopo di ottenere un flusso adatto alla BNCT. Attualmente studi sono in corso presso l'acceleratore Elekta PRECISE da 25 MV all'ospedale Le Molinette di Torino. Finora sono stati ottenuti flussi neutronici sufficienti a condurre misure di concentrazione di boro in campioni biologici; la ricerca continua per individuare il sistema acceleratore-convertitore che dia flussi sufficientemente elevati per trattare pazienti.

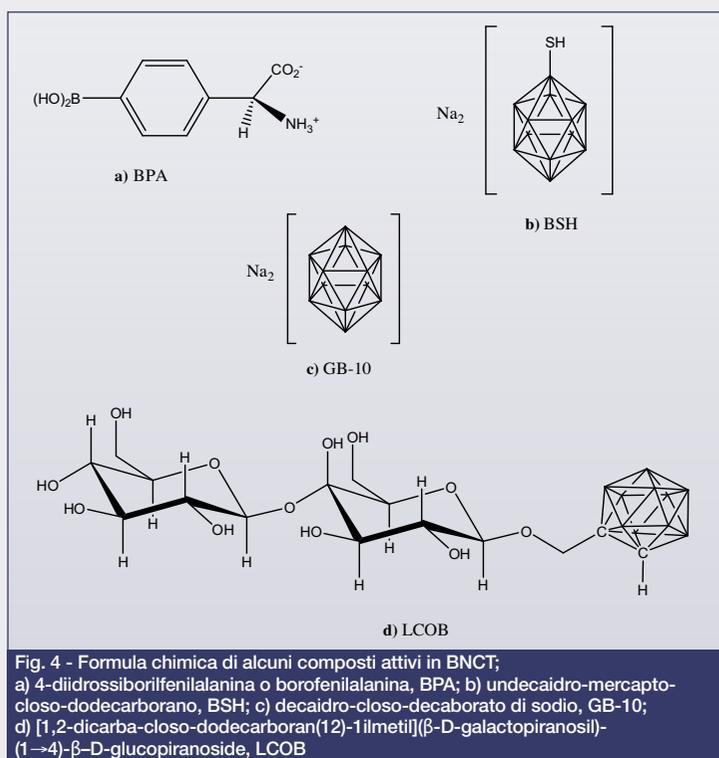
Una terza possibilità per le sorgenti neutroniche è rappresentata da reattori a fusione d-d compatti, di cui un esemplare è presente presso l'ospedale Le Molinette a Torino. Anche in questo caso i flussi ottenuti non sono attualmente sufficienti per la terapia, ma studi Monte Carlo hanno permesso di individuare modifiche per migliorare le prestazioni in vista di un possibile utilizzo clinico [21].

Come veicolare il boro in BNCT

Composti borurati

Si è fatta in passato la classificazione dei borocomposti come farmaci di prima, seconda o terza generazione. Benché il termine *farmaco* non sia del tutto appropriato per le terapie binarie, tuttavia in BNCT esso rende correttamente l'idea che si tratti di un componente essenziale per la cura delle neoplasie, e come tale abbiamo deciso di usarlo in questo contesto. Neppure la classificazione in termini di *generazione* deve essere intesa come categoria temporale rigidamente definita, in quanto è possibile che composti considerati sorpassati vengano ritenuti nuovamente validi per applicazioni in BNCT se trasportati con un diverso vettore o somministrati secondo una nuova procedura.

Una prima classificazione dei composti attivi in BNCT, estremamente chiara e esaustiva, venne fatta alla fine degli anni Novanta da un gruppo di scienziati della Ohio State University [22]. Questi autori annoverano tra i farmaci di prima generazione il borace ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), il pentaborato ($\text{NaB}_5\text{O}_8 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), l'acido borico (H_3BO_3) e i suoi derivati. Si tratta di composti facilmente reperibili e chimicamente stabili, ma di per sé non sufficientemente selettivi verso le cellule o i tessuti tumorali. In seguito, vennero sintetizzati due composti, detti di seconda generazione, la borofenilalanina (BPA) e il borosodiocaptato (BSH), che consentirono di migliorare la selettività, ottenendo valori di localizzazione del boro nel tessuto tumorale 3-5 volte maggiori che nel corrispondente tessuto sano. Questi due composti, la cui formula di struttura è riportata in Fig. 4 (4a e 4b, rispettivamente), sono ad oggi gli unici due farmaci appro-



vati dagli organismi internazionali competenti (FDA, USA e EMEA, EU) per il trattamento clinico dei tumori mediante BNCT.

La classe dei farmaci di terza generazione è molto più estesa e comprende tutti quei composti per i quali è dimostrata la potenziale attività in BNCT, ma non hanno affrontato le varie fasi di sperimentazione pre-clinica, che consentono di passare all'applicazione su pazienti. Alcuni esempi di questi farmaci sono riportati nella Fig. 4 (4c e 4d). In genere si tratta di composti contenenti un cluster di atomi di boro legato ad altre unità chimiche con specifica funzione per l'accumulo selettivo in cellule tumorali. Riferendosi a queste unità di trasporto attivo verso il tumore, si possono distinguere biomolecole a basso o alto peso molecolare [2, 23]. Per i farmaci di terza generazione è richiesta anche la capacità di accumulare boro specificatamente nel nucleo o in altri organelli sensibili della cellula, quali mitocondri, lisosomi, reticolo endoplasmatico o apparato di Golgi. L'accumulo in compartimenti subcellulari permette infatti di ridurre la dose di farmaco richiesta, affinché il bombardamento con neutroni generi un numero di particelle α e ${}^7\text{Li}$ sufficienti ad uccidere la cellula neoplastica.

Altra caratteristica importante richiesta ai farmaci di terza generazione è un'elevata solubilità in mezzi acquosi, che ne permetta la somministrazione per via sistemica. Inoltre, nel caso dei farmaci da usare contro tumori cerebrali è necessario un certo carattere lipofilo, per poter attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) [2]. Il carattere anfipico deve essere quindi bilanciato e per ottenere questa proprietà si può ricorrere a veicolanti come i liposomi o micelle polimeriche di appropriate dimensioni (<60-70 nm di diametro).

Tra i composti borurati di terza generazione il più semplice è il decaidro-closo-decaborato di sodio (GB-10, Fig. 4c), che è stato già testato su

cavie da laboratorio ed attualmente è considerato per trial clinici. Come accennato in precedenza, diversi composti per BNCT presentano uno o più gruppi funzionali potenzialmente selettivi verso le cellule tumorali e molti di questi gruppi funzionali appartengono alla categoria dei precursori metabolici come amminoacidi, dipeptidi, basi azotate e loro derivati (nucleotidi o nucleosidi), intercalanti del DNA, porfirine e strutture affini, carboidrati e ormoni steroidei [2].

Un aspetto forse in parte fino ad oggi sottovalutato è l'utilizzo di un approccio multiplo per raggiungere diverse subpopolazioni neoplastiche e/o compartimenti cellulari diversi, impiegando un cocktail di farmaci anche non contenenti boro. Questo approccio permetterebbe anche di impiegare una dose ridotta del singolo farmaco così da diminuire ulteriormente la sua eventuale tossicità intrinseca.

Vettori per farmaci borurati

Aggregati di dimensioni nanoscopiche, quali liposomi e micelle polimeriche, sono attualmente impiegate nelle formulazioni farmaceutiche di numerosi principi attivi. Questi adiuvanti permettono di solubilizzare nei fluidi biologici e trasportare al sito di interesse farmaci o vaccini di per sé troppo idrofobi o labili, diminuendone anche la possibile tossicità. Nel caso della BNCT, i vettori di farmaci presentano come requisito aggiuntivo la capacità di concentrare il boro, che deve arrivare ai tessuti tumorali in quantità elevatissime, ovvero 1-2 ordini di grandezza maggiori rispetto ai farmaci delle terapie convenzionali [23]. Il primo gruppo ad aver proposto l'uso dei liposomi come trasportatori di composti borurati attivi in BNCT è quello del prof. Yanagiè dell'Università di Tokio [24]. Gli studi effettuati da questi scienziati riguardano la formulazione di immunoliposomi per il trasporto di $\text{Cs}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ a cellule di epatoma AH-66. I risultati ottenuti sono positivi, in quanto il sistema progettato e somministrato inibisce la crescita cellulare in vitro e provoca una regressione della massa tumorale in cavie da laboratorio dopo irraggiamento

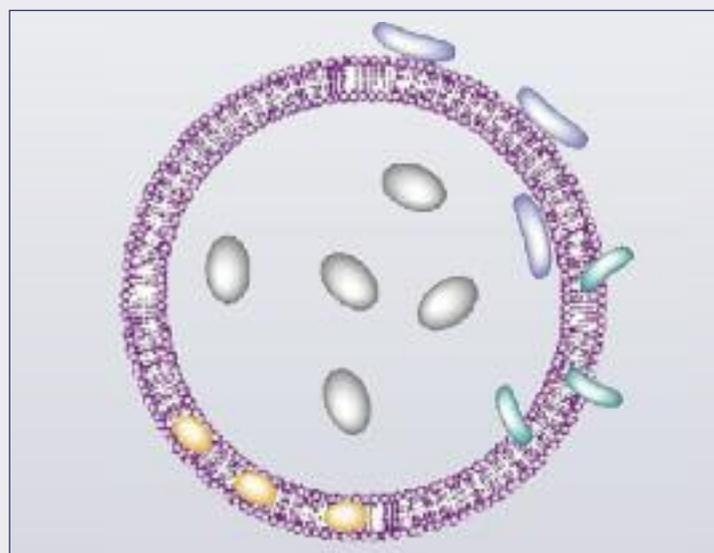


Fig. 5 - Schema delle possibili modalità di inserzione di farmaci in liposomi. I composti più idrofili si localizzano nel core acquoso e vengono trasportati all'interno della struttura, mentre i composti anfipilici o idrofobici interagiscono preferenzialmente con il bistrato fosfolipidico

con neutronici termici. Studi approfonditi sull'uso di liposomi come trasportatori di farmaci contenenti diversi cluster di boro sono stati condotti dal gruppo del prof. Hawthorne dell'University of California, Los Angeles, che ha messo a punto formulazioni contenenti fosfolipidi e colesterolo. In questi sistemi i composti borurati sono inclusi nel bistrato lipidico o nel core acquoso dei liposomi a seconda delle loro caratteristiche idrofobe o idrofile [25, 26], come illustrato in Fig. 5.

Moraes e collaboratori hanno mostrato che incorporando il cloruro di o-carboranil-propilammina in liposomi si riduce la tossicità di questo composto rispetto a cellule sane di linfociti e che l'inclusione dello stesso composto borurato in cellule di glioblastoma multiforme SK-MG-1 aumenta se si usano come trasportatori liposomi monolamellari del diametro medio di 100 nm [27].

Liposomi contenenti polietilenglicole come "gruppo di mascheramento" sono stati impiegati da Metha e collaboratori per veicolare BSH mediante iniezione attraverso la vena caudale a cavie di laboratorio affette da glioblastoma [28]. La strategia del mascheramento è utile per limitare la distruzione dei liposomi ad opera del sistema immunitario, aumentando il tempo di circolazione del farmaco *in vivo*. Tuttavia, occorre ricordare che la presenza di unità polietileniche molto ingombranti può diminuire il tasso di caricamento del composto borurato da parte dei liposomi oppure può inibire il riconoscimento molecolare che determina la selettività verso i tessuti tumorali.

In Italia, sono stati effettuati studi sull'incorporazione in liposomi di composti contenenti gabbie carboraniche legate ad unità glucosidiche [29] o nucleosidiche [30]. Altri studi hanno proposto l'uso di carboporfirazine come farmaci potenzialmente attivi in trattamenti multipli [31] che coincidono, oltre alla BNCT, la terapia fotodinamica e fototermica.

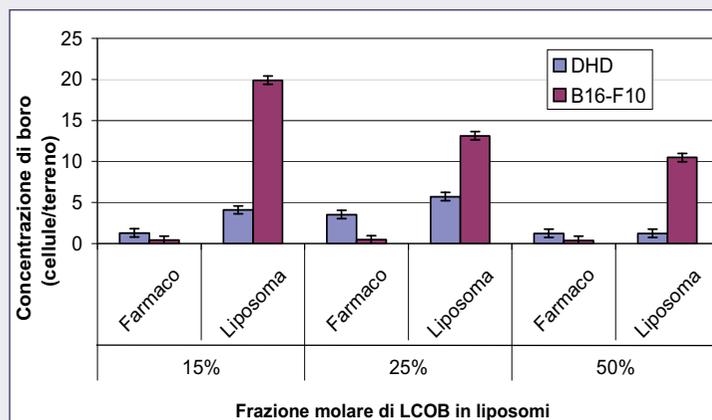


Fig. 6 - Rapporti di concentrazione di ¹⁰B in colture cellulari di carcinoma (DHD) e melanoma (B16-F10) murino rispetto al terreno, ottenute somministrando soluzioni di LCOB (farmaco), oppure usando come vettori liposomi cationici in cui la frazione molare del farmaco è 15%, 25% o 50% rispetto alle molecole di lipide. Da notare che il valore ottenuto con il complesso BPA-fruttosio nelle stesse condizioni sperimentali è 0,2

Questi sistemi hanno mostrato risultati estremamente incoraggianti di accumulo del boro in colture cellulari di glioblastoma e melanoma murino [32], in quanto i liposomi permettono di raggiungere concentrazioni intracellulari 1-2 ordini di grandezza più elevate di quelle ottenibili con il complesso BPA-fruttosio (Fig. 6).

Ringraziamenti: Gli autori ringraziano il prof. A. Becciolini (Dip. Fisiopatologia Clinica, Univ. Firenze), il prof. G. Ricciardi (Dip. Chimica, Univ. Basilicata) e il dott. L. Panza (Dip. Farmacia, Univ. Piemonte Orientale) per il contributo fondamentale dato allo sviluppo del progetto di applicazione della BNCT in ambito nazionale e internazionale.

Bibliografia

- [1] G.L. Locher, *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther.*, 1936, **36**, 1.
- [2] R. Barth *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**, 3987.
- [3] L.E. Farr *et al.*, *Am. J. Roentgenol.*, 1954, **71**, 279.
- [4] Y. Nakagawa and H. Hatanaka, *J. Neuro-Oncol.*, 1997, **33**, 105.
- [5] J.A. Coderre *et al.*, *J. Neuro-Oncol.*, 1997, **33**, 141.
- [6] A.Z. Diaz *et al.*, Proc. Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Osaka, 2000, 13.
- [7] H. Madoc-Jones *et al.*, in *Cancer Neutron Capture Therapy*, Y. Mishima (Ed.), Plenum Press, New York, 1996, 707.
- [8] P. Busse *et al.*, *J. Neuro-Oncol.*, 2003, **62**, 111.
- [9] R.L. Moss, *Basic Life Sci.*, 1990, **54**, 169.
- [10] J. Capala, *et al.*, *J. Neuro-Oncol.*, 2003, **62**, 135.
- [11] H. Joensuu *et al.*, *J. Neuro-Oncol.*, 2003, **62**, 123.
- [12] P.R. Menendez *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S50.
- [13] A. Zonta *et al.*, *J. of Phys. Conf. Series*, 2006, **41**, 484.
- [14] A. Zonta *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S67.
- [15] S. Bortolussi, S. Altieri, *Medical Physics*, 2007, **34**, 4700.
- [16] http://info.casaccia.enea.it/triga/TRIGA/Ita/BNCT_1.htm
- [17] K.W. Burn *et al.*, *Applied Rad and Isotopes/ ICNCT-11*, Elsevier Publisher, Boston 2004, 987.
- [18] J. Esposito *et al.*, *Radiation Protection Dosimetry*, 2007, **126**, 69.
- [19] J. Esposito *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S270.
- [20] R. Bevilacqua *et al.*, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, **572**, 231.
- [21] N. Cerullo *et al.*, *Rev. Sci. Instrum.*, 2002, **73**, 3614.
- [22] A.H. Soloway *et al.*, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1515.
- [23] H. Yanagiè *et al.*, *Expert Opin. Drug Del.*, 2008, **5**, 427.
- [24] H. Yanagiè *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1991, **63**, 522.
- [25] K. Shelly *et al.*, *Proc Natl Acad Sci US*, 1992, **89**, 9039.
- [26] S.C. Mehta *et al.*, *J. Microencapsul.*, 1996, **13**, 269.
- [27] A.M. Moraes *et al.*, *J. Microencapsul.*, 1999, **16**, 647.
- [28] H. Yanagiè *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 2006, **60**, 43.
- [29] S. Morandi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 2004, **53**, 1664.
- [30] S. Rossi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, 2005, **81**, 1712.
- [31] A. Salvati *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 10357.
- [32] S. Altieri *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 7829.