

Фотодинамика и фототерапия: роль фотосенсибилизаторов в лечении рака

Сыченг Тан, § Ян Чжан, § Прават Дхакал, § Лаура Равело,
Шайенн Л. Андерсон, Кевин М. Коллинз и Франциско М.
Раймо*

Лаборатория молекулярной фотоники факультетов биологии и химии Университета Майами,
1301 Memorial Drive, Корал-Гейблс, Флорида 33146-0431

Электронная почта: fraymo@miami.edu

• Экспериментальные процедурыS2

• Хроматограммы и фотокинетический анализ.....S4

• Фотохимические и фотофизические параметры.....S4

• Спектры поглощения и излученияS5

• Флуоресцентные изображения.....S6

§ Внесен поровну

* Соответствующий автор

Экспериментальные процедуры

Материалы и методы. Химикаты были приобретены у коммерческих источников и использованы в том виде, в каком они были получены. CH_2Cl_2 и MeCN перегоняли над CaH_2 . H_2O (18,2 МОм·см) очищали с помощью аналитической системы Barnstead International NANOpure Diamond Analytical. Соединения 5 и 6 получали в соответствии с литературными протоколами. S1, S2 Масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (EISMS) проводили на спектрометре Bruker micrOTOF-Q II. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) записывали на спектрометре Bruker Avance 400. Спектры поглощения записывали на спектрометре Varian Cary 100 Bio в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,0 см. Эмиссионные спектры записывали на спектрометре Varian Cary Eclipse в азированных растворах. Квантовые выходы флуоресценции определяли в отношении растворов в EtOH либо ацетатной соли крезил фиолетового ($\phi_F = 0,54$), либо перхлоратной соли оксазина 1 ($\phi_F = 0,15$) в соответствии с литературным протоколом. S3

Фотолиз проводили в азированных растворах на фотореакторе Luzchem Research LZC-4V, работающем при длине волны 350 нм (4,2 мВт/см²). Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на колонке Agilent Microsorb 100-5 BDS (4,6 × 250 мм), работающей с системой Shimadzu Nexera X2 в MeCN/H₂O (9:1, по объему) при скорости потока 1,0 мл/мин и длина волны обнаружения 275 нм. Легированные полимерные пленки были приготовлены методом центрифугирования растворов полиметилметакрилата (ПММА, 120 кДа, 20 мг/мл) и 1 (50 мкг/мл) в CH_2Cl_2 с помощью центрифугирующего устройства Chemat Technologies KW-4A при 1200 об/мин для 60 с на покровных стеклах. Шарики легированного полимера готовили путем прикапывания аликвот (1,0 мл) тетрагидрофурановых (ТГФ) растворов полиуретана (ПС, 44 кДа, 1,0 мг/мл) и 1, 2 или 3 (50 мкг/мл) в H₂O/EtOH. (6:1, об/об, 5,0 мл). Полученные дисперсии выдерживали при температуре окружающей среды в течение 3 часов в открытом флаконе и использовали непосредственно для фотолиза и спектроскопических экспериментов. Аликвоты (10 мкл) дисперсий переносили на покровные стекла, сушили в печи при 120 °C в течение 2 минут и визуализировали. Изображения флуоресценции записывали с помощью конфокального лазерно-сканирующего микроскопа Leica SP5.

Химический синтез 1 и 2. Раствор 3 (200 мг, 0,32 ммоль) и 6 (298 мг, 1,3 ммоль) в MeCN (30 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 12 часов. Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток очищали колоночной хроматографией [SiO₂, гексаны/AcOEt (95:5 90:10, по объему)] с получением 1 (30 мг, 10%) в виде розового твердого вещества. и 2 (20 мг, 1

8%) в виде фиолетового твердого вещества. 1: ESIMS: $m/z = 923,3530$ [$M + H$]⁺ (m/z рассчитано для C₅₄H₄₆BF₂N₆O₆ = 923,3540); Н ЯМР (CD₃Cl): $\delta = 7,75$ (1H, д, 8 Гц), 7,64 (1H, д, 8 Гц), 7,44 (2H, д, 16 Гц), 7,37–7,29 (5H, м), 7,26–7,23 (1H, м), 7,21–7,07 (6H, м), 6,90 (2H, т, 7 Гц), 6,82–6,73 (4H, м), 6,69 (2H, д, 8 Гц), 6,64–6,56 (2H, м), 5,14 (2H, д, 19 Гц), 4,84 (2H, д, 19 Гц), 2,46 (3H, с), 1,64 (6H, с), 1,26 (6H, с); ЯМР ¹³C [(CD₃)₂CO]: $\delta = 154,73, 152,94, 147,30, 146,84, 140,77, 137,90, 135,96, 132,51, 131,04, 130,32, 129,13, 127,78, 127,41, 123,85, 123,76, 122,31, 120,64, 117,71, 117,52, 116,89, 108,76, 101,48, 101,35, 50,49, 39,87, 34,67, 31,58, 29,06, 26,37, 25,28, 22,64, 21,40, 20,69, 18,77, 14,10, 11,41$. 2: ESIMS: $m/z = 772,3288$ [$M + H$]⁺ (m/z рассчитано для C₄₇H₄₁BF₂N₅O₃ = 772,3271); Н ЯМР (CD₃CN): $\delta = 8,14$ (1H, д, 16 Гц), 7,69 (2H, дд, 1 и 8 Гц), 7,50 (4H, т, 7 Гц), 7,46–7,36 (6H, м), 7,32 (1H, дд, 1 и 7 Гц), 7,28 (1H, дд, 1 и 8 Гц), 7,25–7,21 (2H, м), 7,12 (1H, тд, 1 и 8 Гц), 7,08 (1H, д, 5 Гц), 6,97 (2H, т, 5 Гц), 6,89 (1H, тд, 1 и 8 Гц), 6,80 (1H, д, 8 Гц), 5,10 (1H, д, 19 Гц), 4,87 (1H, д, 19 Гц), 2,47 (3H, с), 1,62 (3H, с), 1,50 (6H, д, 3 Гц), 1,25 (3H, с).

Химический синтез 3. Раствор 5 (500 мг, 1,7 ммоль), 2,3,3-триметил-3H-индола (1,08 мг, 6,8 ммоль) и трифторуксусной кислоты (ТФУ, 50 мкл, 0,7 ммоль) в EtOH (30 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 12 часов. После охлаждения до температуры окружающей среды растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток растворяли в AcOEt (50 мл) и промывали водным раствором HCl (1 M, 3 × 50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 (30 мл) и полученный раствор дегазировали Ar.

Добавляли 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ, 454 мг, 2,0 ммоль) и раствор перемешивали при температуре окружающей среды в атмосфере Ar в течение 30 минут. После последовательного добавления Et₃N (3 мл, 21,5 ммоль) и BF₃·Et₂O (3 мл, 23,4 ммоль) ммоль), смесь перемешивали еще 3 часа в тех же условиях и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3 × 30 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией [SiO₂, гексаны/AcOEt (95:5 70:30, по объему)] с получением 3 (120 г

мг, 11%) в виде темно-зеленого твердого вещества. ESIMS: $m/z = 621,3021$ [$M + H$]⁺ (m/z рассчитано для C₄₀H₃₆BF₂N₄ = 621,3001); Н ЯМР

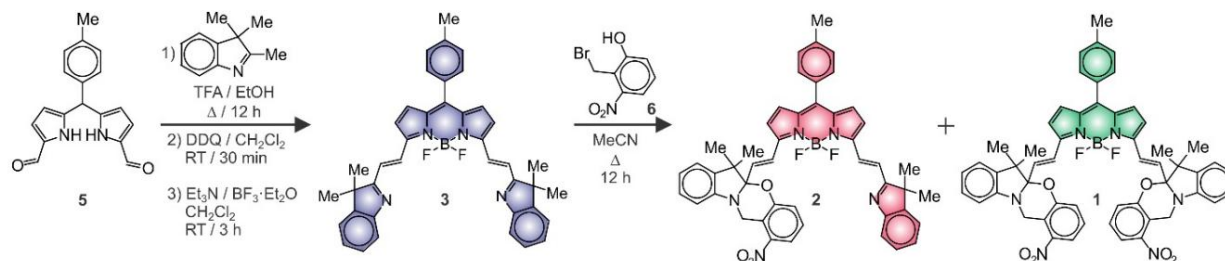


Рисунок S1. Синтез 1–3.

[(CD3)2CO]: δ = 8,41 (2H, д, 16 Гц), 7,67–7,58 (6H, м), 7,53–7,47 (3H, м), 7,46 (3H, д, 5 Гц), 7,42–7,37 (2H, м), 7,31 (2H, т, 7 Гц), 7,07 (2H, д, 4 Гц), 2,50 (3H, с), 1,53 (12H, с); ЯМР ¹³C [(CD3)2CO]: δ = 182.37, 154.43, 153.68, 147.23, 140.96, 137.30, 130.96, 130.68, 130.58, 129.29, 127.88, 127.48, 126.95, 126.37, 121.43, 121.20, 118.35, 52.66, 48.44, 39.30, 22.66, 20.58.

Фотохимический синтез 2 и 3. Раствор 1 (10 мкМ) в MeCN выдерживали в камере фотореактора при 25 °C и облучали при 350 нм (4,2 мВт /см²) в течение 30 мин. Реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ [Agilent Microsorb 100-5 BDS (4,6 × 250 мм), MeCN/H₂O (9:1, об/об), 1,0 мл мин⁻¹] с получением 2 (5%) и 3 (14%).

Фотокинетические исследования. Две последовательные фотохимические реакции (рис. 1) ответственны за превращение 1 в 2. 3. Изменение молярной концентрации 2 ([2]) со временем облучения (t) связано с квантовыми выходами первой (φA1) и второй (φA2) фотохимических стадий, а также числа фотонов, на единицу площади и времени, поглощаемые 1 (I1) и 2 (I2) при λAc (350 нм), согласно уравнению (1).S4

$$\frac{[1]}{[1]_0} = \phi A_1 - \phi A_2 \quad (1)$$

При достаточно низких концентрациях (<10 мкМ) оптическая плотность при λAc меньше 0,1 и существенно не меняется при фотохимическом превращении. В этих условиях I1 и I2 могут быть связаны с числом падающих фотонов (I0) на единицу площади и в единицу времени, молярными коэффициентами поглощения 1 (ε1) и 2 (ε2) при λAc, молярной концентрацией 1 ([1]), [2] и длину (d) оптического пути с уравнениями (2) и (3) соответственно. ^{C5} Кроме того, любые эффекты внутреннего фильтра, связанные с возможным коабсорбцией фотопродуктов при λAc, становятся незначительными.S5

$$I = I_0 e^{-[1] d} \quad (2)$$

$$I = I_0 e^{-[2] d} \quad (3)$$

Уравнения (1), (2) и (3) можно объединить и проинтегрировать, чтобы получить уравнение (4), где [1]₀ — начальная молярная концентрация из 1. S6.

$$[1] = \frac{[1]_0 \phi A_1 \epsilon_1}{\phi A_1 \epsilon_1 - \phi A_2 \epsilon_2} \left[1 - e^{-\phi A_1 \epsilon_1 [1]_0 t} - e^{-\phi A_2 \epsilon_2 [1]_0 t} \right] \quad (4)$$

Следы ВЭЖХ (рис. S2), собранные во время фотолитической трансформации, дали оценки [2] при увеличении t (а на рис. S3). I0 определяли с помощью актинометра с ферриоксалатом калия в соответствии с установленной процедурой. S7 ε1 и ε2 оценивали по соответствующим спектрам поглощения (рисунки S4 и S5), а d было унитарным. Подгонка (b на рисунке S3) уравнения (4) к графику [2] в зависимости от t показала, что значения φA1 и φA2 составляют 0,001 и 0,003 соответственно (таблица S1). Коэффициент детерминации (COD) для фитинга составил 0,99.

Нематодная визуализация. Штамм S8 *Caenorhabditis* (C.) *elegans* KG1180 lite-1(ce314) выращивали при 20 °C на чашках со стандартной средой для выращивания нематод (NGM), засеянными бактериями *Escherichia coli* OP50, и использовали для экспериментов по визуализации, как описано. (ранее 100. S9S11 Дисперсия гранул PS (0,02 мг /мл), легированных 1 (5% по весу), в стерильном фосфатном буферном растворе мкл) наносили по каплям на стандартный засеянный планшет NGM. Взрослые гермафродиты соответствующего возраста (около 24 часов после личиночной стадии L4) были перенесены на планшет и инкубированы при 20 °C в течение 2–5 часов, чтобы обеспечить поглощение гранул. Нематоды переносили в каплю (~3 мкл) H₂O -раствора мусцимола (10 мМ), нанесенную на 3%-ную агарозную подушечку, приготовленную на предметном стекле. После паралича червей накрывали покровным стеклом, переносили на предметный столик конфокального лазерно-сканирующего микроскопа и визуализировали. Мусцимол позволял удерживать флуоресцентные шарики в просвете кишечника во время долговременной визуализации. В конце эксперимента покровное стекло удаляли и червей переносили обратно в чашки с засеянным NGM, чтобы отменить блок мусцимола и подтвердить жизнеспособность животных.

S1 Мадху, С.; Рао, М.; Шейх, М.; Равикант, М. Неорг. хим. 2011, 50, 4392–4400.

S2 Чжан Ю.; Свамианатан, С.; Тан, С.; Гарсия-Аморос, Дж.; Булина, М.; Капитан, Б.; Бейкер, доктор медицинских наук; Раймо, FM J. Am. Chem. Soc. , 2015, 137, 4709–4719.

S3 Вюрт, К.; Граболь, М.; Паули, Дж.; Шпилес, М.; Реш-Генгер, U. Nat. Протоколы 2013, 8, 1535–1550.

S4 Маузер, Х.; Гаулици, Г. Фотокинетика: теоретические основы и приложения; Эльзевир: Амстердам, 1998.

S5 Шарма, А.; Шульман, С.Г. Введение в флуоресцентную спектроскопию; Wiley-Interscience: Нью-Йорк, 1999.

S6 Коннорс, КС Химическая кинетика: исследование скоростей реакций в растворе; Вили-ВЧ: Нью-Йорк, 1990.

S7 Скайано, JC Справочник по органической фотохимии; CRC Press: Бока-Ратон, 1989.

S8 Эдвардс, С.Л., Чарли, Н.К., Милфорт, МС, Браун, Б.С., Гравлин, CN, Кнехт, JE; Миллер, КГ ПЛОС Биол. 2008, 6, 1715–1729.

S9 Тапалия, скорая помощь; Чжан, Ю.; Дакал, П.; Браун, А.С.; Уилсон, Дж. Н.; Коллинз, КМ; Раймо, FM Bioconjugate Chem. 2017, 28, 1519–1528.

S10 Коллинз, КМ; Коэлле, г-н Дж. Нейроски. 2013, 33, 761–775.

S11 Ким, Э.; Сан, Л.; Габель, резюме; Фан-Йен, С. PLOS ONE 2013, 8, e53419.

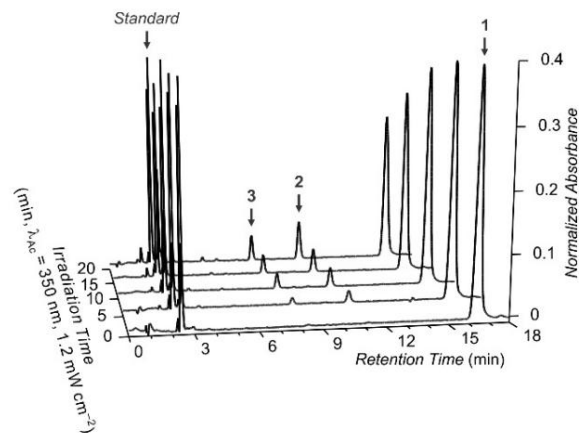


Рисунок S2. Хроматограммы, записанные до и после облучения раствором MeCN 1 (10 мкМ) при 25 °С.

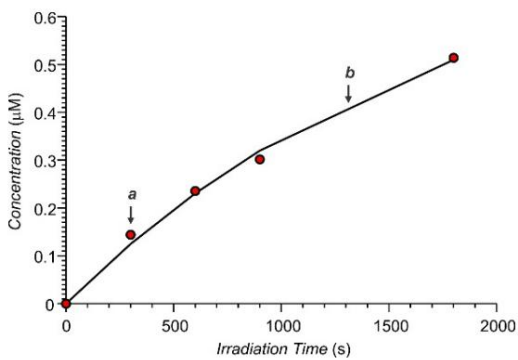


Рисунок S3. График (a) зависимости концентрации 2 от времени облучения, извлеченный из кривых ВЭЖХ на рисунке S2, с соответствующей подгонкой (b) к уравнению (4).

Таблица S1. Длины волн поглощения (λ_{Ab}) и излучения (λ_{Em}), молярный коэффициент поглощения (ϵ), квантовый выход флуоресценции (ϕ_F), яркость ($\epsilon \times \phi_F$) и квантовый выход активации (ϕ_A) 1–3 в азиррованном MeCN при 25 °С [а].

	λ_{Ab} (нм)	λ_{Em} (нм)	ϵ (мм–1 см–1)	ϕ_F (10–2)	$\epsilon \times \phi_F$ (мм–1 см–1)	ϕ_A (10–3)
1	574	587	95,1	1	1	1
2	619	628	69,5	4	3	3
3	663	673	84,5	16	14	—

[a] Значения ϕ_F определяли относительно растворов в EtOH либо ацетатной соли крезилового фиолетового ($\phi_F = 0,54$), либо перхлоратной соли оксаина 1 ($\phi_F = 0,15$). Значения ϕ_A определяли по актинометру с ферриоксалатом калия по временной эволюции концентрации 2 во время фотолиза (рис. S2).

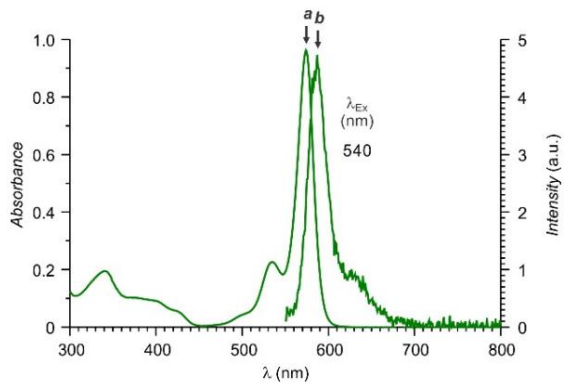


Рисунок S4. Спектры поглощения (а) и эмиссии (б) 1 (10 мкМ) в MeCN при 25 °С.

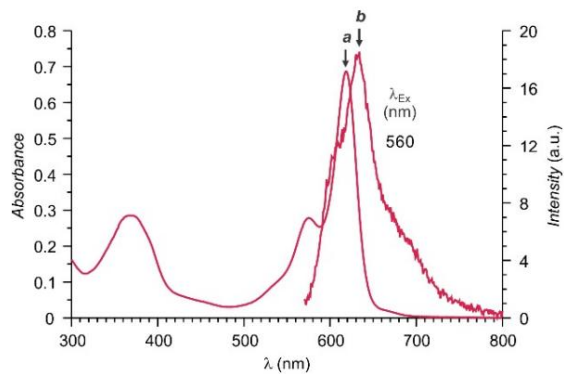


Рисунок S5. Спектры поглощения (а) и эмиссии (б) соединения 2 (10 мкМ) в MeCN при 25 °С.

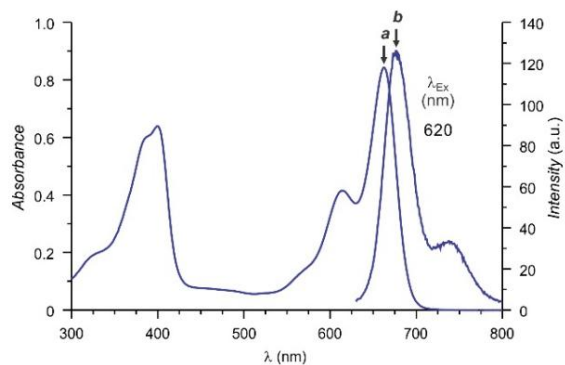
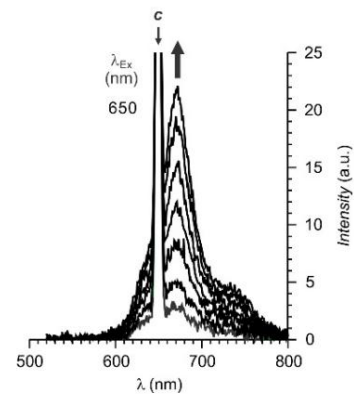


Рисунок S6. Спектры поглощения (а) и эмиссии (б) соединения 3 (10 мкМ) в MeCN при 25 °С.

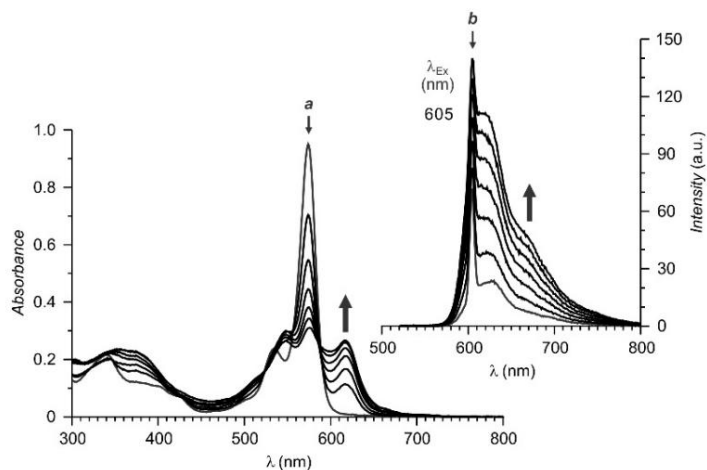
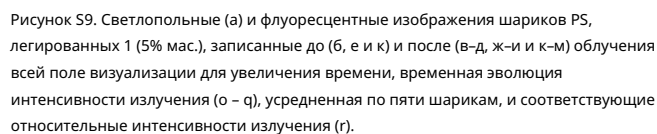
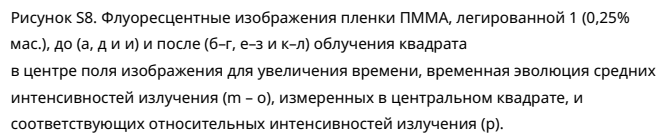


Рисунок S7. Спектры поглощения (а) и испускания (б и в) записаны до и во время фотолиза ($\lambda_{Ac} = 350$ нм, 4,2 мВт/см²) раствора MeCN 1 (10 мкМ) в течение 30 мин при 25 °С.



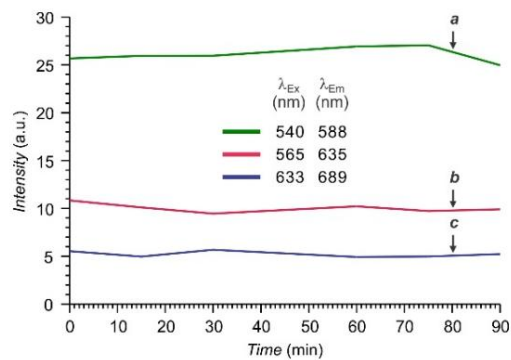


Рисунок S10. Временная зависимость интенсивностей эмиссии гранул ПС, легированных 1 (а), 2 (б) и 3 (в), в H₂O при 25 °С.

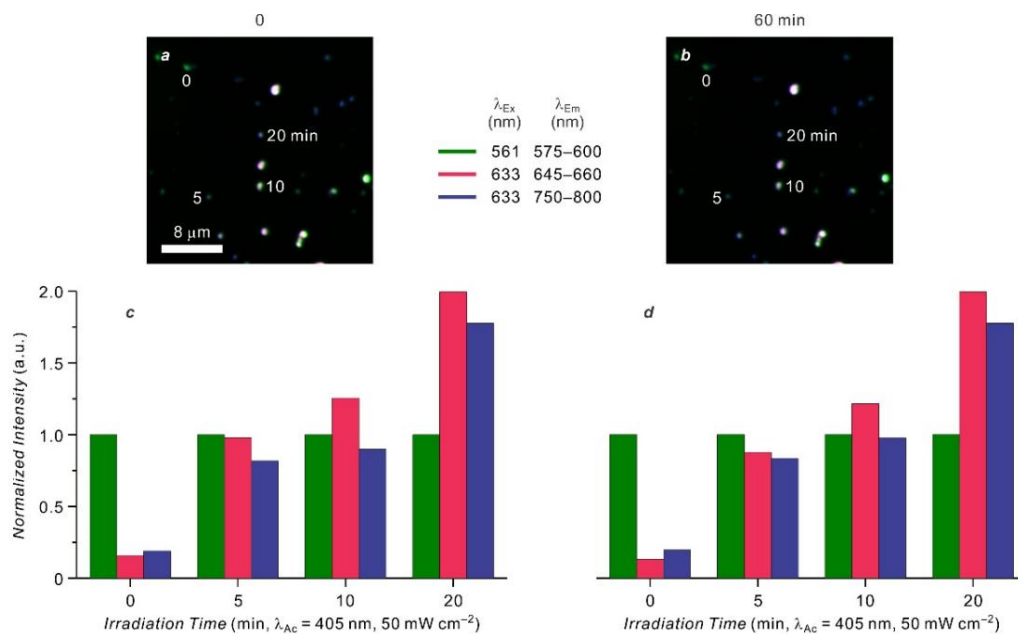


Рисунок S11. Перекрывание трех каналов флуоресценции (а и б) и соответствующие относительные интенсивности излучения (в и г) шариков PS, легированных 1 (5% мас.), зарегистрированных после облучения отдельных шариков в разное время перед (а и в) и после (б и г) хранения в течение 60 мин.

Веб-зачарованный объект

Видео С1. Последовательность флуоресцентных изображений (456×489 мкм², $\lambda_{\text{Ex}} = 561$ нм, $\lambda_{\text{Em}} = 575\text{--}600$ нм) *C. elegans*, меченных шариками PS, легированных 1 (5% мас.), записанных с временем кадра 470 PC.

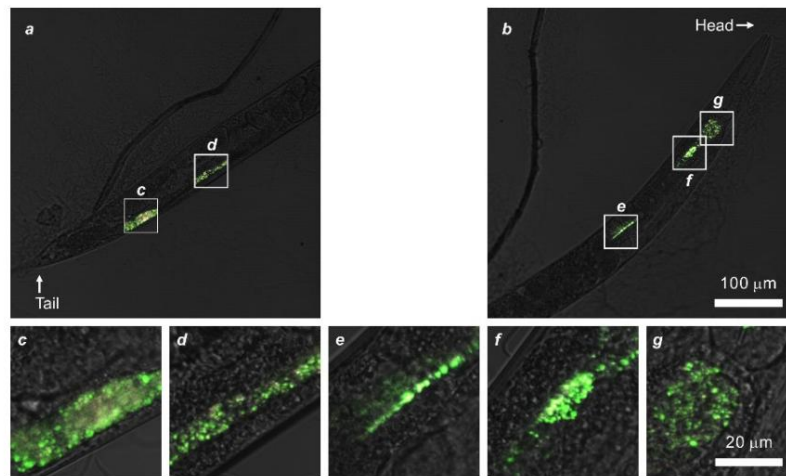


Рисунок S12. Наложение (а и б) светловольных изображений и трех каналов флуоресценции. (зеленый: $\lambda_{\text{Ex}} = 561$ нм, $\lambda_{\text{Em}} = 575\text{--}600$ нм; красный: $\lambda_{\text{Ex}} = 633$ нм, $\lambda_{\text{Em}} = 645\text{--}660$ нм; синий: $\lambda_{\text{Ex}} = 633$ нм, $\lambda_{\text{Em}} = 750\text{--}800$ нм) *C. elegans*, меченного шариками PS, легированного 1 (5% мас.), и увеличения (с-г) выбранных областей.

Веб-зачарованный объект

Видео С2. Последовательность флуоресцентных изображений (194×194 мкм², $\lambda_{\text{Ex}} = 561$ нм, $\lambda_{\text{Em}} = 575\text{--}600$ нм) *C. elegans*, меченных шариками PS, легированных 1 (5% мас.), записанных со временем кадра 567 мс после освещения ($\lambda_{\text{As}} = 405$ нм, 50 мВт/см²) двух отдельных участков внутри нематоды в течение 5 и 10 мин соответственно и хранения 50 мин.