

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**BODIPY-yhdisteiden käyttö fotodynaamisessa
syövän hoidossa**

Kandidaatintutkielma

18.09.2023

Aino Luukkonen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tämä kandidaatin tutkielma käsittelee BODIPY-yhdisteiden käyttöä syövän fotodynaamisessa terapiassa. Tutkielmassa syvennytään BODIPY-yhdisteiden perusrakenteeseen, ominaisuuksiin ja kliinisiin sovellusmahdollisuuksiin syövän fotodynaamisen hoidon näkökulmasta. Tutkielmassa käydään läpi osaa tunnetuista stretegioista muokata BODIPY-yhdisteitä lääkinnälliseen käyttöön sopivaksi. Tähän on olemassa lukuisia muitakin tehokkaista menetelmiä, joita tässä tutkielmassa ei rajauksen vuoksi käsitellä. Nykyisen tutkimuksen perusteella BODIPY-yhdisteitä on tulevaisuudessa mahdollista käyttää eri syöpätyyppien hoidossa.

Esipuhe

Tämä kandidaatin tutkielma tehtiin keväällä 2023 Jyväskylän Yliopiston kemian laitoksella. Kirjallisuusluettelon kasaaminen aloitettiin tammikuussa ja kirjoittaminen helmikuussa. Tutkielma valmistui kesäkuun alussa 2023. Tutkielman lähteitä etsittiin JYKDOK- tietokannasta ja Google Scholarista. Tutkielmaa ohjasi Professori Maija Nissinen.

Sisällysluettelo

TIIVISTELMÄ	III
ESIPUHE	IV
SISÄLLYSLUETTELO	V
KÄYTETYT LYHENTEET	IV
1 JOHDANTO	1
2 BODIPY-YHDISTEIDEN RAKENNE, SYNTEESI JA OMINAISUUDET	2
2.1. BODIPY-yhdisteiden rakenne	2
2.2. BODIPY-yhdisteiden synteesi	3
2.3 BODIPY-yhdisteiden rakenteen muokkaaminen	6
2.4. BODIPY-yhdisteiden yleiset ominaisuudet	6
2.4.1 Fluoresenssi	7
3 Fotodynaaminen terapia (PDT)	8
3.1. Fotodynaaminen terapia ja valoherkistimet	8
3.2. Systemien välinen siirtymä (ISC)	9
3.3. Reaktiiviset happilajit (ROS)	10
4 BODIPY-YHDISTEET VALOHERKISTÄJINÄ JA SYÖPÄLÄÄKKEINÄ	12
4.1. BODIPY-yhdisteet valoherkistäjinä	12
4.3 Atsa-BODIPY-yhdisteet	14
4.4 Ei-halogenoidut BODIPY-yhdisteet	14
4.5 Selektiivisyyden parantaminen	16
5 YHTEENVETO	19

Käytetyt lyhenteet

BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diatso-s-indaseeni
DDQ	2,3-dikloori-5,6-disyano-4-bentsokinoni
PDT	Fotodynaaminen terapia
ROS	Reaktiivinen happilaji
ISC	Systemien välinen siirtymä
<i>in vivo</i>	tutkimus elollisessa ympäristössä
<i>in vitro</i>	tutkimus elottomassa ympäristössä
NIR	Lähi-infrapuna

1 Johdanto

BODIPY-yhdisteet ovat tunnettuja biokuvantamiseen soveltuvia fluoroforeja. Ensimmäisen tähän luokkaan kuuluvan fluoroforin syntetisoivat saksalaiset tutkijat Alfred Treibs ja Franz-Heinrich Kreuzer vuonna 1968,¹ mutta niiden todelliset sovellusmahdollisuudet ymmärrettiin vasta 1990-luvun puolivälissä.²

BODIPY-yhdisteet tunnetaan erityisesti niiden voimakkaasta ja selkeästä fluoresenssista ja suurista molaarisista absorptiokertoimista. Näistä ominaisuuksista johtuen BODIPY-yhdisteitä onkin käytetty erityisesti merkkiaineina fluoresenssiin perustuvissa kuvantamismenetelmissä, kuten fluoresenssimikroskopiassa. Ne soveltuvat erityisen hyvin biomolekyylien ja elävien solujen kuvantamiseen, sillä ne eivät ole soluille myrkyllisiä eivätkä ne reagoi juurikaan ympäristössä tapahtuviin kemiallisiin muutoksiin.³ Lisäksi niillä on kemiallisilta ominaisuuksiltaan monipuolinen perusrakenne, jota on helppo muokata eri yhdisteiden kuvantamiseen sopivaksi.²

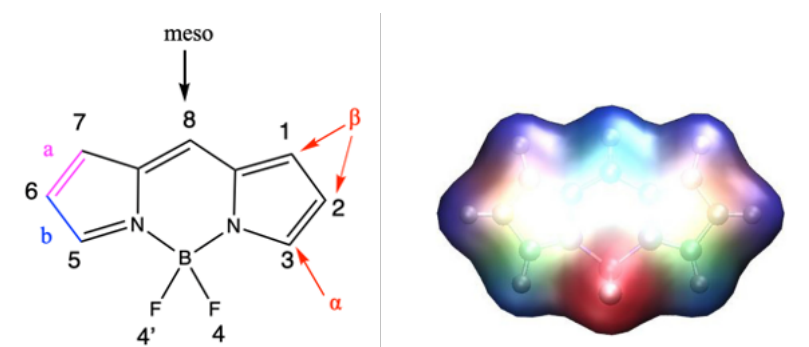
Fotodynaaminen terapia (engl. photodynamic therapy, PDT) on valoon perustuva syövän hoitomuoto. Se perustuu ilmiöön nimeltä fotodynaaminen vaikutus, jossa jonkin solussa olevan yhdisteen altistaminen tietyille valon aallonpituuksille saa aikaan solun tuhoutumisen. Fotodynaamista terapiaa hyödynnettiin potilaiden hoidossa jo 1900-luvun alussa, mutta muiden hoitomuotojen kehittyessä se unohdettiin lähes 50 vuodeksi. Se löydettiin uudelleen vasta 1970-luvulla, kun Thomas J. Dougherty tutki porfyriinejä ja havaitsi niiden fotodynaamisen vaikutuksen soluissa.⁴ Dougherty kehitti ensimmäisen fotodynaamisen lääkkeen ja siksi hänet tunnetaan ”fotodynaamisen terapian isänä”.

BODIPY-yhdisteiden käyttöä fotodynaamisina lääkeaineina eli valoherkistiminä on alettu tutkia vasta hiljattain. Koska ne sopivat hyvin biologisessa ympäristössä käytettäväksi, niistä voitaisiin tulevaisuudessa saada tehokkaita lääkkeitä syövän hoitoon. Tämä kandidaatin tutkielma perehtyy BODIPY-yhdisteisiin ja niiden käyttömahdollisuuksiin fotodynaamisessa terapiassa.

2 BODIPY-yhdisteiden rakenne, synteesi ja ominaisuudet

2.1. BODIPY-yhdisteiden rakenne

Dipyrrometeeniin perustuvat fluoroforit eli BODIPY-fluoroforit (Kuva 1) koostuvat yhdestä dipyrrometeeniligandista ja elektronivajaasta booriyhdisteestä. Usein booriyhdisteenä käytetään booridifluoridia (BF_2).⁵



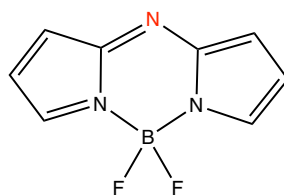
Kuva 1. BODIPY-yhdisteiden runkorakenne (vasen) ja elektronitiheysjakauma (oikea).

Oikeanpuoleinen kuva: Reprinted from Coordination Chemistry Reviews, 399, Boens, N.; Verbelen, B.; Ortiz, M. J.; Jiao, L.; Dehaen, W., Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core, Page 4, Copyright (2019), with permission from Elsevier.

Rakenteen hiilirunko on muodoltaan tasomainen, sillä rengasrakenteiden kaksoissidokset estävät rakenteen pyörimisen. Fluoriatomit suuntautuvat hiilten välisten kaksoissidosten määrittelemän tason ylä- ja alapuolelle ja booriatomi on samassa tasossa hiilirungon kanssa. Hiilirungon pituudesta johtuen BODIPY-runkorakenne on melko neutraali, mutta heteroatomien keskittyminen vain molekyylin alaosaan tekee siitä hiukan polaarisen. Polaarisuuden ansiosta rungossa on sekä nukleofiilisiä että elektrofiilisiä reaktiopaikkoja, mikä mahdollistaa eri ryhmien ja atomien liittämisen suoraan hiilirunkoon.⁶ Tämä helpottaa yhdisteiden muokkausta ja mahdollistaa niiden laaja-alaisen käytön eri tarkoituksissa.

Muodollisesti booriatomilla on negatiivinen varaus BODIPY-runkorakenteessa ja positiivinen varaus delokalisoituu hiilirunkoon. Todellisuudessa fluoriatomeilla on kuitenkin kaikista negatiivisin ja hiilirungon vetyatomeilla kaikista positiivisin varaus. Myös hiiliatomien elektronitiheyksissä on delokalisaatiosta huolimatta eroja. Rungon negatiivisimmat hiiliatomit ovat C2 ja C6 (kuva 1).⁵

Atsa-BODIPY:t ovat BODIPY-johdannaisia, joilla runkorakenteen *meso*-asemassa (C8) on hiilen sijasta typpi (kuva 2).⁷ Näiden yhdisteiden on havaittu fluoresoivan voimakkaasti lähi-infrapuna-alueella (engl. near infrared, NIR), mikä tekee niistä erittäin kiinnostavia biokuvantamisen ja lääkinällisen käytön kannalta. Valitettavasti niille ei kuitenkaan vielä ole löydetty käytännöllistä synteesireittiä, sillä lähtöaineiden on oltava runsaasti substituoituja reaktion onnistumiseksi.²

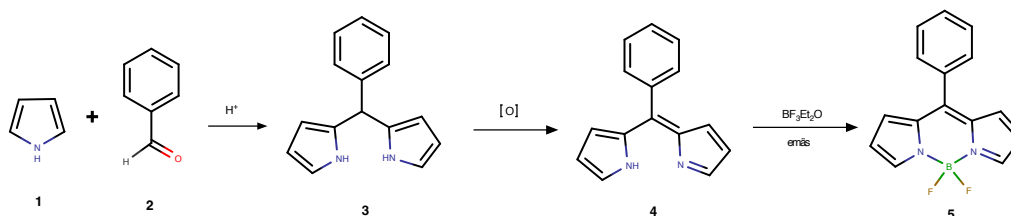


Kuva 2. Atsa-BODIPY-yhdisteiden runkorakenne.

2.2. BODIPY-yhdisteiden synteesi

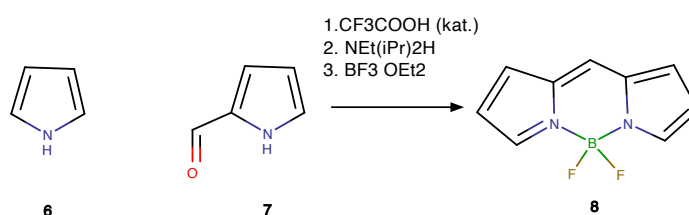
BODIPY-yhdisteiden perusrakenteelle on olemassa monia eri synteesireittejä, joista suurin osa perustuu happokatalysoituun kondensaatioreaktioon. Reaktioreitti riippuu halutun tuotteen symmetrisyydestä tai asymmetrisyydestä.⁶ Yksi mahdollisista reiteistä perustuu pyrrolin **1** ja aromaattisen aldehydin **2** väliseen kondensaatioon. Tämän reaktion tuotteena saadaan haluttua dipyrrometeeniä vastaava dipyrrometaani **3** (kuva 3). Dipyrrometaanit ovat erittäin epästabiileja, koska ne reagoivat herkästi valoon, kemikaaleihin ja lämpötilan muutoksiin. Tästä syystä dipyrrometaani on käytettävä heti reaktion jälkeen. Reaktion toisessa vaiheessa dipyrrometaani hapetetaan dipyrrometeeniksi **4**. Hapettimena käytetään tavallisesti joko DDQ:ta (2,3-dikloori-5,6-disyano-4-bentsokinoni) tai p-kloraliinia. Synteesin viimeisessä vaiheessa valmiiseen dipyrrometeeniligandiin kiinnitetään kelatoiva booridifluoridi-kationi emäksisissä olosuhteissa. Booridifluoridi tuodaan reaktioseokseen booritrifluoriditeraattina. Tämän menetelmän heikkoutena on kuitenkin se, että se vaatii aromaattisen aldehydin, sillä muuten reaktiota ei saada

vietyä loppuun. Lisäksi reaktio on toteutettava suuressa pyrroliylimäärässä polymerisaation estämiseksi.²



Kuva 3. BODDIPY-yhdisteiden perusrakenteen synteysi pyrrolin ja aromaattisen aldehydin välisen kondensaatioreaktion avulla.

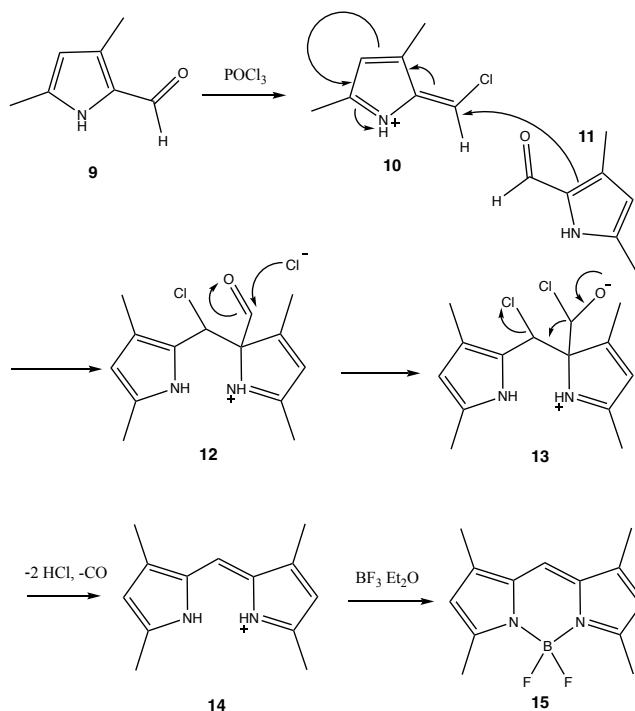
Toinen laajasti käytetty synteisireitti perustuu pyrrolin ja asyylipyrrolin väliseen kondensaatioreaktioon. Tätä reaktioreittiä käytetään pääasiassa asymmetristen dipyrrometeenien valmistukseen.^{6,2} Reaktion ensimmäisessä vaiheessa pyrroli reagoi asyyliekvivalentin kanssa happamissa olosuhteissa tuottaen asyylipyrrolin **7**. Tämän jälkeen asyylipyrroli voi reagoida pyrroliyksikön **6** kanssa, jolloin muodostuu dipyrriumsuola (kuva 4). Synteysi viedään loppuun antamalla muodostuneen dipyrriumsuolan reagoida booritrifluoridieteraatin kanssa emäksisissä olosuhteissa.²



Kuva 4. BODIPY-runkorakenteen synteysi pyrrolin ja asyylipyrrolin välisellä kondensaatiolla.

Wu ja Burgess⁸ julkaisivat vuonna 2007 vaihtoehtoisen menetelmän BODIPY-runkorakenteen synteisille. Menetelmä perustuu pyrrolikarbaldehydin **9** reaktioon fosforioksidikloridin kanssa. Reaktio tuottaa suoraan dipyrrometeeniä, joten muita reaktiovaiheita ei tarvita. Heidän

ehdottamassaan reaktiomekanismissa yksi fosforioksidikloridin klooriatomeista korvaa pyrrolikarbaldehydin hapen. Tämän jälkeen muodostunut kloorattu atsafulveeni **10** reagoi toisen pyrrolikarbaldehydimolekyylin **11** kanssa muodostaen dipyrrometeeniä. Viimeisessä vaiheessa valmis dipyrrometeeni reagoi booritrifluoridieteraatin kanssa, kuten muissakin edellä esitetyissä reaktioissa.²



Kuva 5. Tutkijoiden Wu ja Burgess ehdottama BODIPY-perusrakenteen vaihtoehtoinen synteesireitti.⁸

BODIPY-yhdisteille on vuosien aikana kehitetty monia muitakin synteesireittejä, joita tässä työssä ei käsitellä. Suurin osa kehitetyistä menetelmistä on kuitenkin edellä esitettyjen menetelmien erilaisia variaatioita.⁹

2.3 BODIPY-yhdisteiden rakenteen muokkaaminen

Suurimpia BODIPY-yhdisteiden käyttöä biologisissa systeemeissä rajoittavia tekijöitä ovat niiden hydrofobisuus ja alle 600 nm emissioaallonpituus. Optimaalisesti biologisessa ympäristössä käytettävien BODIPY-yhdisteiden emissioaallonpituuden tulisi olla NIR-alueella eli 650-900 nm. Nämä valon aallonpituudet pääsevät syvemmälle kudoksiin vahingoittamatta ympäröiviä soluja. Niiden käyttö myös vähentää taustan autofluoresenssin aiheuttamaa häiriötä.³ BODIPY-runkorakenteen emissioaallonpituus on kuitenkin noin 490-505 nm, joten aallonpituutta on siirrettävä eläville soluille sopivammaksi.⁷ Hydrofobisuus taas vaikeuttaa yhdisteiden käyttöä biologisissa systeemeissä, koska solun sisällä ympäristö on polaarinen.³

Tähän mennessä on havaittu, että *meso*-aseman (C8) muokkauksella on vain vähän vaikutusta BODIPY-yhdisteen emissioaallonpituuteen. Tästä johtuen *meso*-asemaa muokkaamalla on pyritty parantamaan yhdisteiden vesiliukoisuutta. Siihen voidaan liittää esimerkiksi vesiliukoisia polymeeriketjuja, amfipaattisia molekyyliä, karboksyylianioneja tai oligo-etyleeniglykolimetyylietteri. Vesiliukoisuutta voidaan myös parantaa liittämällä hydrofiilisiä ryhmiä molekyylin 2/6 asemiin. Liitettäviä ryhmiä voivat olla esimerkiksi sulfonaatit ja karboksylaatit.³

Emissioaallonpituutta taas pyritään pidentämään laajentamalla BODIPY-rungon π -konjugaatiota liittämällä π -sidoksia sisältäviä ryhmiä 2/6- ja 3/5-asemiin. Emissioaallonpituuden on havaittu pitenevän eniten 3/5-asemia muokattaessa. Yksi parhaista tavoista valmistaa NIR-alueella emittoivia BODIPY-yhdisteitä on liittää 3/5-asemiin aromaattisia aldehydejä kondensaatioreaktiolla.³

2.4. BODIPY-yhdisteiden yleiset ominaisuudet

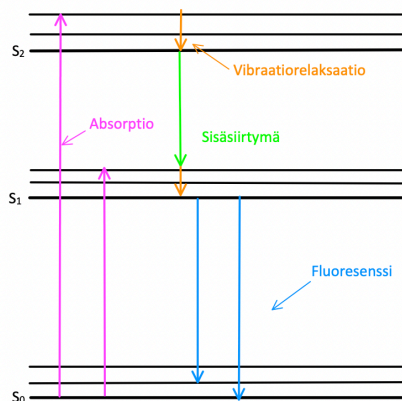
BODIPY-yhdisteillä on erittäin paljon hyödyllisiä ominaisuuksia, mikä mahdollistaa niiden hyödyntämisen monilla eri kemian osa-alueilla. BODIPY-yhdisteillä on tyypillisesti korkeat molaariset absorptiokertoimet ja fluoresenssin kvanttisaannot. Lisäksi niiden eksitaation ja emission intensiteettimaksimit ovat kapeat, mikä johtaa selkeisiin väreihin fluoresenssissa. Koska BODIPY-yhdisteiden emissioaallonpituus on tavallisesti näkyvän valon alueella ja joidenkin yhdisteiden tapauksessa jopa NIR-alueella, emissio on helppo havaita.^{2,6,5}

BODIPY-yhdisteitä on tähän mennessä hyödynnetty erityisesti biokuvantamisessa, sillä ne eivät ole soluille myrkyllisiä ja ne kestävät hyvin valoa ja eri kemikaaleja. Lisäksi ne eivät yleensä reagoi ympäristön polaarisuuteen tai pH-arvoon.³ BODIPY-yhdisteitä on myös erittäin helppo muokata haluttuun käyttötarkoitukseen sopivaksi lisäämällä runkorakenteeseen eri atomeja tai atomiryhmiä. Lisäksi BODIPY-yhdisteillä on havaittu olevan myös fototoksisia ominaisuuksia ja niitä onkin viime vuosikymmeninä alettu tutkimaan myös potentiaalisina tulevaisuuden valoherkistiminä.¹⁰

2.4.1 Fluoresenssi

Voimakas fluoresenssi on yksi tärkeimmistä ja mielenkiintoisimmista BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksista. Fluoresenssi on spontaani ja nopea virittyneen tilan purkautuminen sähkömagneettisena säteilynä, kun elektroni siirtyy kahden singlettitalan välillä. Kun molekyyli altistetaan tietylle valon aallonpituudelle, se siirtyy korkeammalle energiatasolle eli virittyy. Korkeammalla energiatasolla tarkoitetaan tässä tapauksessa korkeampi energistä elektronikonfiguraatiota, jossa elektroni on siirtynyt säteilyn vaikutuksesta ylemmälle orbitaalille. Tällöin valon energia absorboituu molekyyliin. Korkeaenerginen tila ei kuitenkaan ole kovin pitkäikäinen, vaan elektroni palaa nopeasti alkuperäiselle orbitaalilleen vapauttaen samalla ylimääräisen energian valona. Kaikki energia ei kuitenkaan vapaudu valona, vaan osa energiasta absorboituu ympäristön molekyyliin vibraatioenergiana. Tästä johtuen molekyylin emittoiman valon aallonpituus on suurempi kuin sen absorboima aallonpituus.^{11a}

Fluoresenssin määritelmän mukaisesti elektronin on siirryttävä kahden singlettitalan välillä. Singlettitalalla tarkoitetaan tilaa, jonka spin multiplisiteetti on $S=0$, jolloin tilan elektroneilla on vastakkaisuuntaiset spinit. Triplettilialla taas spin multiplisiteetti on $S=1$ ja elektronien spinit ovat samansuuntaiset.^{11b}



Kuva 6. Fluoresenssi energiadiagrammissa.

Fluoresenssia hyödynnetään monissa analyysi- ja kuvantamismenetelmissä ja erityisesti fluoresenssimikroskopiaa on hyödynnetty biologisten näytteiden kuvantamisessa. Fluoresoivia yhdisteitä kutsutaan yleisesti fluoroforeiksi ja fluoroforin valinta riippuu kuvattavasta näytteestä. Biologisten näytteiden tapauksessa fluoroforin eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien tulisi olla mahdollisimman pitkiä, jotta säteily ei vahingoittaisi näytettä. Tämä on erityisen tärkeää, kun tehdään *in vivo* tutkimuksia.

3 Fotodynaaminen terapia (PDT)

3.1. Fotodynaaminen terapia ja valoherkistimet

Fotodynaaminen terapia on valokemialliseen prosessiin perustuva syövän hoitomuoto, jossa valoherkistin (engl. photosensitizer) tuhoaa kasvainsoluja tuottamalla erittäin reaktiivista singlettihapeta ja muita reaktiivisia happilajeja soluissa. Menetelmä on hyvin selektiivinen, koska singlettihapen puoliintumisaika on lyhyt eikä se siten ehdi levitä muihin ympäröiviin kudoksiin. Valo tai reaktiivista hapeta tuottavat yhdisteet itsessään eivät myöskään ole soluille myrkyllisiä vaan lääkkeen toiminta vaatii kaikki kolme tekijää: valoherkistimen, hapen ja valon.¹⁰ Tämä tekee fotodynaamisesta terapiasta myös helposti kontrolloitavan hoitomuodon.

Valoherkistimet tuottavat soluissa singlettihapeta ja muita reaktiivisia happilajeja. Valoherkistimiä on kahta eri tyyppiä. Tyyppin II valoherkistimet tuottavat reaktiivisista happilajeista vain singlettihapeta, joten niiden toiminta riippuu vahvasti kudoksen

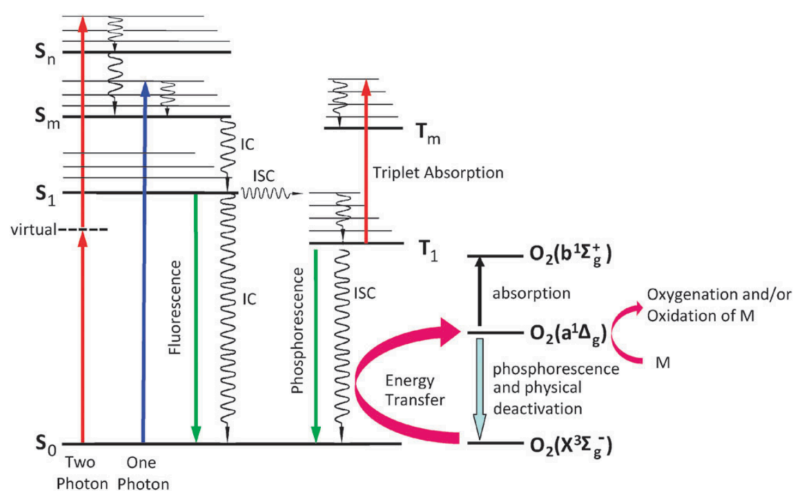
happipitoisuudesta. Tyypin I valoherkistimet taas kykenevät tuottamaan singlettihapen lisäksi myös muita reaktiivisia happilajeja, esimerkiksi hydroksyyliiradikaaleja, ja pystyvät siten toimimaan myös pienemmissä happipitoisuuksissa.¹² Tyypin I valoherkistimet ovat kuitenkin harvinaisia ja tässä tutkielmassa käsitellään vain tyypin II valoherkistimiä.

Kohdekudoksessa tyypin II valoherkistin altistetaan yhdisteestä riippuvalle valon aallonpituudelle, jolloin se virittyy singlettitalalta triplettitalalle. Valoherkistäjän triplettitila toimii energian luovuttajana ja energia siirtyy kudoksessa olevalle vapaalle happimolekyylille. Tällöin happimolekyyli siirtyy stabiililta triplettitalalta epästabiilille singlettitalalle. Singlettihappi puolestaan aiheuttaa soluissa vakavia rakennevaurioita ja lopulta solujen kuoleman. Valoherkistimien toimintaa voidaan kontrolloida ohjaamalla ne mahdollisimman tarkasti pelkästään kohdekudokseen ja altistamalla vain haluttu kudokseksi. Kontrolli vähentää terveelle kudokselle koituvia vaurioita ja siten myös lääkkeen aiheuttamia sivuvaikutuksia.¹³

3.2. Systemien välinen siirtymä (ISC)

Inter system crossing eli ISC on molekyylin sisäinen elektronisiin tiloihin liittyvä kvanttitaso ilmiö, jonka kautta valoherkistin tuottaa singlettihapetta fotodynaamisessa terapiassa. Sen aikana molekyyli siirtyy singlettitalalta triplettitalalle tai toisin päin.¹⁴ ISC on kvanttimekaniikan valintasääntöjen mukaisesti kielletty prosessi, sillä se sisältää elektronin spinin muutoksen. Prosessissa energia ei vapaudu säteilyä, toisin kuin fluoresenssissa.¹⁴

ISC tapahtuu, kun eri multiplisiteetin elektroniset tilat vuorovaikuttavat toistensa kanssa. Nämä eri tilojen väliset vuorovaikutukset johtuvat elektronin spiniin liittyvän magneettikentän ja orbitaalimomentin aiheuttaman magneettikentän välisestä yhteydestä eli ilmiöstä nimeltä spin-rata-kytkentä (engl. spin orbit couplin) tai SOC.¹¹ Elektronin orbitaalimomentti riippuu atomiytimen varauksesta, jolloin raskaammissa atomeissa SOC on voimakkaampaa ja tällöin myös ISC:n kvanttisaanto on suurempi. Tästä johtuen valoherkistimien ISC:n kvanttisaantoa voidaan yleisesti parantaa liittämällä yhdisteisiin raskaita atomeja tai atomiryhmiä.¹⁴

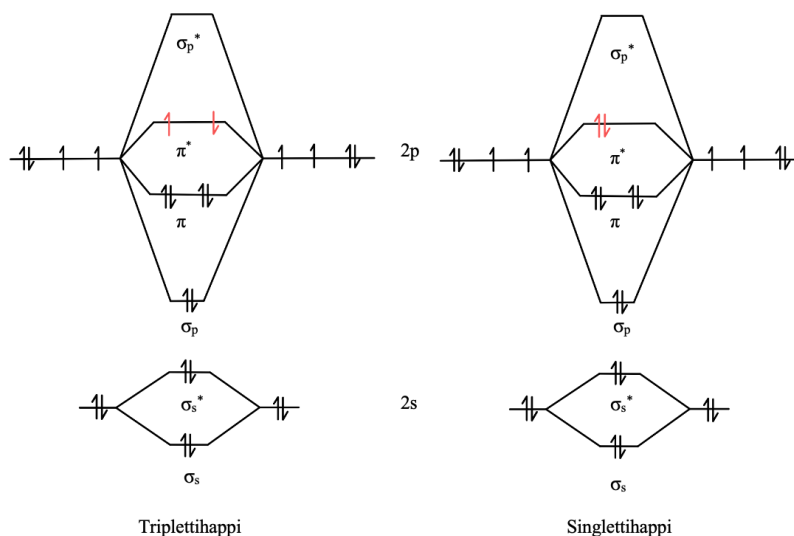


Kuva 7. Triplettivaloherkistimen toiminta energiadiagrammissa kuvattuna. Kuvassa symboli $O_2(a^1\Delta_g)$ tarkoittaa singlettihapetta ja symboli $O_2(X^3\Sigma_g^-)$ triplettihapetta.¹⁵ Used with permission of Royal society of chemistry, from Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun, Peter R. Ogilby, 39, and year of copyright permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

3.3. Reaktiiviset happilajit (ROS)

Happi ja sen pitoisuus soluissa on yksi tärkeimmistä fotodynaamisen terapian tehoon vaikuttavista tekijöistä, kun käytetään tyypin II valoherkistimiä. Se on monella tavalla poikkeuksellinen aine, sillä se on ainut luonnossa suurissa konsentraatioissa havaittava molekyyli, jonka perustila on triplettitila.¹⁶ Hapella on kaksi saman energian delokalisoitunutta π -orbitaalia, joilla on molemmilla yksi elektroni. Näillä π -elektroneilla on molemmilla sama spin, mikä johtaa happimolekyylin kokonaisspinin arvoon $S=1$ (kuva 8.). Singlettitilalla taas kokonaisspinin arvo on $S=0$.¹¹ Tästä orbitaalirakenteesta johtuen happi on kemialliselta luonteeltaan diradikaali, mutta sillä on kuitenkin huomattavasti korkeampi kynnyksensä reagoimaan kuin radikaaleilla yleensä.¹⁶

Singlettihappi on hapen alin elektronisesti virittynyt tila, jossa happimolekyylin π -elektronit ovat samalla orbitaalilla. Tämä on valintasääntöjen mukaisesti kielletty siirtymä, koska se vaatii elektronin spinin muutoksen.¹¹ Singlettihappi on erittäin epästabiili molekyyli ja siten myös hyvin reaktiivinen ja käyttäytyy radikaalin tavoin.¹⁶ Singlettihapen lisäksi reaktiivisia happilajeja ovat muiden muassa myös hydroksyyli-radikaali $\cdot OH$ ja vetyperoksidi H_2O_2 .¹⁷



Kuva 8. Singletti- ja triplettihapen elektronikonfiguraatio energiadiagrammissa

Solu tuottaa singlettihapetta luonnollisesti monissa eri tilanteissa. Singlettihapetta muodostuu esimerkiksi soluhengityksen ja fotosynteesin aikana. Solu voi tuottaa singlettihapetta myös suojautuakseen patogeeneja vastaan. Myös monet ulkoiset tekijät voivat saada aikaan singlettihapen ja muiden reaktiivisten happilajien muodostumisen solussa. Tällaisia tekijöitä ovat esimerkiksi ionisoiva säteily (UV ja erityisesti UVA).¹⁸

Suurissa konsentraatioissa singlettihappi on erittäin myrkyllistä kaikille eläville soluille ja sitä pidetäänkin yhtenä soluille vaarallisimmista reaktiivisen hapen muodoista. Sen ja muiden reaktiivisten happilajien myrkyllisyys johtuu niiden kyvystä aiheuttaa oksidatiivista stressiä.¹⁸ Oksidatiivisella stressillä tarkoitetaan epätasapainoa elimistössä olevien vapaiden radikaalien ja antioksidanttien välillä. Tässä epätasapainotilassa antioksidantit ja elimistön immuunijärjestelmä eivät kykene korjaamaan radikaalien aiheuttamia vaurioita tarpeeksi nopeasti. Radikaalit, esimerkiksi singlettihappi, vaurioittavat erityisesti solun DNA:ta ja proteiineja hapettamalla niiden tiettyjä emäksiä ja aminohappoja.¹⁹ Singlettihappi reagoi DNA:n emäksistä erityisesti guaniinin kanssa, koska sen redox-potentiaali on alhaisin. Hapettamalla guaniinin singlettihappi luo DNA-molekyylisiin ”positiivisen reiän”, joka siirtyy molekyylissä eteenpäin elektronien välityksellä.¹⁸ DNA-vauriot johtavat solusyklin häiriintymiseen ja jopa apoptoosiin, jos vauriot ovat riittävän laajoja.

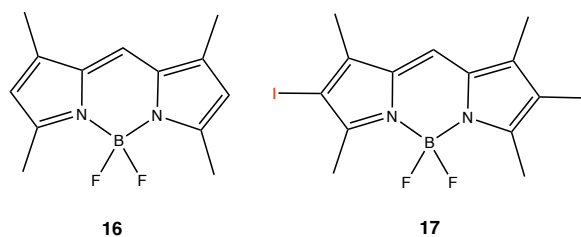
4 BODIPY-yhdisteet valoherkistäjinä ja syöpälääkkeinä

4.1. BODIPY-yhdisteet valoherkistäjinä

BODIPY-yhdisteiden hyödyntämistä fotodynaamisessa terapiassa on tutkittu vasta viimeisen noin 10-15 vuoden aikana. Monet niiden ominaisuuksista ovat hyvin edullisia PTD:n kannalta. Näitä ominaisuuksia ovat erityisesti alhainen sytotoksisuus, pitkä emissio- ja eksitaatioaallonpituus, korkeat molaariset absorptiokertoimet, epäherkkyys ympäristön muutoksille ja hyvä valo-pimeä-toksisuussuhde (toksisuus ilman valoaltistusta/ toksisuus valolle altistettuna). Suurinta osaa näistä ominaisuuksista hyödynnetään myös fluoresenssiin perustuvassa biokuvantamisessa. PDT:n tapauksessa fluoresenssi on kuitenkin ei-haluttu ilmiö, sillä ylimääräinen energia purkautuu valona molekyylin siirtyessä virittyneeltä singlettitalalta perustilalle. Tällöin energian purkautuminen ei tapahdu triplettitalan kautta, jolloin ISC ei tapahdu eikä yhdiste tuota reaktiivista happea. ISC:n kvanttisaantoa voidaan parantaa muokkaamalla BODIPY-runkorakennetta liittämällä siihen eri atomeja tai atomiryhmiä.¹⁰ Liitettävillä ryhmillä ja suuremmilla molekyyleillä voidaan vaikuttaa myös BODIPY-valoherkistimien selektiivisyyteen ja lääkkeen aiheuttamiin ei-toivottuihin sivuvaikutuksiin. Lisäksi niiden avulla voidaan siirtää BODIPY-yhdisteiden luonnostaan lyhyitä emissio- ja eksitaatioaallonpituuksia biologiselle ympäristölle sopivammaksi.

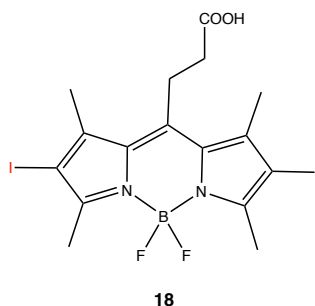
4.2 Halogenoidut BODIPY-yhdisteet

Yksi strategia parantaa BODIPY-valoherkistimien ISC:n kvanttisaantoa ja singlettihapen tuotantoa on liittää halogeenejä BODIPY-runkorakenteeseen. Halogeenit ovat suhteellisen raskaita alkuaineita, jolloin niiden spin-rata-kytkentä on suurempi, mikä johtaa korkeampaan ISC:n kvanttisaantoon ja siten taas voimakkaampaan singlettihapen tuotantoon.¹⁰ Halogeeneinä käytetään tavallisesti joko jodia tai bromia, mutta jodin avulla saadaan yleensä parempia tuloksia.²⁰ Naganon ryhmä²¹ tutki ensimmäisenä yhdisteen **16** dijodidi-analogia **17** (kuva 9.). Analogilla havaittiin korkeampi ISC, kun se altistettiin 514 nm valolle.



Kuva 9. BODIPY **16** ja sen diiodidi analogi **17**.

Halogeenisubstituenttien paikalla runkorakenteessa on suuri merkitys ISC:n ja fluoresenssin kvanttisaantoihin. Halogeenien liittäminen suoraan BODIPY-hiilirunkoon nostaa ISC:n kvanttisaantoa huomattavasti enemmän kuin substituenttien halogenoiminen. Kuitenkin halogeenien liittäminen 3/5-asemiin voimistaa ISC:n sijasta fluoresenssia. Muut substituentit voivat voimistaa halogeenien vaikutusta. Esimerkiksi on havaittu, että karboksyylihapon liittäminen BODIPY-rungon meso-asemaan tuottaa yhdessä 2/6-asemiin kiinnitettyjen jodiatomien kanssa, kuten yhdisteessä **18** (kuva 10) korkeamman ISC:n kvanttisaannon kuin pelkästään jodioiduissa yhdisteissä.¹⁰

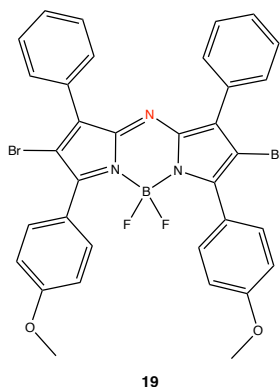


Kuva 10: Halogenoitu ja meso-substituoitu BODIPY **18**.

4.3 Atsa-BODIPY-yhdisteet

Atsa-BODIPY-yhdisteiden absorptio- ja emissioaallonpituudet ovat yleisesti pidempiä kuin BODIPY-yhdisteiden. Atsa-BODIPY-rungon emissioaallonpituus on noin 650-675 nm, mikä tekee atsa-BODIPY-yhdisteistä erittäin mielenkiintoisia fotodynaamisen terapian kannalta. Niiden emissio- ja eksitaatiomaksimeita voidaan siirtää entistäkin pidemmille aallonpituuksille liittämällä niiden runkorakenteeseen eri substituentteja.¹⁰

Atsa-BODIPY-yhdisteellä **19** (kuva 11) on saatu hyviä tuloksia *in vivo*-tutkimuksissa. Bromisubstituentit yhdessä para-asemassa olevien ja elektroneja luovuttavien metoksi-substituenttien kanssa stabiloivat virittyneitä triplettiloja ja lisäävät siten ISC:n kvanttisaantoa. Yhdiste **19** säilyttää aktiivisuutensa myös ympäristön happipitoisuuden ollessa pieni. Lisäksi oikealle valon aallonpituudelle altistettaessa se vaatii vain nanomolaarisen konsentraation saavuttaakseen sytotoksiset ominaisuutensa. Yhdistettä **19** on tähän mennessä tutkittu useilla eri ihmisen syöpäsolulinjoilla eikä sillä näyttäisi olevan selektiivisyyttä mihinkään tiettyyn syöpätyyppiin. Osa näistä solulinjoista oli monelle lääkkeelle resistenttejä etäpesäkelinjoja.¹⁰

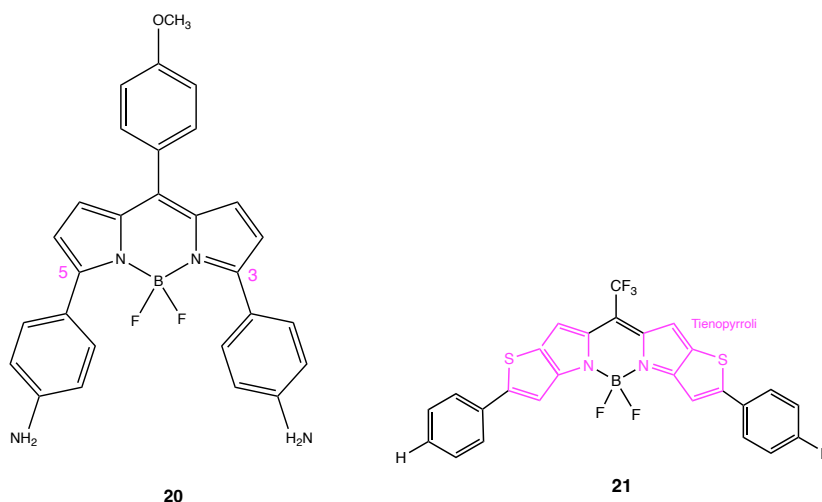


Kuva 11. Atsa-BODIPY:n **19** rakenne.

4.4 Ei-halogenoidut BODIPY-yhdisteet

BODIPY-yhdisteelle voidaan saada PTD:n kannalta tärkeät ominaisuudet myös ilman halogeenisubstituentteja. Yksi tapa nostaa yhdisteen ISC:n kvanttisaantoa ilman raskaita atomeja on liittää BODIPY-runkoon elektrorikkaita ryhmiä, jotka stabiloivat virittyntä triplettilaa.²⁰ Chang *et al.*²² liittivät elektroneja luovuttavat aniliinisubstituentit BODIPY-rungon 3- ja 5-asemiin

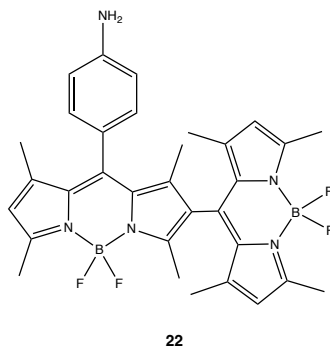
(yhdiste **20**, kuva 12). Tällä yhdisteellä havaittiin olevan selektiivisiä PTD-ominaisuuksia, sillä se kertyi pääasiallisesti vain kasvainsoluihin. Lisäksi sillä on korkea valonkestävyys eikä juurikaan pimeää toksisuutta.



Kuva 12. Aniliinisubstituoidun BODIPY:n **20** ja tienopyrrolisubstituoidun BODIPY:n **21** rakenteet.

BODIPY-yhdisteiden PTD-ominaisuuksia voidaan parantaa myös liittämällä runkoon tienopyrrolisubstituentteja. You *et al.*²³ valmistivat yhdisteen **21**, jonka havaittiin tuottavan suhteellisen paljon singlettihapetta ilman raskaita atomeja. Yhdiste **21** kuitenkin säilytti fluoresoivat ominaisuutensa, mikä mahdollistaa kuvantamisen ja siten myös lääkkeen toiminnan tarkastelun ja kontrolloinnin fotodynaamisen terapian yhteydessä.²⁰

Singlettihapen tuottoa BODIPY-yhdisteillä voidaan lisätä myös liittämällä kaksi BODIPY-johdannaista toisiinsa siten, että ne muodostavat dimeerin. Syytä dimeerien korkeaan singlettihapen tuotantoon ei kuitenkaan vielä tiedetä kovin tarkasti.²⁰ Ortiz *et al.*²⁴ valmistivat erilaisia geometrisesti ortogonaalisia BODIPY-dimeerejä ja tutkivat niiden käyttäytymistä eri liuottimissa. Elektroneja luovuttavan ryhmän, esimerkiksi -NH_2 liittäminen toisen BODIPY-yksikön meso-asemaan (yhdiste **22**, kuva 13) kasvattaa yhdisteen kykyä tuottaa reaktiivisia happilajeja, kuten muissakin edellä mainituissa yhdisteissä. Elektroneja puoleensa vetävän ryhmän, kuten -NO_2 liittäminen meso-asemaan taas vähensi singlettihapen tuottoa.



Kuva 13. Ortogonaalisen BODIPY-dimeerin **22** rakenne.

Näiden yhdisteiden lisäksi myös BODIPY-siirtymämetallikomplekseilla on saatu lupaavia tuloksia sekä *in vitro* että *in vivo* tutkimuksissa. Kompleksit kykenevät tuottamaan enemmän reaktiivisia happilajeja johtuen raskaamman metalliatomin aikaansaamasta voimakkaammasta ISC:tä. Niillä on kuitenkin siirtymämetallista johtuen myös voimakas fluoresenssi. Kompleksoivina metalleina käytetään esimerkiksi iridiumia, ruteniumia ja kuparia. Näiden kompleksien kehitys on kuitenkin vasta varhaisessa vaiheessa.²⁰

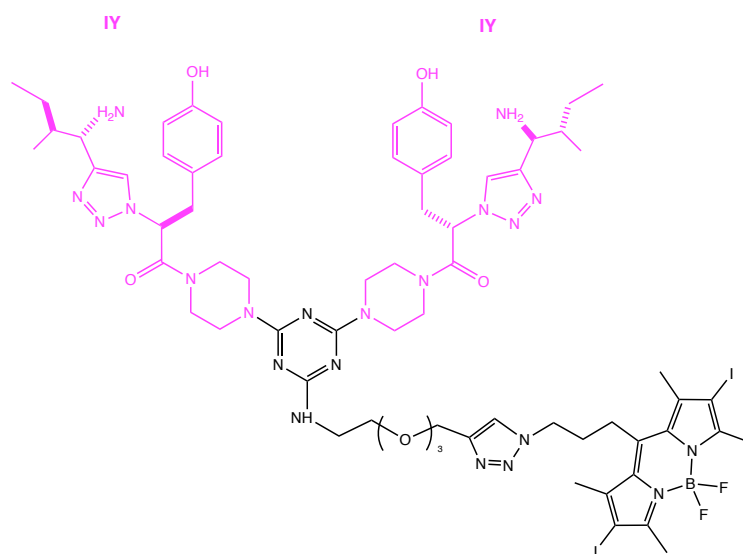
4.5 Selektiivisyyden parantaminen

Yksi fotodynaamisen terapian potentiaalisista eduista nykypäivänä yleisesti käytettyihin syövän hoitomuotoihin verrattuna on sen selektiivisyys.¹⁰ Hoidon kohdentaminen sairaaseen kudokseen vähentää hoidon sivuvaikutuksia ja tekee siitä vähemmän invasiivista. Selektiivisyyttä voidaan parantaa valoherkistimien rakennetta muokkaamalla ja hyödyntämällä syöpäsolujen omia kemiallisia ominaisuuksia.²⁰

BODIPY-yhdisteille on kehitetty useita eri strategioita niiden selektiivisyyden parantamiseen. Yksi näistä on kohdennettavan ligandin liittäminen BODIPY-runkoon. Ligandin tarkoituksena on ohjata BODIPY-valoherkistin kasvainsoluihin, esimerkiksi niiden pintareseptorien avulla.²⁰ Esimerkiksi Burgess *et al.*²⁵ liittivät jodioituun BODIPY-runkoon syöpäsolujen tropomyosiini reseptori kinaasin (TrkC) tunnistavan IYY-ligandin (yhdiste **23**, kuva 14). Yhdisteen **23** selektiivisyys sekä ihmisen että jyrsijän kasvainsoluihin parani huomattavasti verrattuna sen vastineeseen ilman ligandia. Hiirillä tehdyissä eläinkokeissa havaittiin kasvaimen tilavuuden

96 % pieneneminen 6. päivänä PTD-hoidon jälkeen. Lisäksi 71 % hiiristä ei havaittu kasvaimen suurentumista 90 päivään hoidon jälkeen.²⁶ IYIY-I₂-BODIPY:llä havaittiin myös olevan immuunijärjestelmää aktivoiva vaikutus, mikä lisäsi hoidon tehokkuutta entisestään.²⁷

Tämän esimerkin lisäksi BODIPY-yhdisteille on kehitetty myös paljon muita erilaisia kohdentavia ligandeja, joilla on fotodynaamisen terapian kannalta positiivisia vaikutuksia BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksiin.



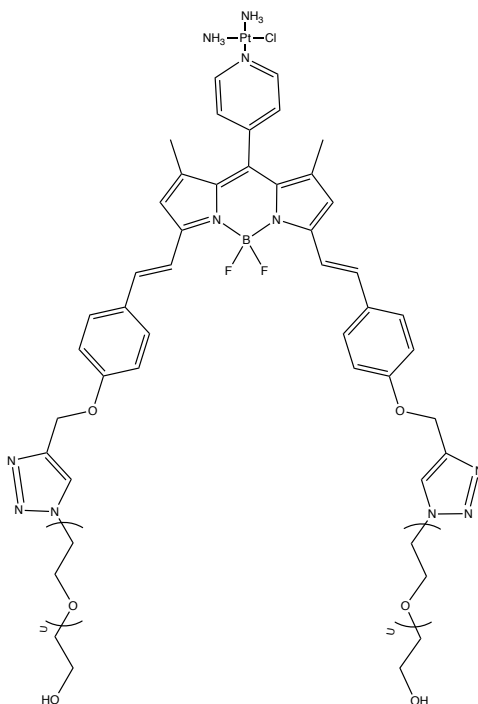
23

Kuva 14. IYIY-ligandilla substituoitu BODIPY-kompleksi **23** (IYIY-I₂-BODIPY).

Toinen strategia parantaa BODIPY-valoherkistimien selektiivisyyttä on hyödyntää nanopartikkeleja lääkkeen kantajina. Nanopartikkelien avulla voidaan selektiivisyyden lisäksi myös parantaa BODIPY-yhdisteiden vesiliukoisuutta ja kasvainsoluihin kertymistä lisääntyneen permabiliteetti- ja retentiovaikutuksen (eng. enhanced permeability and retention effects, EPR) avulla.²⁰ EPR-vaikutuksella tarkoitetaan makromolekyylien, esimerkiksi lipidien, lisääntyneen kertymistä kasvainsoluihin.²⁸ Nanopartikkelien käytön suurimpia haasteita ovat tällä hetkellä pieni singlettihapen tuotanto partikkelin sisällä ja syvällä kudoksissa olevien kasvainten hapenpuute.²⁰

Guo *et al.*²⁹ valmistivat platinoidun BODIPY-nanopartikkelin **24** (kuva 15), jota on mahdollista käyttää samanaikaisesti sekä fotodynaamisessa terapiassa että kasvainsolujen termisessä ablaatiassa. Platinan korkea spin-rata-kytkentävakio edistää nopeaa singletti-tripletti ISC:tä ja lisäksi platinan tyhjät d-orbitaalit helpottavat ei-säteilevää ylimääräenergian purkautumista. Nämä nanopartikkelit tuottavat tietyille valon aallonpituudelle altistettaessa runsaasti reaktiivisia

happilajeja ja aiheuttavat kasvaimessa voimakkaan hypertermian. Ne kertyvät kasvainsoluihin tehokkaasti ja saavat aikaan suuria vaurioita. Tämä platinoitu BODIPY-nanopartikkeli on vain yksi esimerkki monista lupaavista kantajiksi sopivista nanopartikkeleista.²⁰ Näiden kahden strategian lisäksi on olemassa lukuisia muitakin menetelmiä, joilla BODIPY-yhdisteiden selektiivisyyttä voidaan parantaa.



Kuva 15. Platinananopartikkeliin liitetyn BODIPY:n **24** rakenne.

5 Yhteenveto

BODIPY-yhdisteet ovat saavuttaneet suuren suosion monilla eri tutkimusalueilla monipuolisten ominaisuuksiensa ansiosta. Niillä on paljon potentiaalisia sovelluksia erityisesti biokuvantamisessa ja lääkinällisessä käytössä. Tämä tutkielma käsitteli BODIPY-yhdisteitä fotodynaamisen terapian näkökulmasta, mutta niitä voidaan hyödyntää myös esimerkiksi fototermisessä terapiassa, jossa kasvainsoluja tuhotaan lämpösäteilyn avulla.¹² Lisäksi BODIPY-yhdisteillä on havaittu olevan myös antimikrobisia ominaisuuksia,³ joten niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää myös esimerkiksi bakteeri-infektioiden hoidossa.

BODIPY-valoherkistimien merkittävimpiä etuja fotodynaamisessa terapiassa ovat tehokas reaktiivisten happilajien tuotto, hyvä valonkestävyys ja vähäinen sytotoksisuus. Niiden suurimpia rajoitteita ovat kuitenkin hydrofobisuus ja liian lyhyt eksitaatioaallonpituus. Ne ovat erittäin arvokkaita valoherkistimiä, joilla on paljon kehittämispotentiaalia, mutta lääkinällinen käyttö vaatii edelleen paljon lisätutkimuksia. Tällä hetkellä BODIPY-yhdisteitä ei vielä hyödynnetä potilaiden hoidossa, mutta tulevaisuudessa BODIPY-yhdisteitä todennäköisesti tullaan käyttämään valoherkistiminä fotodynaamisessa syövän hoidossa.^{20,10,12}

Kirjallisuusluettelo

1. Treibs, A. ja Kreuzer, F.-H., Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1968**, 718, 208–223.
2. Boens, N.; Leen, V. ja Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 1130–1172.
3. Liu, M.; Ma, S.; She, M.; Chen, J.; Wang, Z.; Liu, P.; Zhang, S. ja Li, J., Structural modification of BODIPY: Improve its applicability, *Chin. Chem. Lett.*, **2019**, 30, 1815–1824.
4. Allison, R. R. ja Moghissi, K., Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, *Clin. Endosc.*, **2013**, 46, 24–29.
5. Boens, N.; Verbelen, B.; Ortiz, M. J.; Jiao, L. ja Dehaen, W., Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 399, 213024.
6. Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M. ja Jung, G., Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene, *J. Fluoresc.*, **2009**, 19, 755–758.
7. Parisotto, S.; Lace, B.; Artuso, E.; Lombardi, C.; Deagostino, A.; Scudu, R.; Garino, C.; Medana, C. ja Prandi, C., Heck functionalization of an asymmetric aza-BODIPY core: synthesis of far-red infrared probes for bioimaging applications, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 884–893.
8. Wu, L. ja Burgess, K., A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes, *Chem. Commun.*, **2008**, 4933–4935.
9. Wood, T. E. ja Thompson, A., Advances in the Chemistry of Dipyrrins and Their Complexes, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1831–1861.
10. Kamkaew, A.; Hui Lim, S.; Boon Lee, H.; Voon Kiew, L.; Yong Chung, L. ja Burgess, K., BODIPY dyes in photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 77–88.
11. Atkins, P.; Paula, J. de ja Keeler, J., *Atkins' Physical Chemistry*, Eleventh edition, Oxford University Press, Oxford, 2018.
12. Mao, Z.; Kim, J. H.; Lee, J.; Xiong, H.; Zhang, F. ja Kim, J. S., Engineering of BODIPY-based theranostics for cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.*, **2023**, 476, 214908.
13. Durantini, A. M.; Greene, L. E.; Lincoln, R.; Martínez, S. R. ja Cosa, G., Reactive Oxygen Species Mediated Activation of a Dormant Singlet Oxygen Photosensitizer: From Autocatalytic Singlet Oxygen Amplification to Chemically Controlled Photodynamic Therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 1215–1225.

14. Mai, S.; Marquetand, P. ja González, L., A general method to describe intersystem crossing dynamics in trajectory surface hopping, *Int. J. of Quantum Chemistry*, **2015**, *115*, 1215–1231.
15. R. Ogilby, P., Singlet oxygen : there is indeed something new under the sun, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 3181–3209.
16. Borden, W. T.; Hoffmann, R.; Stuyver, T. ja Chen, B., Dioxygen: What Makes This Triplet Diradical Kinetically Persistent? *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 9010–9018.
17. Kryston, T. B.; Georgiev, A. B.; Pissis, P. ja Georgakilas, A. G., Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2011**, *711*, 193–201.
18. Agnez-Lima, L. F.; Melo, J. T. A.; Silva, A. E.; Oliveira, A. H. S.; Timoteo, A. R. S.; Lima-Bessa, K. M.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Galhardo, R. S. ja Menck, C. F. M., DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **2012**, *751*, 15–28.
19. Burton, G. J. ja Jauniaux, E., Oxidative stress, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **2011**, *25*, 287–299.
20. Kue, C. S.; Ng, S. Y.; Voon, S. H.; Kamkaew, A.; Chung, L. Y.; Kiew, L. V. ja Lee, H. B., Recent strategies to improve boron dipyrromethene (BODIPY) for photodynamic cancer therapy: an updated review, *Photochem Photobiol Sci*, **2018**, *17*, 1691–1708.
21. Yogo, T.; Urano, Y.; Ishitsuka, Y.; Maniwa, F. ja Nagano, T., Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12162–12163.
22. Lai, Y.-C.; Su, S.-Y. ja Chang, C.-C., Special Reactive Oxygen Species Generation by a Highly Photostable BODIPY-Based Photosensitizer for Selective Photodynamic Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, *5*, 12935–12943.
23. Watley, R. L.; Awuah, S. G.; Bio, M.; Cantu, R.; Gobeze, H. B.; Nesterov, V. N.; Das, S. K.; D'Souza, F. ja You, Y., Dual Functioning Thieno-Pyrrole Fused BODIPY Dyes for NIR Optical Imaging and Photodynamic Therapy: Singlet Oxygen Generation without Heavy Halogen Atom Assistance, *Chem. Asian J.*, **2015**, *10*, 1335–1343.
24. Epelde-Elezcano, N.; Palao, E.; Manzano, H.; Prieto-Castañeda, A.; Agarrabeitia, A. R.; Tabero, A.; Villanueva, A.; de la Moya, S.; López-Arbeloa, Í.; Martínez-Martínez, V. ja Ortiz, M. J., Rational Design of Advanced Photosensitizers Based on Orthogonal BODIPY Dimers to Finely Modulate Singlet Oxygen Generation, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 4837–4848.
25. Kamkaew, A. ja Burgess, K., Double-Targeting Using a TrkC Ligand Conjugated to Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Based Photodynamic Therapy (PDT) Agent, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 7608–7614.

26. Kue, C. S.; Kamkaew, A.; Lee, H. B.; Chung, L. Y.; Kiew, L. V. ja Burgess, K., Targeted PDT Agent Eradicates TrkC Expressing Tumors via Photodynamic Therapy (PDT), *Mol. Pharmaceutics*, **2015**, *12*, 212–222.
27. Kue, C. S.; Kamkaew, A.; Voon, S. H.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. ja Lee, H. B., Tropomyosin Receptor Kinase C Targeted Delivery of a Peptidomimetic Ligand-Photosensitizer Conjugate Induces Antitumor Immune Responses Following Photodynamic Therapy, *Sci Rep*, **2016**, *6*, 37209.
28. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y. ja Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Controlled Release*, **2000**, *65*, 271–284.
29. Guo, Z.; Zou, Y.; He, H.; Rao, J.; Ji, S.; Cui, X.; Ke, H.; Deng, Y.; Yang, H.; Chen, C.; Zhao, Y. ja Chen, H., Bifunctional Platinated Nanoparticles for Photoinduced Tumor Ablation, *Adv. Mat.*, **2016**, *28*, 10155–10164.