

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Studijní doktorský program: Pediatrie

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta
Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

**Lokalizace a identifikace molekulárních cílů biologicky aktivních látek
pomocí mikroskopických metod**

Mgr. Jarmila Stanková

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Olomouc 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškerou literaturu, ze které jsem čerpala. Práce byla realizována pod odborným dohledem mého školitele MUDr. Petra Džubáka, Ph.D. v Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM).

Zdroje z mé publikační činnosti během doktorského studia byly použity k vypracování této práce. Přehledový prvoautorský článek (Příloha 1) byl využit k sepsání teoretického úvodu této práce. Cíl 1 obsahuje původní prvoautorský (Příloha 2) a spoluautorský (Příloha 3) článek. Ostatní spoluautorské články jsou využity v cíle 2 (Příloha 4–5) a v cíle 3 (Příloha 6) této práce.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za odborné vedení a zaštitění mé práce. Dále děkuji řediteli Ústavu molekulární a translační medicíny doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za budování ústavu a celé infrastruktury. Jsem velmi vděčná za možnost být součástí všech projektů, které byly velmi pestré a mnoho mě naučily. Poděkování také patří všem mým spoluautorům a pracovníkům ÚMTM za poskytnutou pomoc, kdykoli jsem potřebovala. Jmenovitě děkuji svým nejbližším kolegům a přátelům Bc. Renatě Buriánové, Mgr. Dušanu Holubovi, Ph.D., Mgr. Janě Kotulové, Ph.D., Mgr. Agátě Kubíčkové, Mgr. Natálii Kudlové, Ph.D., a v neposlední řadě Mgr. Martinu Ondrovi, bez jejich podpory by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji také Mgr. Kateřině Ječmeňové a Mgr. Lukáši Lenartovi za jazykovou korekci této práce.

Práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (CZ-OPENSREEN-LM2018130, EATRIS-CZ - LM2018133), Evropským fondem pro regionální rozvoj - Projekt ENOCH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), programem EXCELES podpořeným Evropskou unií (LX22NPO5102), a interní grantovou agenturou UP IGA_LF_2023_025, IGA_LF_2022_033, IGA_LF_2021_038, IGA_LF_2020_019, IGA-LF-2019-018, IGA-LF-2018-031, IGA_LF_2017_026.

Olomouc, 3.1. 2024

Mgr. Jarmila Stanková

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Mgr. Jarmila Stanková

Název práce: Lokalizace a identifikace molekulárních cílů biologicky aktivních látek pomocí mikroskopických metod

Typ práce: dizertační

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: mikroskopie, lokalizace cíle, identifikace cíle, BODIPY, betulínová kyselina, 3HQ, digitální fázový kontrast

Počet stran: 174

Jazyk: Český

Bibliographic identification

Author's name and surname: Mgr. Jarmila Stanková

Title: Biologically active compounds' molecular target localization and identification by microscopic methods

Type of thesis: dissertation

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Supervisor: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

The year of defense: 2024

Keywords: microscopy, target localization, target identification, BODIPY, betulinic acid, 3HQ, digital phase contrast

The number of pages: 174

Language: Czech

Abstrakt:

V předložené práci byly pomocí fluorescenční mikroskopie studovány dvě odlišné skupiny konjugátů biologicky aktivních látek s různými variantami BODIPY barviva. Studie rovněž zkoumala proveditelnost fenotypové testovací metody.

Deriváty kyseliny betulinové (BA) byly testovány na buněčné linii U2OS. První skupina látek zahrnovala devět derivátů BA značených BODIPY-FL (konjugáty **1-9**), a kontrolní konjugát sestávající pouze z linkeru a BODIPY-FL značky (konjugát **10**). Po krátké inkubaci byla lokalizace těchto konjugátů pozorována v živých buňkách. Konjugát **2** vykazoval nejvyšší cytotoxicitu a rozdílný vzor barvení. Kombinace délky linkeru a struktury triterpenoidní části byly klíčové pro lokalizaci a cytotoxicitu konjugátů. Vizualizace konjugátů ve fixovaných buňkách a buněčných lyzátech naznačovala možnou kovalentní vazbu těchto derivátů na buněčné cíle. Druhá skupina látek obsahovala šest derivátů BA a bevirimatu značených BODIPY s modrou fluorescencí. Krátká inkubace ukázala lokalizaci konjugátů **11** a **16** v živých buňkách. Kolokalizační experimenty a analýzy prokázaly interakci převážně s endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi, a význam přidané aminoskupiny.

Druhá část práce se zaměřila na studium systému 3HQ-aminoBODIPY s OFF-ON efektem pro sledování uvolňování aktivní látky v buňkách. Disulfidový linker byl navržen pro řízené uvolňování léčiva v přítomnosti glutathionu. Experimenty s živými buňkami a fluorescenční mikroskopií potvrdily časově závislé uvolňování léčiva z konjugátů **17-20**. Koncept trojdílných konjugátů **20** a **21** byl ověřen s využitím c(RGDfK) motivu a FRET, kde oba konjugáty aplikované na buňky HeLa vykazaly změnu fluorescence v reálném čase. Tato studie ukazuje možnosti vytvoření teranostických nástrojů vhodných pro personalizovanou medicínu.

V poslední části práce byla provedena pokročilá analýza obrazového datasetu pořízeného digitálním fázovým kontrastem (DPC) a fluorescenční mikroskopií. Data byla analyzována programem Columbus a umělou inteligencí (AI) pomocí konvoluční neuronové sítě, což umožnilo klasifikaci inhibitorů topoizomerázy na buněčné linii U2OS s přesností až 99 %. Toto potvrzuje využitelnost DPC snímků pro klasifikaci pomocí AI a jejich aplikaci v identifikaci buněčných cílů a ve vývoji léčiv.

Abstract:

In this work, two distinct groups of conjugates of biologically active compounds with different variants of BODIPY dye were studied by fluorescent microscopy. Additionally, the research focused on a proof-of-concept study for the potential of a phenotypic screening method.

Betulinic acid (BA) derivatives were tested on the U2OS cell line, where the first set of compounds included nine BA derivatives labeled with BODIPY-FL (conjugates **1-9**), with a control conjugated containing only the linker and the BODIPY-FL label (conjugate **10**). After a short incubation, these conjugates were localized in live cells. Conjugate **2** showed the highest cytotoxicity and a different staining pattern. The combination of the linker length and the triterpenoid moiety were crucial for the localization and the cytotoxicity of the conjugates. Visualization of the conjugates in fixed cells and cell lysates suggested possible covalent binding of the derivatives to cellular targets. The second set of compounds consisted of six BODIPY-labeled BA and bevirimat derivatives with blue fluorescence. A short incubation revealed the localization of conjugates **11** and **16** in living cells. Colocalization experiments showed interaction predominantly with the endoplasmic reticulum and mitochondria, emphasizing the importance of the added amino group.

The second part of the work focused on the 3HQ-aminoBODIPY system with OFF-ON effect to monitor the release of the active drug in cells. A disulfide linker was designed to regulate drug release in the presence of glutathione. Experiments with live cells and fluorescence microscopy confirmed the time-dependent effect of drug release from conjugates **17-20**. The concept of three-part conjugates **20** and **21** was validated using the c(RGDfK) motif and FRET, where both conjugates were applied to HeLa cells, and the change in fluorescence was observed in real-time. This study highlights the potential of creating theranostics tailored for personalized medicine.

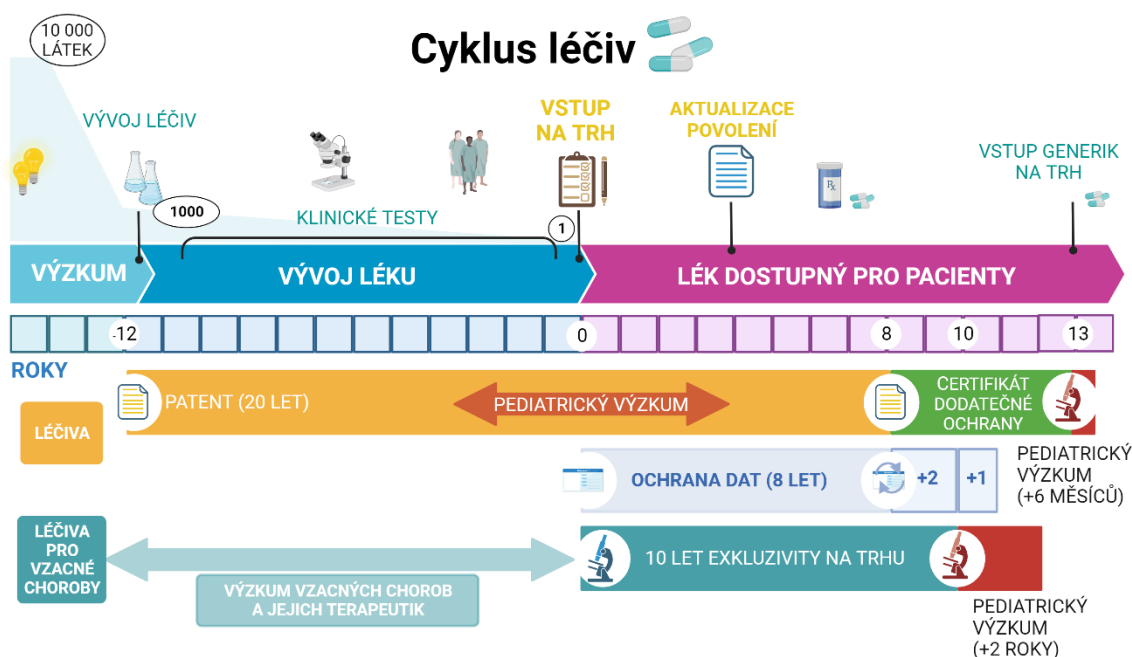
In the final section of the work, an advanced analysis of the image dataset acquired by digital phase contrast (DPC) and fluorescence microscopy was performed. The data was analyzed by the commercial program Columbus and artificial intelligence (AI) using a convolutional neural network, allowing classification of topoisomerase inhibitors on the U2OS cell line with an accuracy up to 99%. This confirms the utility of DPC images for AI classification and their application in cell target identification and drug development.

Obsah

1. Teoretický úvod.....	7
1.1. Používané metody k identifikaci molekulárního cíle léčiv	8
1.2. Mikroskopické metody vhodné pro identifikaci cílů	10
1.3. Výhody a nevýhody mikroskopických metod.....	11
1.4. Fluorescenční značení pomocí BODIPY	13
1.5. Využití BODIPY pro lokalizaci a identifikaci cílů přírodních látek.....	14
2. Specifické cíle práce.....	16
3. Lokalizace buněčných cílů derivátů kyseliny betulinové značených pomocí BODIPY	17
3.1. Úvod.....	17
3.2. Materiál a metody	21
3.3. Výsledky	26
3.4. Diskuze	39
4. Lokalizace buněčných cílů a monitorování uvolňování aktivní látky z konjugátů kyseliny 3-hydroxy-chinolinové s aminoBODIPY.	42
4.1. Úvod.....	42
4.2. Materiál a metody	45
4.3. Výsledky	48
4.4. Diskuze	57
5. Prokázání proveditelnosti vysokokapacitní fenotypové testovací metody založené na mikroskopii fázového kontrastu a analýze dat pomocí konvoluční neurální sítě	60
5.1. Úvod.....	60
5.2. Materiál a metody	65
5.3. Výsledky	67
5.4. Diskuze	73
6. Závěr	75
7. Summary.....	76
8. Seznam zkratk	77
9. Reference	79
10. Bibliografie	92
11. Přílohy	95

1. Teoretický úvod

Identifikace molekulárního cíle biologicky aktivních sloučenin je zásadním krokem ve vývoji léčiv, neboť umožňuje hlubší pochopení jejich mechanismu účinku. Tato znalost je nezbytná pro optimalizaci účinnosti a minimalizaci vedlejších účinků léčiv, a současně napomáhá v identifikaci specifickou biochemickou nebo fyziologickou cestu, kterou léčivo uplatňuje svůj terapeutický účinek. Znalost cíle umožňuje dosáhnout přesnějšího cílení léčiva a personalizace terapie. Proces identifikace molekulárního cíle často odhaluje základní mechanismy onemocnění a umožňuje vývoj cílených terapií přizpůsobených jedinečnému genetickému a molekulárnímu profilu pacienta. Jakmile je znám molekulární cíl, je možné navrhovat nové, optimalizované chemické struktury, které se zaměřují na stejné nebo příbuzné proteiny, což vede k účinnějším a bezpečnějším lékům. Identifikace nových molekulárních cílů pro existující léčiva může rozšířit jejich využití v nových případech, a tím i urychlit a zefektivnit proces vývoje léčiv.¹ Vývoj léčiv je složitý a nákladný proces, jak ilustruje **obrázek 1**. Podle dat OECD Health Statistics 2019 bylo v roce 2016 v Evropě investováno kumulativně 31,4 miliard USD do výzkumu a vývoje farmaceutik (částka je součet pro komerční a vládní sektor).



Obrázek 1: Cyklus vývoje nových léčiv, který jasně ukazuje důležitost výzkumu a vývoje ve farmaceutickém průmyslu. Převzato od EFPIA (The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations).

Identifikace molekulárního cíle v kontextu vývoje léčiv může být náročná a přináší řadu výzev. Biologické systémy jsou složité, často zahrnují síť vzájemně propojených drah a molekul, proto určit jediný cíl, odpovědný za účinky látky, je velmi obtížné. Potencionální lék může v různé míře interagovat s více cíli v různých tkáních nebo v odlišných buněčných kontextech. Některé interakce mezi malou molekulou a jejím cílem mohou mít nízkou vazebnou afinitu nebo specifitu, což ztěžuje jejich detekci a experimentální ověření. Mnoho cílů jsou proteiny, které fungují jako součást větších komplexů nebo interagují s jinými proteiny. Identifikace konkrétního člena proteinové rodiny tak může být těžká, protože členové proteinové rodiny často sdílejí strukturní a funkční podobnosti. Některá léčiva fungují prostřednictvím nekonvenčních mechanismů, jako je modulace konformace proteinů a interakce s DNA a RNA, jejichž identifikace pomocí tradičních metod může být náročná. V dalších případech mohou cílit na vzácné, nebo dříve neznámé proteiny, což znovu ztěžuje jejich identifikaci pomocí konvenčních metod. Vytěžení rozsáhlých biologických dat, jako jsou data z genomiky a proteomiky, je výpočetně náročné a vyžaduje odborné znalosti v oblasti bioinformatiky. Překonání těchto výzev při identifikaci molekulárních cílů často zahrnuje kombinaci experimentálních přístupů, výpočetních metod a mezioborové spolupráce. Pokročilé technologie, jako jsou strukturní biologie a vysokopropustné testování, pomáhají řešit tyto výzvy a usnadňují objevování cílů biologicky aktivních látek.² Je však důležité si uvědomit, že identifikace cíle je komplexní a vyvíjející se oblast ve výzkumu a vývoji léčiv, zejména v kontextu nových terapií a personalizované medicíny.

1.1. Používané metody k identifikaci molekulárního cíle léčiv

K identifikaci molekulárního cíle aktivních látek lze použít řadu metod a přístupů, přičemž jejich výběr závisí na specifických vlastnostech léku a povaze onemocnění, které má ovlivnit. Následující výčet možných metod zahrnuje ty nejčastěji využívané, nebo poskytující zajímavou perspektivu.

- Vysokopropustné testování (high-throughput screening, HTS) je založeno na testování velkého souboru chemických sloučenin (knihoven) proti specifickému biologickému cíli nebo molekulární dráze. Sloučeniny, které vykazují aktivitu, jsou dále validovány, aby se určily jejich specifické molekulární cíle.³

- Fenotypové testování posuzuje vliv chemických sloučenin na fenotyp buňky nebo celého organismu.⁴ Podrobnější zhodnocení fenotypového testování je uvedeno v kapitole 5 této práce.

- Techniky RNA interference zahrnují umlčení exprese specifických genů pomocí metod jako je například CRISPR/Cas9 nebo siRNA. Takto upravené modelové prostředí může být dále použito i ve spojení s HTS.⁵

- Omické analýzy lze použít k identifikaci molekulárních drah ovlivněných aktivními sloučeninami. Posouzení změn genové exprese ve vzorcích v reakci na ošetření látkou může poskytnout informace o jejich účincích na specifické dráhy a potenciální cílové geny a proteiny.⁶

- Chemická proteomika využívá sondy s navázanou testovanou molekulou. Díky tomu je možné selektivně vylákat a identifikovat cílové proteiny. Tato metoda je užitečná pro analýzu cílů, které nelze identifikovat tradičními metodami.⁷

- Profilování proteinů na základě aktivity (Activity-Based Protein Profiling, ABPP), zahrnuje použití sond s malou molekulou, které selektivně reagují se specifickými třídami proteinů. Označením látky vhodnou sondou je možné identifikovat proteiny, které interagují s testovanou sloučeninou v buněčném kontextu.⁸

- Hmotnostní spektrometrii lze použít k identifikaci látek, které interagují s proteinem. Tento přístup je zvláště užitečný pro detekci přímých interakcí mezi látkou a jejím cílem, a to v případě kovalentních i nekovalentních interakcí.⁹

- Metody strukturní biologie využívají techniky jako je rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance (NMR) a mohou být použity k určení trojrozměrné struktury a ověření vazby chemické látky na cílový protein.¹⁰

- Analýza rozsáhlých biologických dat může pomoci identifikovat potenciální cíle nových chemických sloučenin. Takové analýzy zahrnují využití dat genové exprese, sítě interakcí protein-protein a známých interakcí biologicky aktivní sloučenina – molekulární cíl. Do tohoto přístupu patří chemoinformatické a bioinformatické analýzy. Při známé struktuře biologicky aktivní sloučeniny, lze k predikci molekulárních cílů využít vyhledávání podobnosti a molekulární dokování.¹¹

- Vědecká literatura a vytěžování veřejně dostupných databází mohou poskytnout cenné informace o známých vztazích mezi chemickými sloučeninami a jejich cíli, což pomáhá při identifikaci nových cílů.¹²

Ve výzkumné praxi se často kombinují různé metody ke zvýšení pravděpodobnosti úspěšné identifikace molekulárního cíle. Výběr konkrétní metody závisí na faktorech jako je povaha aktivní chemické sloučeniny, dostupné zdroje a specifické cíle identifikace.

1.2. Mikroskopické metody vhodné pro identifikaci cílů

Významnou roli v procesu identifikace cílů biologicky aktivních látek hrají mikroskopické metody. Tento soubor metod může být cenným nástrojem, zejména při studiu účinků látek na buněčné struktury a organely. Mikroskopie umožňuje odhalit změny v buněčné morfologii a subcelulárních strukturách, například změny způsobené cytotoxickými látkami. Chemické sloučeniny mohou vyvolat smršťování buněk, tvorbu „bublin“ – tedy přeskupení obsahu cytoplazmy, jadernou kondenzaci a změny ve struktuře organel. Tyto morfologické změny mohou poskytnout vodítka k objasnění mechanismu účinku látky. Mikroskopie tedy umožňuje vizualizovat buňky a jejich vnitřní komponenty v požadovaném rozlišení. Označení specifických buněčných struktur nebo molekul, které jsou předmětem zájmu, je možné díky různým technikám barvení. Použití specifických fluorescenčních sond a barviv může pomoci vizualizovat a sledovat různé buněčné složky, jako jsou DNA, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, lysozomy atd. Pozorováním změn v distribuci a intenzitě fluorescenčních kanálů je možné získat náhled na vliv látky na dané struktury a organely.¹³

Při klasickém barvení pomocí imunofluorescence se nejdříve ošetřené buňky tzv. fixují, kdy dochází k jejich konzervaci v daném stavu a částečnému narušení membrán díky působení roztoků alkoholů, acetonu nebo formaldehydu. Následuje krok úplné permeabilizace membrán a specifické barvení pomocí fluorescenčně značených protilátek. Takovýmto barvením je možné určit, zda daná látka ovlivňuje distribuci specifického proteinu v buňce.^{14,15}

Zobrazení živých buněk umožňuje sledovat dynamické buněčné procesy v reálném čase. To je zvláště užitečné pro sledování účinků látky na chování buněk, včetně změn v buněčné motilitě, dělení a migraci. Některé aktivní látky mají rychlé a dynamické účinky na buněčné procesy.¹⁶ Zavedením trvalých fluorescenčních markerů nebo proteinů do živých buněk, například pomocí transdukce fúzních proteinů, je možné specifické struktury fluorescenčně vizualizovat.¹⁷ Mikroskopie živých buněk, také umožňuje pořizování časosběrných záběrů, kdy dochází k pořízení snímků v pravidelných intervalech po delší dobu. To může odhalit časovou dynamiku buněčných změn a změny funkcí subcelulárních struktur vyvolaných působením aktivní látky.¹⁸ Tato mikroskopická metoda může být kombinována s technikami subcelulární frakcionace a izolace, které oddělí požadované buněčné kompartmenty a poskytnou tak cenný zdroj materiálu pro doplňující metody, například sestavení proteomického profilu.¹⁹

Studium kolokalizace látky s buněčnými složkami nebo organelami může poskytnout cenné informace o potenciálních interakcích s cíli. Když látka a její cíl kolokalizují, naznačuje to

přímou interakci.²⁰ V takovýchto případech často najde uplatnění technika FRET (z anglického Förster resonance energy transfer), která odhaluje blízkost mezi dvěma fluorescenčními značkami, a tím i jejich nositeli. Označením látky a potencionálního cílového proteinu fluorofory, z nichž jeden je aktivovaný pouze při přenosu energie, můžeme při změně ve fluorescenčním signálu usuzovat na jejich těsnou blízkost a vzájemnou interakci.²¹

Automatická mikroskopie^{22,23}, často kombinovaná s analýzou s vysokým obsahem informací (high-content analysis, HCA), dává možnost simultánního zkoumání mnoha buněčných parametrů, reagujících na působení aktivní součiny. Takový přístup poskytuje velmi komplexní data pro identifikaci cíle. Tyto metody je navíc možné propojit v HTS platformě, což umožňuje testování velkého počtu sloučenin a hodnocení jejich účinků na morfologii buňky.^{24,25}

Další možností, jak využít mikroskopické techniky je jejich spojení s jinými metodami, například proteomickými a genomickými přístupy. Tohoto se často využívá při tzv. „single cell“ analýzách, které jsou na vzestupu hlavně v poslední době. Studování individuálních buněk dovoluje odhalit heterogenitu v buněčné populaci a hlouběji pochopit buněčné pochody. Takové propojení technik nachází uplatnění kromě výzkumu a vývoje léčiv i ve výzkumu kmenových buněk, neurovědách a studiu mikrobiomu.^{26,27}

1.3. Výhody a nevýhody mikroskopických metod

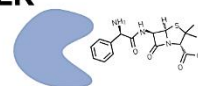
Jako každý technologický přístup, nabízí mikroskopické metody četné výhody a nevýhody. Je proto vždy na zvážení, zda ve vybraných případech bude zvolená metoda přínosem, nebo naopak překážkou k určení molekulárního cíle aktivních látek.

Mezi výhody patří přímá vizualizace buněčných struktur a procesů, možnost pozorování v reálném čase a určení prostorové celulórní a subcelulórní lokalizace místa působení látky. Pokročilé mikroskopické techniky s vysokým rozlišením poskytují snímky s detailním zobrazením, což umožňuje rozpoznat i velmi jemné nuance interakcí látky s cílovými stukturami. Tyto metody detekují nejen strukturální, ale i funkční důsledky působení látek, což pomáhá pochopit jejich účinky na buněčné procesy. Některé techniky, jako je HCA, umožňují analýzu více buněčných parametrů současně, čímž se zvyšuje účinnost identifikace cíle. Mikroskopie živých buněk není destruktivní metoda, což umožňuje její kombinaci s dalšími přístupy a pořád vycházet z jednoho zdroje vzorku.^{13,28}

K nevýhodám mikroskopických metod patří jejich technická náročnost, zejména pak nároky na specializované vybavení a odborné znalosti nejen v oblasti přípravy vzorků, ale hlavně analýzy získaných dat. Dále může mikroskopie vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům, pokud procesy značení nebo barvení nejsou pečlivě optimalizovány nebo pokud má látka účinky mimo testovaný cíl. Mikroskopické metody mohou identifikovat pouze cíle, které jsou viditelné a ovlivněné látkou, potenciálně tedy ztrácíme informace o důležitých nepřímých nebo nadřazených cílech, které nevykazují morfologické změny. Některé mikroskopické techniky mohou vyžadovat invazivní metody přípravy vzorků, které mohou změnit přirozený stav buněk a ovlivnit výsledky. Mikroskopie nemusí být vhodná pro identifikaci neproteinových cílů, jako jsou malé molekuly, metabolity nebo nukleové kyseliny, které mohou vyžadovat jiné techniky, jako je hmotnostní spektrometrie nebo testy založené na afinitě. Některé experimenty založené na mikroskopii, zejména zobrazování živých buněk, mohou být časově náročné. Konvenční mikroskopie může mít omezení v rozlišení struktur v nanoměřítku, což vyžaduje použití pokročilých technik se super rozlišením.^{13,28}

Přes tyto všechny nevýhody jsou mikroskopické metody cennými nástroji pro identifikaci molekulárních cílů biologicky aktivních látek, díky jejichž schopnosti lze přímo vizualizovat buněčné procesy. Shrnutí mikroskopických metod vhodných pro identifikaci molekulárních cílů látek a jejich výhod a nevýhod je uvedeno na **obrázku 2**.

IDENTIFIKACE CÍLE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK



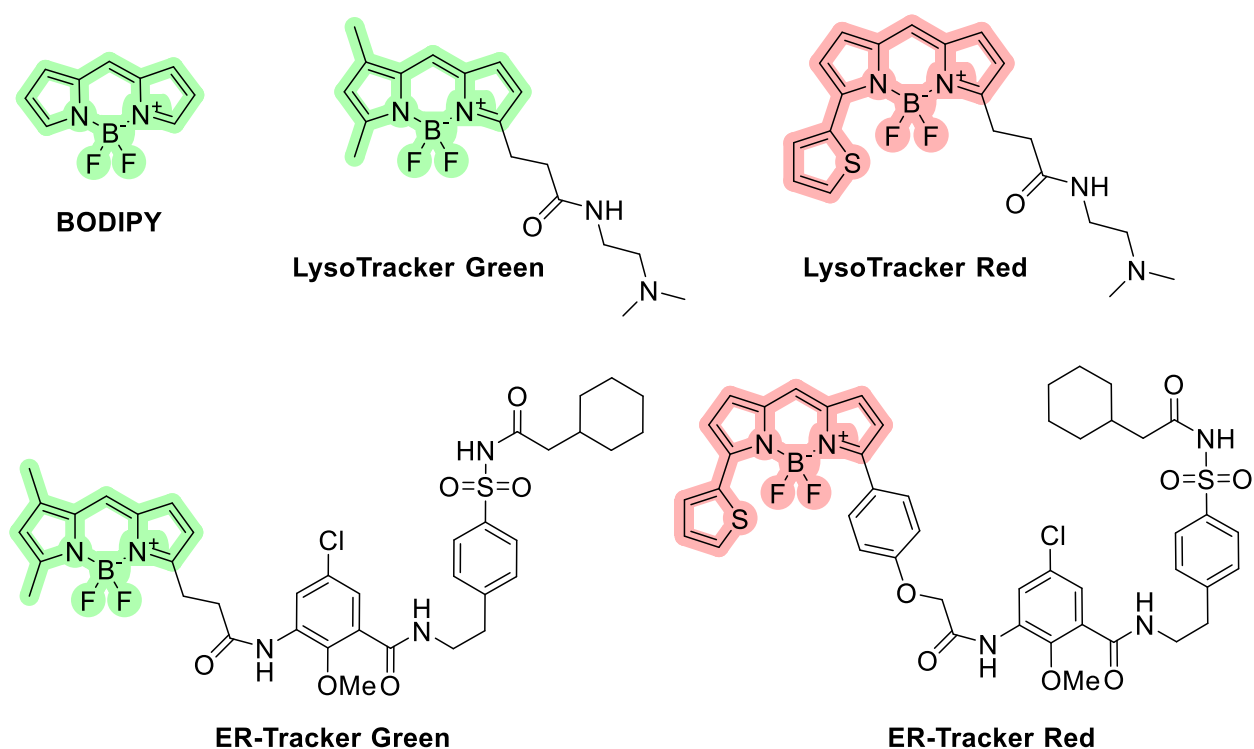
METODA		VÝHODY	NEVÝHODY
Imunofluorescence		Velmi specifické pro daný protein	Nutnost fixovat buňky
		Široké spektrum protilátek	Omezený multiplexing
Mikroskopie živých buněk Fluorescenční Ve světlém poli		Detekce v reálném čase	Omezený multiplexing
		Specifická v případě fúzních proteinů	Náročná na přípravu
		Časoběžné záběry	Náročná na zpracování dat
		"Label-free"	Pouze omezené struktury
Automatická mikroskopie		Sběr mnoha dat	Náročná na zpracování dat
		Možnost zapojit do HTS	Požadavky na techniku
"High-Content Analysis"		Komplexní informace	Náročná na zpracování dat
		Možnost zapojit do HTS	Požadavky na techniku
Analýza jedné buňky		Pochopení klonální evoluce	Náročná na přípravu
		Pochopení buněčné heterogenity	Náročná na zpracování dat

Obrázek 2: Přehled mikroskopických metod vhodných pro identifikaci molekulárních cílů aktivních látek.

1.4. Fluorescenční značení pomocí BODIPY

Techniky fluorescenční mikroskopie jsou široce používány k vizualizaci biologických molekul a jevů. Z tohoto důvodu byly vyvinuty různé fluorescenční sondy pro zobrazení biologických komponent. Tradičně používané fluorescenční proteiny mohou být dále spojeny s cílovou sekvencí peptidu nebo proteinu, vytvářejíce fluorescenční fúzní proteiny. Nicméně tento přístup má i své nevýhody, kdy se může narušit původní funkce proteinu. Pro překonání těchto překážek byly vyvinuty sondy na základě malých chemických molekul, které nabízejí menší velikost, jednodušší úpravy a variabilní možnosti fluorescence, a to i v oblasti blízkého infračerveného spektra.²⁹ Ideální luminofory, pro tyto sondy, představují BODIPY barviva

(z anglického boron-dipyrrromethene), které se vyznačují intenzivními a zářivými barvami, vysokou molární absorptivitou a fluorescenční emisí v širokém rozsahu vlnových délek. Tyto vlastnosti je činí vhodnými pro techniky využívající fluorescenci, jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie a bioobrazování. BODIPY barviva se také běžně používají jako fluorescenční sondy k detekci a monitorování biologických procesů, včetně interakcí protein-protein, enzymové aktivity a buněčné lokalizace. Jejich klíčové charakteristiky lze snadno změnit pomocí přímých strukturálních modifikací.³⁰ Prvním komplexem, který byl publikován v roce 1968, je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen.³¹ Struktura BODIPY je uvedena na **obrázku 3**. Mimo experimentálně připravené sondy s BODIPY jsou některé také komerčně dostupné, jako například LysoTracker a ER-Tracker (zobrazené na **obrázku 3**).

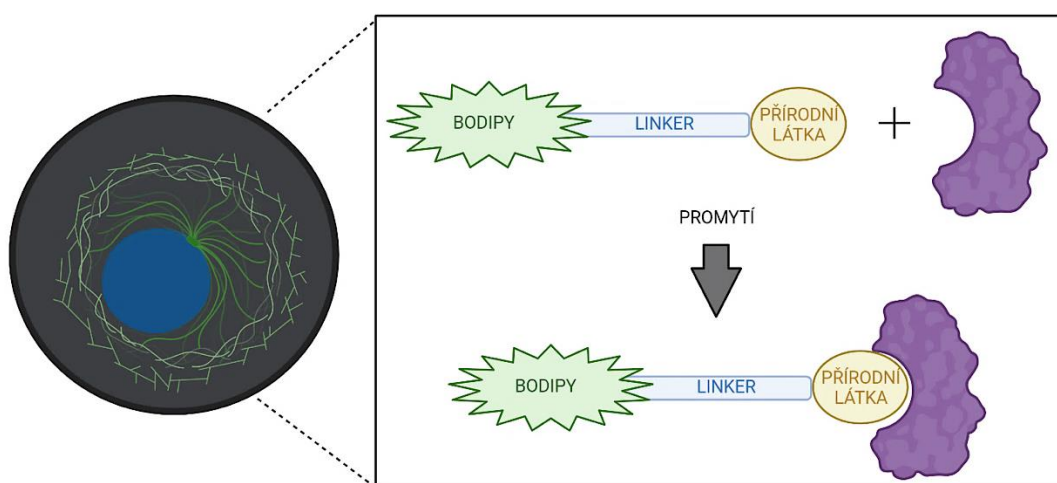


Obrázek 3: Molekulární struktura 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen – BODIPY, LysoTracker Green (emituje v zelené části spektra) a Red (červeně emitující), ER-Tracker Green (emituje v zelené části spektra) a Red (červeně emitující).

1.5. Využití BODIPY pro lokalizaci a identifikaci cílů přírodních látek

V posledních letech byl učiněn významný pokrok v identifikaci mechanismu účinku a buněčných cílů přírodních látek. Pro efektivní identifikaci cílových proteinů a studium mechanismu účinku je nutné vyvinout strategie, které citlivě detekují biologické procesy v živých systémech.³² Fluorescenčně značené sondy bioaktivních přírodních látek se již

dlouhou dobu používají^{33,34} a ukázaly se jako mocný nástroj pro zkoumání biologických jevů a mechanismů působení těchto molekul.^{35,36} Tento přístup umožňuje sledování vstupu látky do buňky a její distribuci v subcelulárních kompartmentech, jak je schematicky znázorněno na **obrázku 4**.³⁷ Pokud je interakce dostatečně silná, můžeme na gelu po separaci proteinů z buněčného lyzátu pomocí SDS-PAGE (z anglického sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) pozorovat fluorescenční bandy, které odpovídají proteinům interagujícím s fluorescenční látkou. Tento postup umožňuje vizualizaci cílového komplexu fluorescenční látka-protein i v denaturačních podmínkách.³⁸



Obrázek 4: Schéma principu detekce přírodních látek značených BODIPY v živých buňkách.

Biokonjugát se skládá z luminoforu konjugovaného s biologicky aktivní přírodní látkou prostřednictvím linkeru. Luminofor může fungovat jako aktivní látka, například ve fotodynamické terapii, kde působí jako fotosenzibilizátor.³⁹ Vyvinuté biokonjugáty BODIPY vykazují v kontextu lékařského a biochemického výzkumu různorodé vlastnosti, které jsou závislé na použitých strukturách a metodě konjugace.⁴⁰

2. Specifické cíle práce

Výsledky předkládané dizertační práce jsou rozděleny do 3 částí, přičemž každá z nich se věnuje využití mikroskopických metod k lokalizaci nebo identifikaci buněčných cílů biologicky aktivních látek.

Cíl 1: Lokalizace buněčných cílů derivátů kyseliny betulinové značených pomocí BODIPY.

Cíl 2: Lokalizace buněčných cílů a monitorování uvolňování aktivní látky z konjugátů kyseliny 3-hydroxy-chinolinové s aminoBODIPY.

Cíl 3: Prokázání proveditelnosti vysokokapacitní fenotypové testovací metody založené na mikroskopii fázového kontrastu a analýze dat pomocí konvoluční neurální sítě.

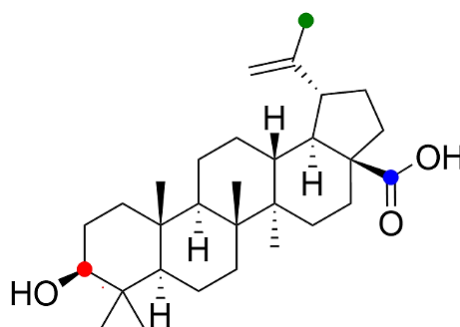
3. Lokalizace buněčných cílů derivátů kyseliny betulinové značených pomocí BODIPY

3.1. Úvod

Terpeny a terpenoidy zahrnují širokou a různorodou skupinu organických sloučenin, nacházejících se v mnoha různých rostlinách a dalších organizmech. Jsou složeny z opakujících se izoprenových jednotek, a mohou mít různou škálu struktur a funkčních skupin, což přispívá k rozmanitosti jejich biologických aktivit.⁴¹ Některé z těchto přírodních sloučenin mají například protizánětlivé vlastnosti^{42,43}, zatímco jiné mají antitumorigenní^{44,45}, antibakteriální⁴⁶, antivirovou^{47,48} a protinádorovou⁴⁹ aktivitu.

Triterpeny obsahují šest izoprenových jednotek, díky čemuž jsou větší než většina ostatních terpenů. Mají charakteristickou strukturu, která se skládá z několika fúzovaných kruhů, což jim dává strukturální rigiditu.⁵⁰ Jedním z primárních mechanismů účinku terpenů je jejich schopnost modulovat různé signální dráhy v buňkách. Triterpeny mohou inhibovat různé enzymy, například protizánětlivé jako jsou cyklooxygenáza a lipxygenáza.⁵¹ Mohou také aktivovat jaderné receptory, jako je gama receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorem⁵², což hraje roli v regulaci metabolismu glukózy a lipidů. Dalším společným mechanismem je down-regulace dráhy NF-κB a potlačení produkce cytokinů.⁵³ Zajímavé je, že triterpeny inhibují efluxní pumpu MDR1, což by mohlo být potenciálně využito ke zvýšení účinnosti léků.⁵⁴ Dále mohou indukovat apoptózu, ve srovnání se současnými protinádorovými léčivy, je hlavní výhodou spouštění apoptózy vnitřní cestou, nezávislou na signalizaci poškození DNA.^{55,56} V tomto případě je mitochondriální membrána permeabilizována, cytochrom c se uvolňuje z mitochondrií do cytoplazmy, kde se podílí na tvorbě apoptozomu.⁵⁷ Vzhledem k jejich slibným výsledkům v protinádorovém výzkumu je velmi důležité studovat jejich mechanismus účinku.

Kyselina betulinová (BA) je přírodní pentacyklický triterpen lupanového typu (struktura na **obrázku 5**). I přes svou nízkou rozpustnost ve vodných roztocích si tato látka získává pozornost svými zajímavými biologickými vlastnostmi. BA je často derivatizována pro zvýšení rozpustnosti, terapeutických účinků a zacílení na konkrétní místo účinku.⁵⁸ BA je také selektivně cytotoxická pro řadu nádorových buněk⁵⁹⁻⁶¹ a aktivní proti HIV-1.⁶² Díky různorodým mechanismům působení BA je možné předcházet vzniku rezistence, což ji činí slibným kandidátem pro léčbu nádorů odolných vůči běžným chemoterapeutikům.



Obrázek 5: Molekulární struktura kyseliny betulínové s vyznačenými pozicemi pro derivatizaci. (C3 – červená tečka, C28 – modrá tečka, C30 – zelená tečka)

Jedním z mechanismů je přímé působení BA na mitochondriální membránu⁵⁵, a dále indukce tvorby reaktivních forem kyslíku, které způsobují nespecifické poškození mitochondrií.⁶³ Podobným způsobem je inhibován růst nádoru, pomocí úplného nebo částečného zpomalení angiogeneze⁶⁴, které je dosaženo modulací mitochondrií.⁶⁵ Dalším popsaným mechanismem účinku je inhibiční aktivita vůči topoizomeráze I28, a modulace funkce transkripčních faktorů Sp1, Sp3 a inhibice faktoru Sp4, prostřednictvím na proteazomu nezávislé regulační dráze.⁶⁶

V minulosti bylo prokázáno, že BA má anti-HIV-1 aktivitu. I když výsledky testů nebyly převratné a účinek byl pozorován pouze při relativně vysokých koncentracích.⁶² Tento objev vedl k syntéze několika dalších analogů, jedním z analogů se silnou anti-HIV-1 aktivitou byl 3-O-(3,3-dimethylsukcinát) betulínové kyseliny, známý jako bevirimat (BT).⁶⁷ BT působí jako inhibitor zrání virionu HIV-1, přičemž inhibice zrání virových částic se zdá být kritickým bodem terapie. Během fáze zrání virová proteáza štěpí Gag polyprotein, za současného uvolňování jednotlivých strukturních proteinů. Posledním krokem je štěpení p25 CA-SP1 na funkční protein p24 CA. Inhibice posledního kroku zrání má za následek vznik virové částice s aberantně vytvořenými zralými jádry, která nejsou dále schopna infekce.⁶⁸ BT postoupil do druhé fáze klinického testování^{69,70}, během níž byla pozorována redukce viru u 40–50 % pacientů. Zbytek pacientů si vyvinul rezistenci v důsledku přirozené polymorfni variace v polyproteinu Gag.⁷¹ S tímto výsledkem byly klinické studie ukončeny.

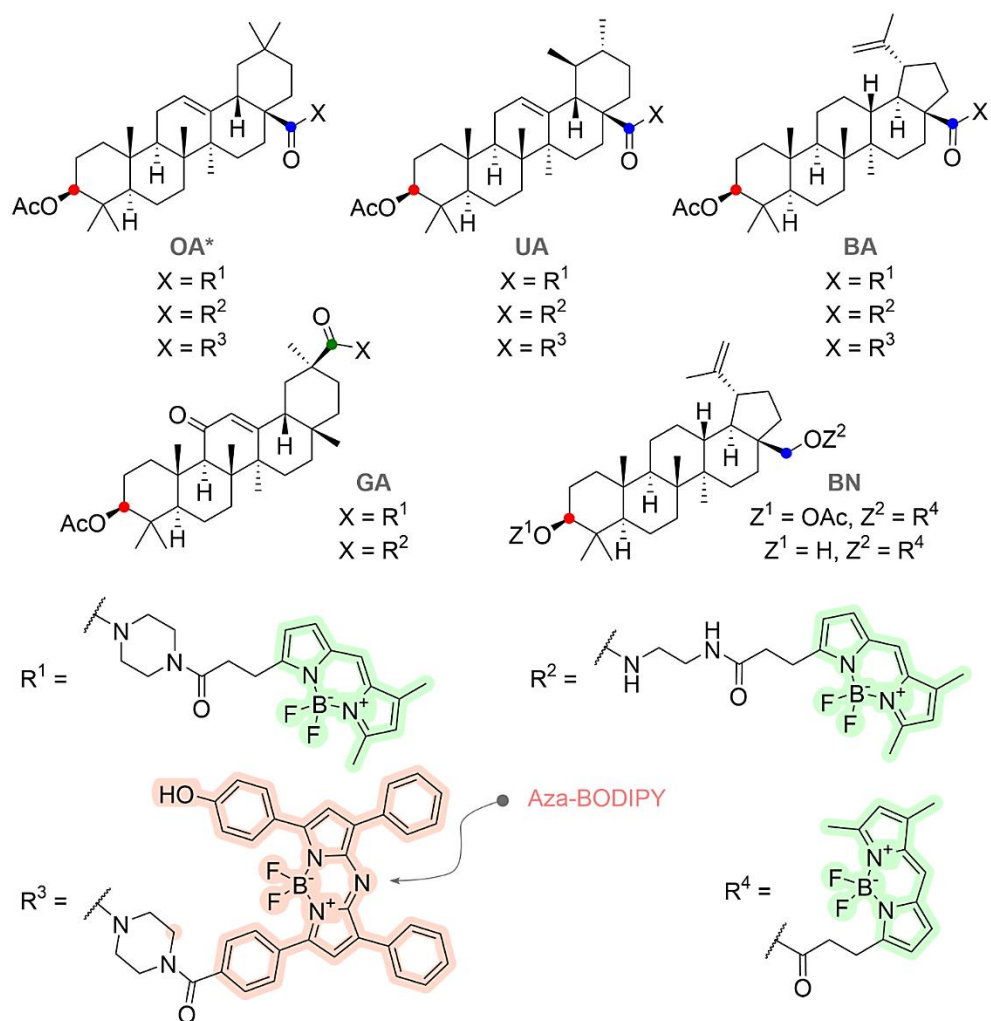
Vzhledem k vlastnostem BA zmíněných výše není překvapením, že se jí zabývalo mnoho výzkumných skupin. Za poslední dobu byly připraveny stovky derivátů, s derivatizací však očekávaný efekt často zmizel, rychle se vyvinula rezistence nebo dramaticky vzrostla toxicita pro nenádorové buňky. K nejčastějším modifikacím BA dochází v polohách C-3 a C-28 (zobrazeno na **obrázku 5**). Adice na dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C-20 a C-30 obvykle

aktivitu výrazně nezvýší, naopak, aktivita často mizí. Toto zjištění obecně platí jak pro protinádorové, tak pro anti-HIV účinky.⁷²⁻⁷⁴ Nedávné práce potvrdily, že přítomnost další aminové skupiny konjugované na molekulu BA může významně zvýšit protinádorovou aktivitu.^{75,76}

V literatuře můžeme nalézt výsledky konjugace triterpenových karboxylových kyselin, triterpenu betulinu a derivátu bevirimat s fluorescenčními barvivy BODIPY.⁷⁷⁻⁸² Všechny tyto příklady jsou zaměřeny na samotnou syntézu, doplněnou o základní biologickou charakterizaci konjugátů. První studii popisující konjugaci BA s BODIPY provedli Krajčovičová a kol. v roce 2018. (Příloha 3, dále shrnuto v podkapitole 3.3 Výsledky a 3.4 Diskuze). V návaznosti na toto téma Brandes a kol. publikovali práci zaměřenou na konjugáty BA, oleanové kyseliny, ursolové kyseliny, glycyrrhetinové kyseliny a betulinu s BODIPY-FL; všechny struktury triterpen-BODIPY konjugátů jsou na **obrázku 6**. Jejich publikace ukázala vliv různých linkerů mezi triterpeny a BODIPY molekulou. Rozdíl v cytotoxicitě, závislý na zvoleném linkeru, dokazuje důležitost a význam vhodného linkeru mezi triterpenem a primární skupinou.⁷⁸ Později Brandes a kol. publikovali syntézu a charakterizaci triterpenoidů značených aza-BODIPY, potencionálně využitelných jako próby pro značení endoplazmatického retikula. Konjugáty triterpenoid-aza-BODIPY nevykazovaly žádnou cytotoxicitu na různých buněčných liniích.⁸³

Nejrozsáhlejší výsledky byly získány ve studii BA upravené polárními skupinami a BODIPY s modrou fluorescencí. Toto barvivo je jedinečným příkladem v literatuře a je velmi vhodné pro fluorescenční aplikace. Oproti běžně používaným kumarinům převyšuje fotochemické vlastnosti a v porovnání s klasickým BODIPY-FL dokáže zachovat přirozené vlastnosti konjugátů. Analoga značená BODIPY s modrou fluorescencí odvozená od BA byla připravena v práci Kodr a kol. (Příloha 2, součástí podkapitoly 3.3 Výsledky a 3.4 Diskuze).

Kromě BODIPY byly triterpenové konjugáty syntetizovány a studovány s různými dalšími fluorescenčními značkami. Významnou skupinu publikovaných prací představují konjugáty s rhodaminem a první výsledky byly shrnuty v přehledu od Hoenke a kol. v roce 2020.⁸⁴ Na základě výsledků uvedených v těchto pracech je mitokanický efekt (nejčastější účinek těchto molekul) závislý také na použitém linkeru, kdy je aminový linker účinnější než piperazinylový. Konjugáty mohou cílit na mitochondriální NADH dehydrogenázu a mitochondriální sukcinátdehydrogenázu, které jsou součástí mitochondriálního elektronového transportního řetězce, což vede ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku.⁸⁴



Obrázek 6: Molekulární struktury triterpen-BODIPY sond (*acylové zbytky OA oleanová kyselina; UA ursolová kyselina, BA betulínová kyselina, GA glycyrrhetinová kyselina, BN betulín) konjugovaných prostřednictvím amidové nebo esterové skupiny na C-3 (červená tečka) nebo C-28 (modrá tečka) nebo C-30 (zelená tečka) pozice molekuly triterpenu.

3.2. Materiál a metody

Pro testování jsme použili buněčnou linii U2OS odvozenou od osteosarkomu a zakoupenou z americké sbírky tkáňových kultur (ATCC). Buněčná linie byla udržována v TPP 75 cm² tkáňových kultivačních lahvích a kultivována v McCoyově 5a kultivačním médiu s 10% fetálním telecím sérem, za standardních kultivačních podmínek při 37 °C a 5% CO₂. Buněčné suspenze byly připraveny podle instrukcí ATCC pro subkultivaci. Všechny testované látky byly rozpuštěny v 100% roztoku DMSO, byl u nich proveden test cytotoxicity (MTS test) a skladovány byly v monitorovaných podmínkách chemické knihovny ÚMTM.

Seznam použitých chemikálií a roztoků:

0,5M Tris-HCl zaostřovací gel pufr, pH=6,8 (kat. č. 161-0799, BIO-RAD)

1,5M Tris-HCl separační gel pufr, pH=8,8 (kat. č. 161-0798, BIO-RAD)

10× Tris-glycin-SDS (10× TGS) elektrodový pufr (kat. č. 1610772, BIO-RAD)

5× SDS lyzační pufr (30% glycerol, 10% SDS, 250 mM TRIS/HCl, 0,5 M DTT, 0,06% bromfenolová modř)

Aceton 100% (kat. č. 20001-ATO, LECH-NER)

Akrylamid/Bis roztok (30%) 29:1 (kat. č. 161-0156, BIO-RAD)

Bromfenolová modř (kat. č. B0126, SIGMA ALDRICH)

Chlorid draselný (KCl) (kat. č. APO-30076, SIGMA ALDRICH)

Chlorid sodný (NaCl) (kat. č. A131428, MIKROCHEM)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (kat. č. APO-30016, LECH-NER)

Dodecylsírán sodný (SDS) (kat. č. 71729, SIGMA ALDRICH)

ER-Tracker (kat. č. E34250, INVITROGEN)

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (kat. č. 20203, USB)

Fluorid sodný (NaF) (kat. č. 450022, SIGMA ALDRICH)

Glycerol (kat. č. G5516, SIGMA ALDRICH)

Hoechst 33342 (kat. č. H21492, INVITROGEN)

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (kat. č. 30388APO, LECH-NER)

Metanol (kat. č. 10202LP20-10000, MIKROCHEM)

Ortovanadičnan sodný (Na_3VO_4) (kat. č. S6508, SIGMA ALDRICH)

10× PBS pufr s inhibitory (5 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM Na_3VO_4 , 5mM NaF, 1mM PMSF rozpuštěného v 1 ml 100% methanolu, celé do 1 l, 1× PBS, pH = 7,4)

Peroxodisíran amonný (APS) (kat. č. A3678, SIGMA ALDRICH)

Pyrofosfát sodný ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (kat. č. P8010, SIGMA ALDRICH)

Separální gel 12% (3 ml Akrylamid/Bis roztok (30%) 29:1, 1,875 ml 1,5 M Tris-HCl o pH = 8,8, 75 µl 10% SDS, 75 µl 10% APS, 2,475 ml H_2O a 3 µl TEMED)

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (kat. č. 26634, THERMOFISHER SCIENTIFIC)

Tetrahydrofuran (THF) (kat. č. 34865-1L, SIGMA ALDRICH)

Tetramethylethyldiamin (TEMED) (kat. č. 15524-010, INVITROGEN)

Trichloroctová kyselina (TCA) (kat. č. BP80, CHEMAPOL)

Zaostřovací gel (412,5 µl Akrylamid/Bis roztok (30%) 29:1, 312,5 µl 0,5 M Tris-HCl o pH = 6,8, 25 µl 10% SDS, 25 µl 10% APS, 1,75 ml H_2O a 5 µl TEMED)

Postup práce při mikroskopii živých buněk ošetřených deriváty BA značených BODIPY-FL

Buňky U2OS (2500 buněk v objemu 30 µl v jamce) byly nasazeny do 384jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a preinkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO_2 pro stabilizaci. Buňky byly následně ošetřeny testovanými konjugáty BA-BODIPY v koncentraci 50 µM pomocí Echo®550 liquid handler (Labcyte, USA) a poté inkubovány při 37 °C a 5% CO_2 po dobu 3 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly buňky značeny barvivem Hoechst v koncentraci 1,62 µM při 37 °C a 5% CO_2 po dobu dalších 20 minut. Dále byly

obarvené buňky dvakrát opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazování živých buněk bylo provedeno pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Živé buňky byly monitorovány s objektivem 60× s vodní imerzí. Všechny snímky byly následně zpracovány, včetně odečtení pozadí a dekonvoluce pomocí softwaru Image J.

Postup práce při mikroskopii živých buněk ošetřených deriváty BA značených BODIPY-FL a značených ER-Trackerem

Postup je totožný s výše uvedeným, pouze při přidání barviva Hoechst byl přidán i ER-Tracker v koncentraci 1 µM po dobu 20 minut.

Postup práce při mikroskopii fixovaných buněk ošetřených deriváty BA značených BODIPY-FL

Postup je opět totožný s výše uvedeným, až na následující: Obarvené buňky byly dvakrát opláchnuty čerstvým médiem a jednou PBS pufrem, s posledním fixačním krokem pomocí ledového roztoku 70% methanolu. Zobrazování fixovaných buněk bylo provedeno pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko), buňky byly mikroskopovány objektivem 60× s vodní imerzí.

Postup práce při detekci derivátů BA značených BODIPY-FL po separaci na SDS-PAGE

Dva milióny U2OS buněk bylo vysazeno na kultivační misku, po 24 hodinách prekulivace byly buňky ošetřeny látkami (50 µM) po dobu 3 nebo 4 hodin. Po uplynutí inkubace byly buňky dvakrát promyty PBS pufrem s inhibitory a dvakrát pouze PBS pufrem. Dále byl v poměru 1:5 naředěn 5×SDS lyzační pufr a PBS pufr s inhibitory. Tento roztok o objemu 300 µl byl přidán do každé misky s ošetřenými buňkami, buňky byly lyzovány a lyzát byl přenesen do eppendorf zkumavek. Buněčné lyzáty byly povařeny 10 minut při 95 °C. Po vychladnutí byly vzorky bezprostředně separovány pomocí SDS-PAGE, nebo zamrazeny při -20 °C pro pozdější použití.

Pro SDS-PAGE byly použity 1,5 mm polyakrylamidové gely. Nejprve byl nalit 12% separační gel a po zatuhnutí byl navrstven zaostřovací gel. Elektroforéza probíhala v přítomnosti ledového 1× TGS pufru a po nanesení 15 µl vzorku byl spuštěn zdroj nastavený na 110 V. Po projití vzorků zaostřovacím gelem bylo napětí zvednuto na 130 V. Jakmile bromfenolová modř dorazila ke spodnímu okraji gelu, byla elektroforéza ukončena. Následně byl gel skenován na laserovém skeneru pro biomolekulární zobrazování Thyphoon FLA9000 Fluorescence Scanner.

Pokud byly vzorky před SDS-PAGE precipitovány TCA/Aceton metodou, bylo to podle následujícího postupu. Aceton použitý v tomto postupu byl vychlazený a po celou dobu protokolu udržovaný na ledu. Vzorky se smíchaly v poměru 1:8:1 s acetonem a TCA (vzorek : aceton : TCA), proteiny vyprecipitovaly po 1 hodině při -20 °C. Následně se vzorky centrifugovaly při 18 000 g a 4 °C po dobu 15 minut. Peleta byla zcela resuspendována v 1 ml ledového acetonu. Tento postup promytí pelety byl opakován celkem čtyřikrát. Po posledním opakování byl aceton nahrazen THF a vzorky byly opět centrifugovány. Poté byl THF odebrán a peleta se nechala vysušit v digestoři při pokojové teplotě. Peleta byla rozpuštěna v původním objemu SDS lyzačního pufru.

Postup práce při mimikroskopii živých buněk ošetřených deriváty BA značených BODIPY s modrou fluorescencí

Buněčná linie U2OS byla transdukováána komerčními lentivirovými částicemi (Vectalis-TaKaRa, Japonsko) se sekvencemi, které exprimují fluorescenční proteinovou značku mCherry cílenou do specifických subcelulárních lokalit. Všechny buněčné linie byly připraveny podle instrukcí výrobců. Buněčná linie U2OS-Nuc byla připravena za použití rLV.EF1.mCherry-Nuc-9 (kat. č. 0023VCT), obsahujícího sekvenci NLS, která importuje proteiny do jádra. Buněčná linie U2OS-ER byla transdukováána pomocí rLV.EF1.mCherry-ER-9 (kat. č. 0025VCT), obsahující signální sekvenci kalretikulinu a sekvenci KDEL, které asociují proteiny s endoplazmatickým retikulem. Buněčná linie U2OS-Mito byla připravena s použitím vektoru rLV.EF1.mCherry-Mito-9 (kat. č. 0024VCT), obsahující mitochondriální signální sekvenci. Buněčná linie U2OS-GA byla transdukováána pomocí rLV.EF1.mCherry-Golgi-9 (kat. č. 0022VCT), obsahující lidský GT prekurzor, protein lokalizovaný v Golgiho aparátu. Kompletní popis výroby buněčných linií a jejich validace pomocí MTS testu jsou uvedeny v HLADÍKOVÁ, E. Použití lentivirových reportérových systémů pro fluorescenční vizualizaci subcelulárních struktur. Olomouc, 2020. bakalářská práce. UPOL. Přírodovědecká fakulta <https://library.upol.cz/ar1-upol/cs/csg/?repo=upolrepo&key=14732436594>.

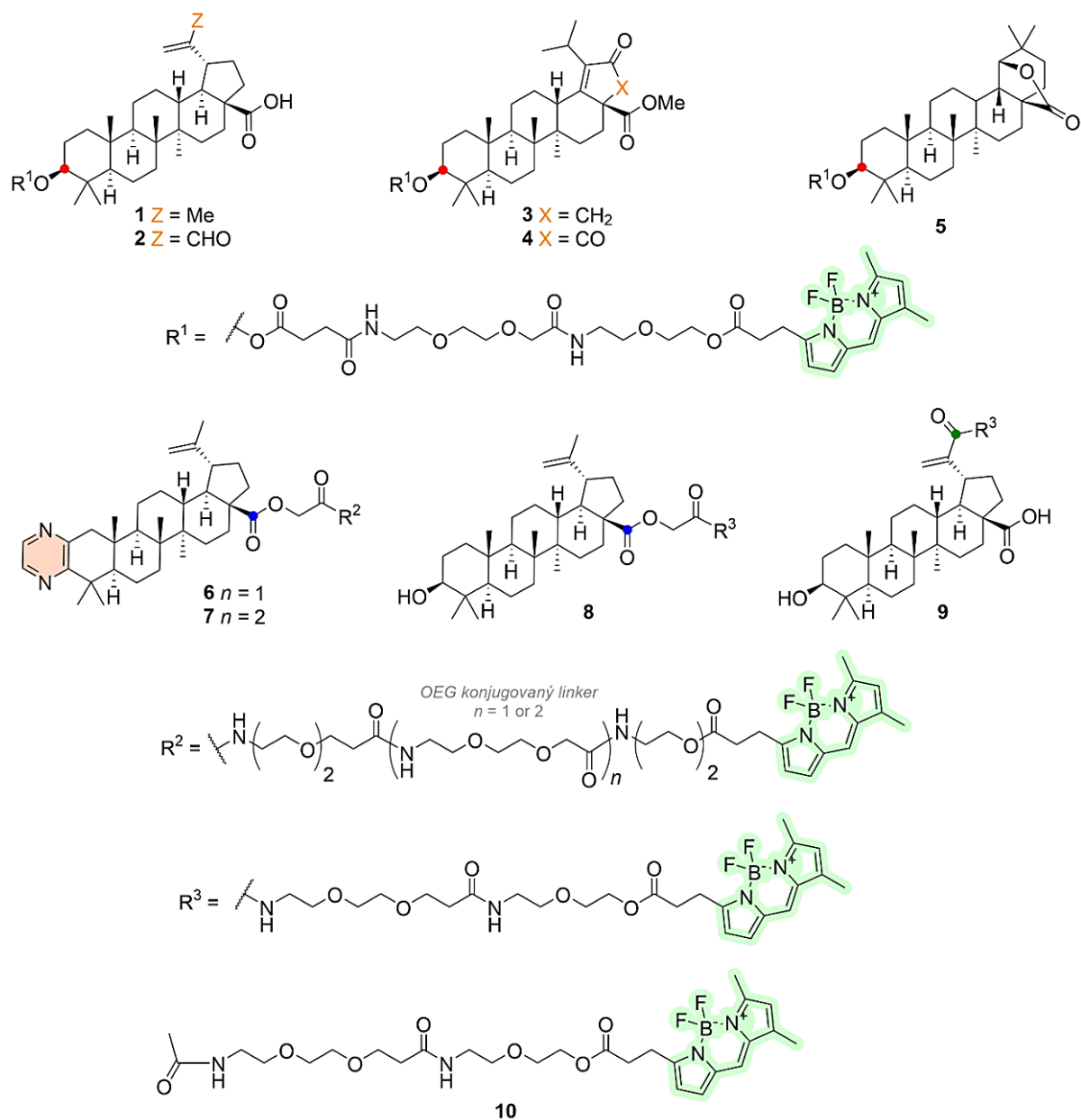
Buněčné linie U2OS exprimující fluorescenční fúzní proteiny byly nasazeny (v počtu 1000 buněk v objemu 30µl v jamce) do 384jamkových destiček CellCarrier (PerkinElmer, USA) a preinkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Adherované buňky byly ošetřeny testovanými sloučeninami v koncentraci 10 µM (Echo®550 liquid handler, Labcyte, USA) po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení živých buněk bylo provedeno konfokálním mikroskopem Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C

v atmosféře 5% CO₂. Živé buňky byly mikroskopovány objektivem 60× s vodní imerzí. Fluorescenční signál byl excitován lasery (405 nm a 561 nm) a požadovaná emise byla filtrována pomocí pásmových filtrů (BP 445/45 a BP 595/20). Všechny snímky byly následně zpracovány v softwaru Image-J, Pearsonův a Mandersův kolokalizační koeficienty byly vypočítány pomocí plug-in modulu JACoP.

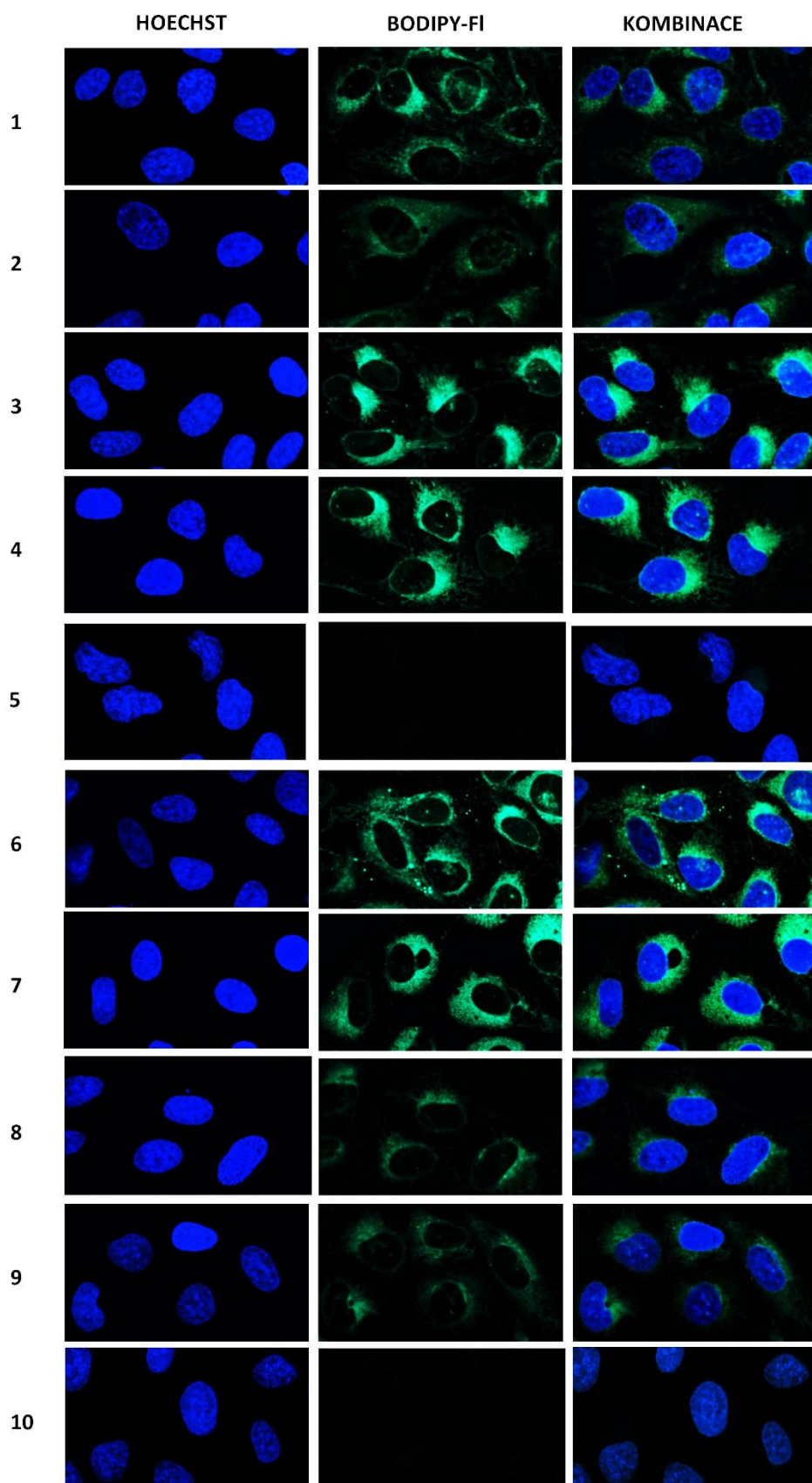
3.3. Výsledky

Deriváty BA značené BODIPY-FL – výsledky publikované v Krajčovičová a kol. 2017 (Příloha 3) a doplňující výsledky.

Skupina devíti derivátů BA značených BODIPY-FL byla studována na buněčné linii U2OS, přičemž kontrolou byl samostatný linker s BODIPY-FL značkou (struktury na **obrázku 7**). Po krátké inkubaci (3h) byly všechny testované konjugáty (50 μ M), s výjimkou derivátů **5** a **10**, lokalizovány v živých buňkách. Snímky mikroskopie živých buněk jsou uvedeny na **obrázku 8**. Vzor barvení odpovídal strukturám endoplazmatického retikula a mitochondrií, což jsme chtěli potvrdit kolokalizačními experimenty. Bohužel fluorescenční signál ER-Trackeru byl kontaminován signálem testovaných konjugátů, jako příklad je uveden konjugát **7** na **obrázku 9**. Kromě pozorování červeného fluorescenčního signálu při mikroskopii buněk ošetřených konjugátem **7**, jsme testovali i samostatný konjugát **7** v HEPES pufru (**obrázek 9**). Kvůli kontaminaci signálu jsme provedli experiment, kdy ošetřené buňky byly po promytí médiem zafixovány ledovým methanolem, tento přístup by umožnil provést více dalších promývacích kroků. Detekce konjugátů ve fixovaných buňkách ukázala přítomnost konjugátů **2**, **7** a **9** a s nízkou intenzitou fluorescence u konjugátů **1**, **3** a **4**, avšak vzor značení byl odlišný oproti nefixovanému barvení. Toto nás přivedlo k hypotéze o existenci možné kovalentní vazby derivátů na buněčný cíl, proto byla provedena SDS-PAGE za denaturujících podmínek. Fluorescenční detekce signálu v gelu, odpovídající fluorescenci BODIPY-FL, je na **obrázku 11**. Signál byl přítomen i u vzorků, kde po precipitaci proteinů TCA/Aceton metodou došlo k promytí THF, který je silným organickým rozpouštědlem a mělo by velmi dobře odmyt nenavázané fluorescenční konjugáty (**obrázek 11B**).

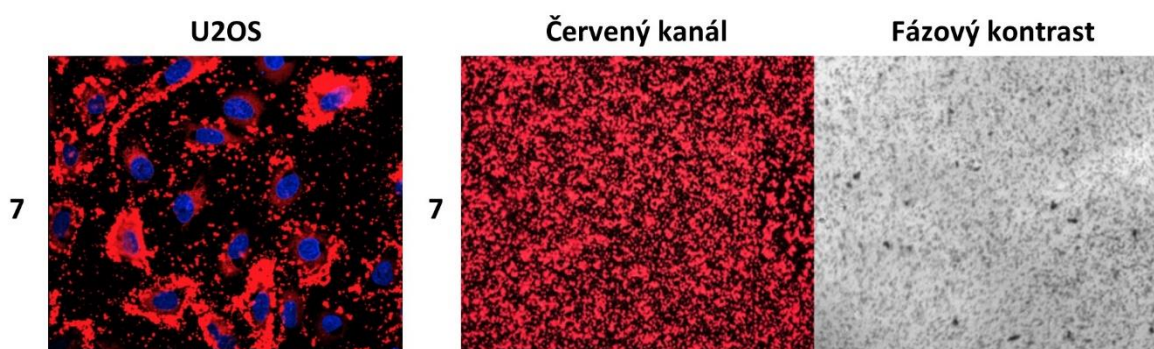


Obrázek 7: Molekulární struktury testovaných BODIPY derivátů kyseliny betulínové 1–9, konjugovaných prostřednictvím esterové skupiny na C-3 (červená tečka) nebo C-28 (modrá tečka) nebo C-30 (zelená tečka) pozice molekuly triterpenu. Konjugát 10 – linker s BODIPY bez triterpenové struktury.

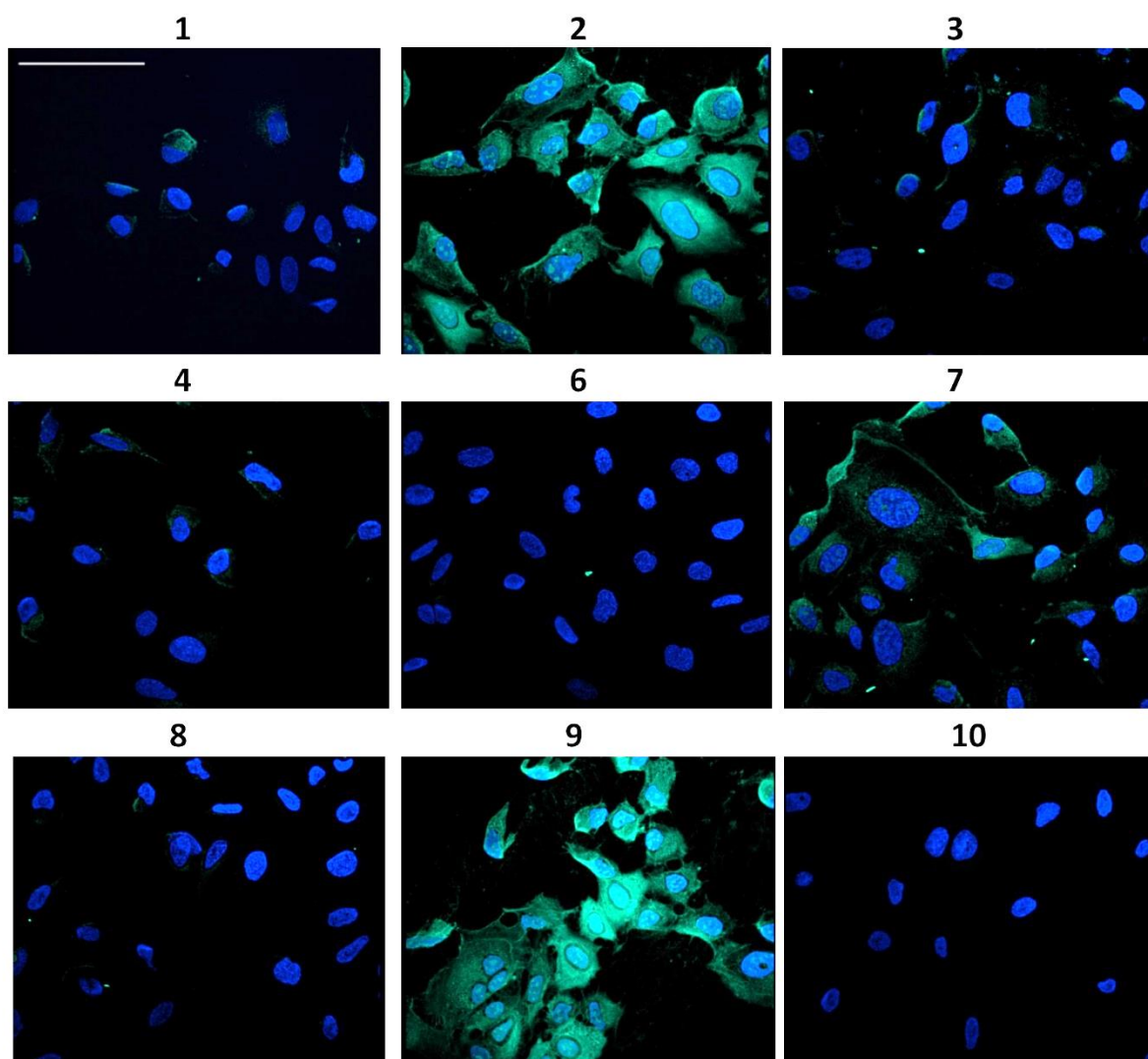


Obrázek 8: Buněčná linie U2OS ošetřená testovanými konjugáty 1–9. ▼

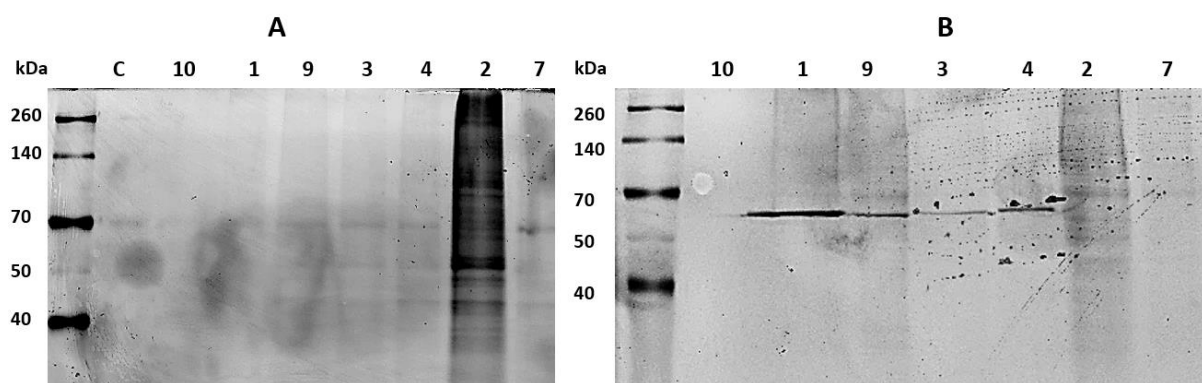
▲ Buněčná linie U2OS ošetřená testovanými konjugáty **1–9** a kontrolním konjugátem **10**. Buňky byly ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 3 hodin, jádra byla nabarvena Hoechst a následně byly buňky dvakrát opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$, modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, zelený kanál = Ex 488 nm, Em BP 515/30 nm.



Obrázek 9: Buněčná linie U2OS ošetřená konjugátem **7** (červený signál), v koncentraci 50 μ M, po dobu 3 hodin a jádra naznačená Hoechst (modrý signál). Buňky byly před zobrazením dvakrát promyty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$, modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561nm, Em BP 595/20 nm. Konjugát **7** rozpuštěný v HEPES pufru (50 μ M) a nasnímaný v červeném fluorescenčním kanále a fázovým kontrastem. Zobrazení objektivem 20 $\times$ pro červený kanál = Ex 561nm, Em BP 595/20 nm a objektivem 20 $\times$ PH Long W.D., pro fázový kontrast.



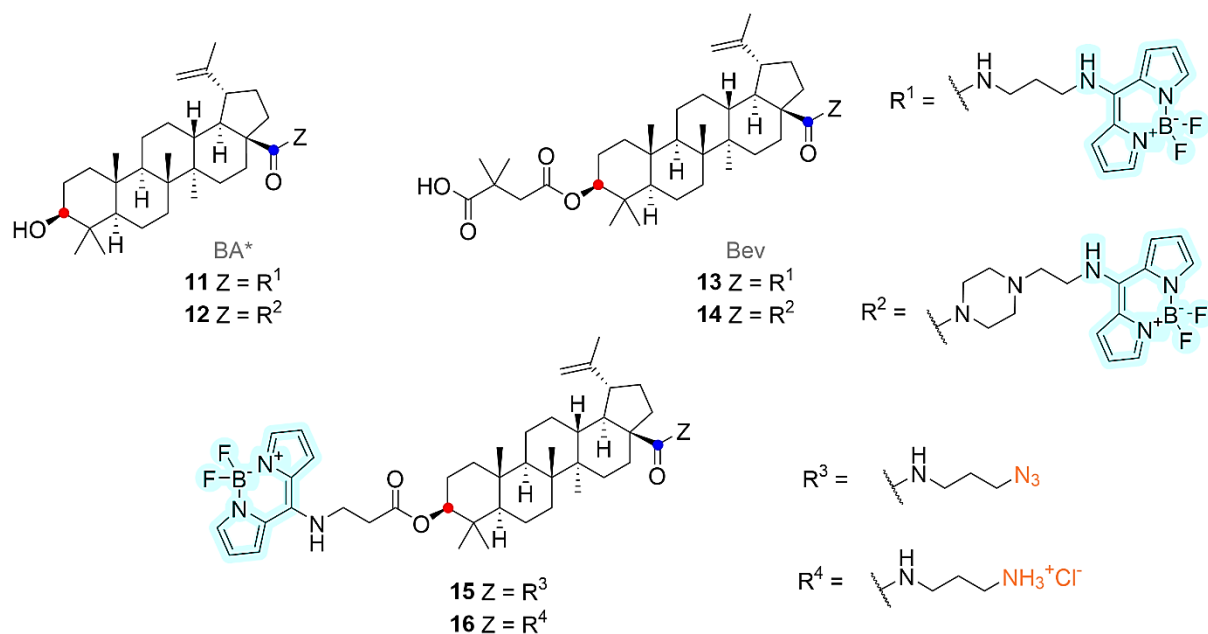
Obrázek 10: Buněčná linie U2OS ošetřená testovanými konjugáty **1–9** a kontrolním konjugátem **10**. Buňky byly ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 3 hodin, jádra byla nabarvena Hoechst, následně byly buňky dvakrát opláchnuty čerstvým médiem a poté zafixovány vychlazeným methanolem. Zobrazení bylo provedeno pomocí objektivu 60 $\times$ (měřítko 100 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm a zelený kanál = Ex 488 nm, Em BP 515/30 nm.



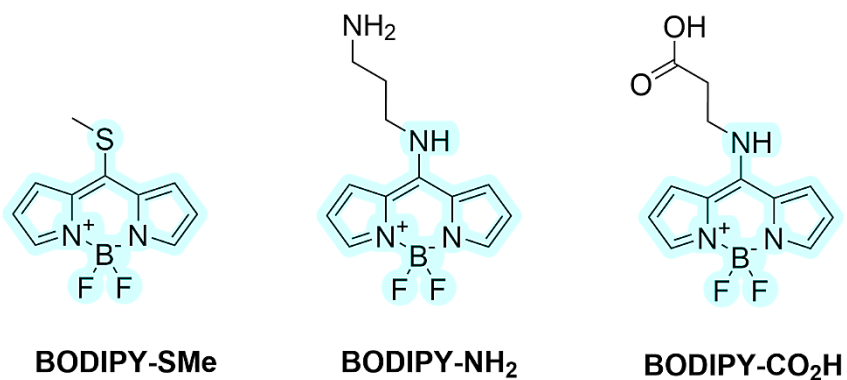
Obrázek 11: SDS-PAGE separace U2OS buněčných lyzátů ošetřených testovanými konjugáty 1–9 a kontrolním konjugátem 10. Detekce fluorescenčního signálu BODIPY-FL pomocí Thyphoon FLA9000 Fluorescence Scanner, Ex = 488 nm, Em = LPB (>510 nm). **A** – Buňky U2OS byly ošetřeny látkami v koncentraci 50 μ M po dobu 3 hodin, následně byly promyty PBS roztokem a lyzovány SDS lyzačním pufrem. **B** – Buňky U2OS byly ošetřeny látkami v koncentraci 50 μ M po dobu 4 hodin, následně byly promyty PBS roztokem a lyzovány SDS lyzačním pufrem. Před samotnou SDS-PAGE byly vzorky vysráženy TCA/Aceton metodou a promyty THF.

Deriváty BA značené BODIPY s modrou fluorescencí – výsledky publikované v Kodr a kol. 2021 (Příloha 2).

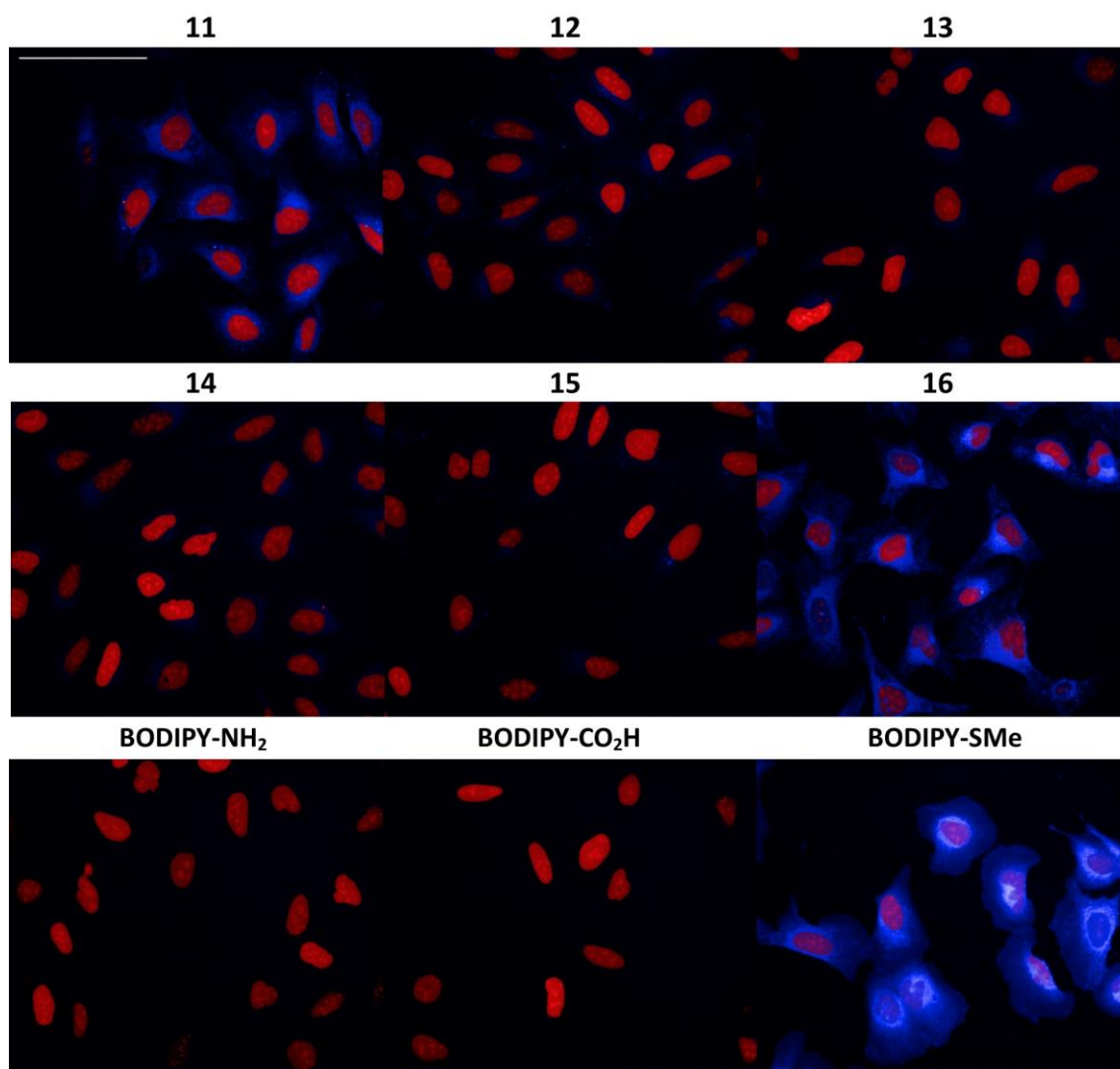
Skupina šesti derivátů BA a BODIPY (struktury na **obrázku 12**) byla studována na buněčné linii U2OS-Nuc s jádrem značeným fluorescenčním proteinem mCherry. Jako kontrola byla použita funkční barviva BODIPY (BODIPY-NH₂ a BODIPY-CO₂H), stejně jako prekurzor **BODIPY-SMe** (struktury BODIPY kontrolních derivátů jsou na **obrázku 13**). Všechny fluorescenční mikroskopické snímky tohoto pilotního experimentu jsou zobrazeny na **obrázku 14**. Pro dosažení lepší specifity barvení jsme se zaměřili na krátkou inkubaci s fluorescenčními konjugáty. Po krátké inkubaci (1 h) byly konjugáty **11** a **16** z této skupiny derivátů lokalizovány v živých buňkách, ale pouze se slabým signálem v jádře studované buněčné linie (**obrázek 15B** – Pearsonův a Mandersův koeficient). Funkční BODIPY barviva nebyla v buněčné linii U2OS-Nuc detekována, a proto je vysoce pravděpodobné, že buněčná penetrace konjugáty **11** a **16** je způsobena jejich skupinami na struktuře BA. Další studované deriváty BA a BODIPY nebyly za našich experimentálních podmínek v živých buňkách detekovány; je však možné, že signál bude možné pozorovat v pozdějších intervalech. **BODIPY-SMe** je reaktivní díky 8-thiomethylové skupině a bylo předpokládáno, že proniká do buněčných kompartmentů; toto bylo potvrzeno fluorescenční mikroskopií (**obrázek 14–18**). Pro další studium buněčné lokalizace konjugátů **11** a **16** jsme se rozhodli pokračovat fluorescenční mikroskopií na buněčných liniích s fluorescenčně značenými strukturami endoplazmatického retikula, mitochondrií a Golgiho aparátu, což jsou nejvíce publikované cíle BA (dále rozvedeno v 3.4 Diskuze). Výsledky těchto kolokalizačních experimentů jsou ukázány na **obrázku 15**. Oba konjugáty prokázaly přítomnost ve více buněčných strukturách. Pearsonův koeficient, který byl použitý k hodnocení kolokalizace (**obrázek 15B**) ukázal nejvyšší korelaci signálu v buněčné linii U2OS-ER a poté v buněčné linii U2OS-Mito a nejnižší korelace byla naměřena v buněčné linii U2OS-GA. Když jsme kolokalizaci vyjádřili Mandersovým koeficientem (překrytí červeného kanálu – subcelulární struktura oproti modrému kanálu - látka), který je specifitější pro výpočet kolokalizace signálu prezentovaného ve více buněčných strukturách, získaná data ukázala, že oba konjugáty **11** a **16** téměř dokonale značí mitochondrie a endoplazmatické retikulum. Nejnižší kolokalizační signál byl opět detekován v buněčné linii U2OS-GA. **BODIPY-SMe** byl použit na základě dat z pilotního experimentu jako pozitivní kontrola s perfektní kolokalizací ve všech studovaných buněčných liniích. Celá zorná pole, ze kterých byl vytvořen **obrázek 15A** jsou na **obrázcích 16–18**.



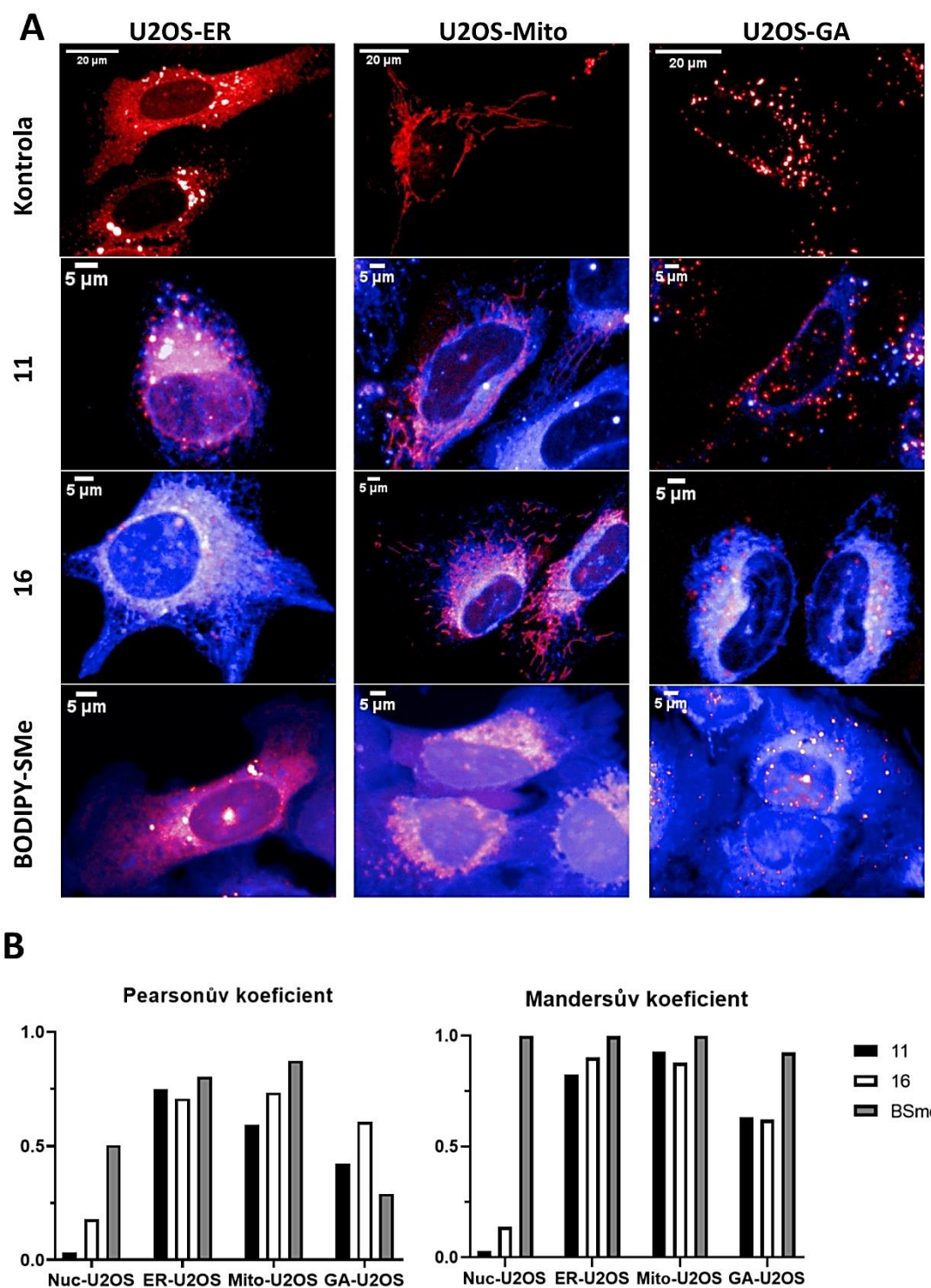
Obrázek 12: Molekulární struktury testovaných triterpen-BODIPY derivátů kyseliny betulínové **11–16**, konjugovaných prostřednictvím esterové skupiny na C-28 (modrá tečka) nebo C-3 (červená tečka) pozice molekuly triterpenu.



Obrázek 13: Molekulární struktury kontrolních BODIPY derivátů bez struktury BA.

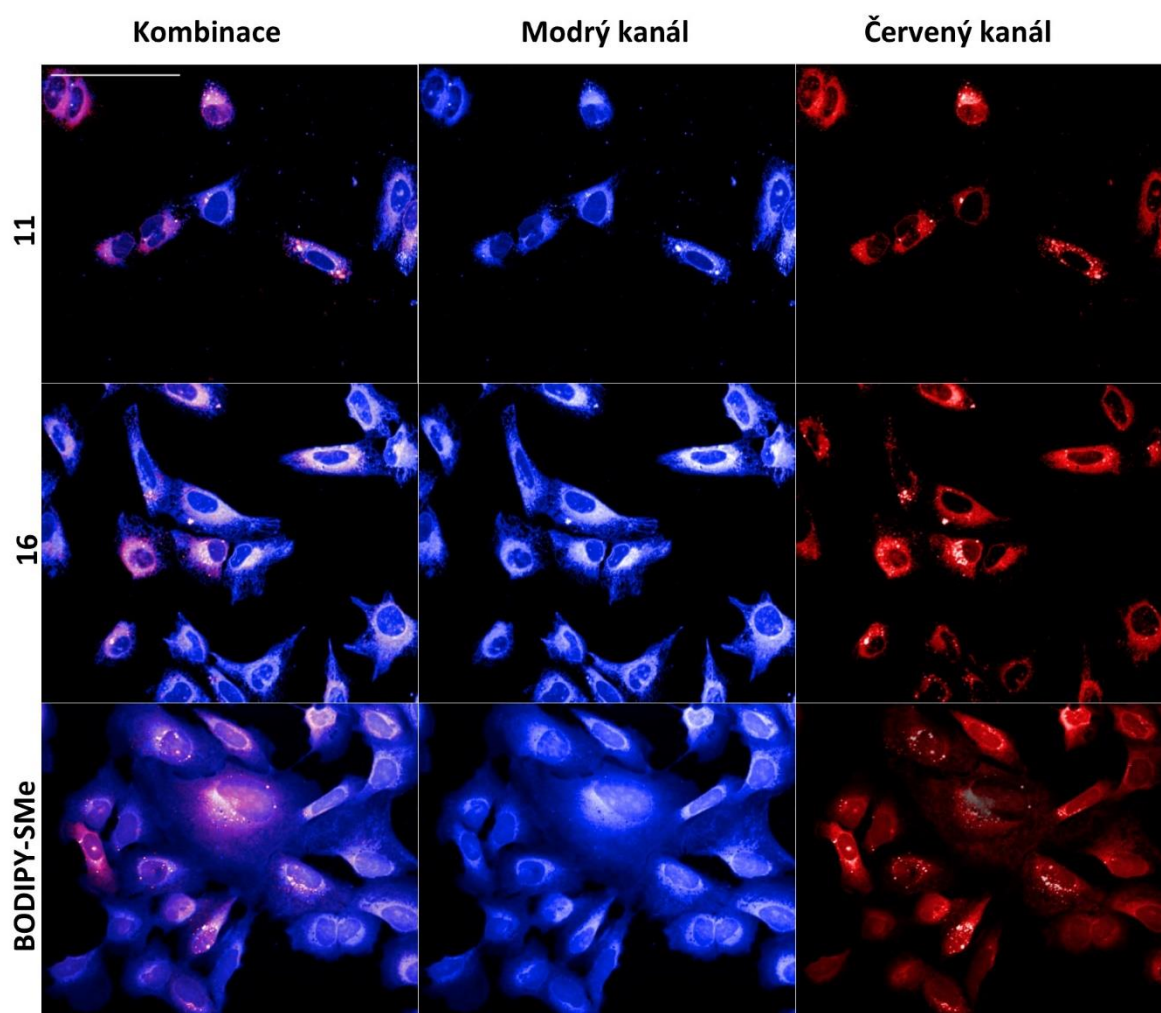


Obrázek 14: Buněčná linie U2OS, se značeným jádrem mCherry fluorescenčním proteinem, ovlivněná testovanými triterpen-BODIPY **11–16** a kontrolními BODIPY deriváty. Buňky byly ošetřeny 10 μ M koncentrací látky po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 100 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561nm, Em BP 595/20 nm.

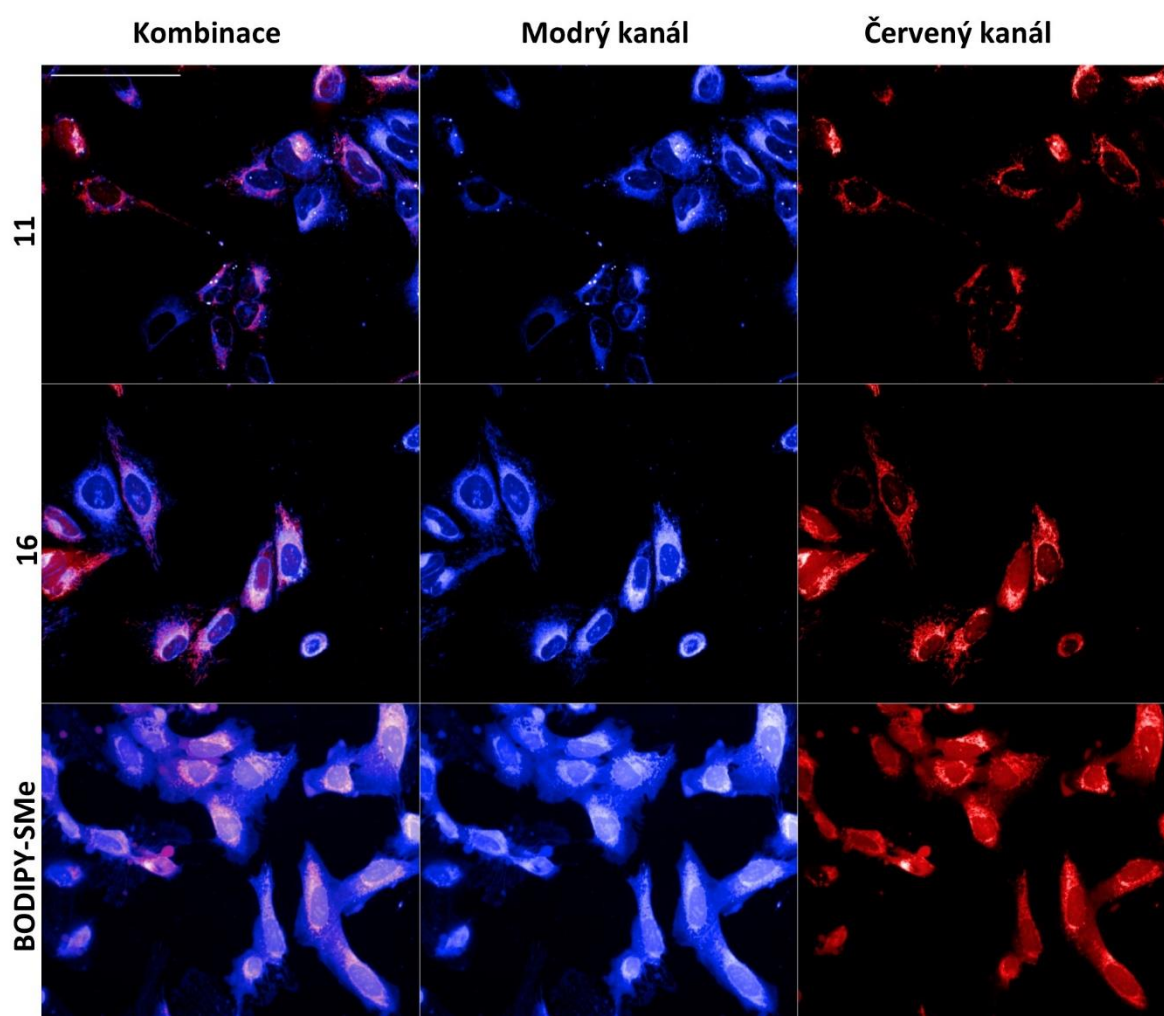


Obrázek 15: A – Buněčná linie U2OS, se značenými subcelulárními strukturami mCherry fluorescenčním proteinem, ovlivněná testovanými triterpen-BODIPY **11** a **16** a kontrolním **BODIPY-SMe** derivátem, neošetřené buňky představují **kontrolu**. Buňky byly ošetřeny 10 μ M koncentrací látky po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko uvedeno u výřezu snímku), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561 nm, Em BP 595/20 nm. ▼

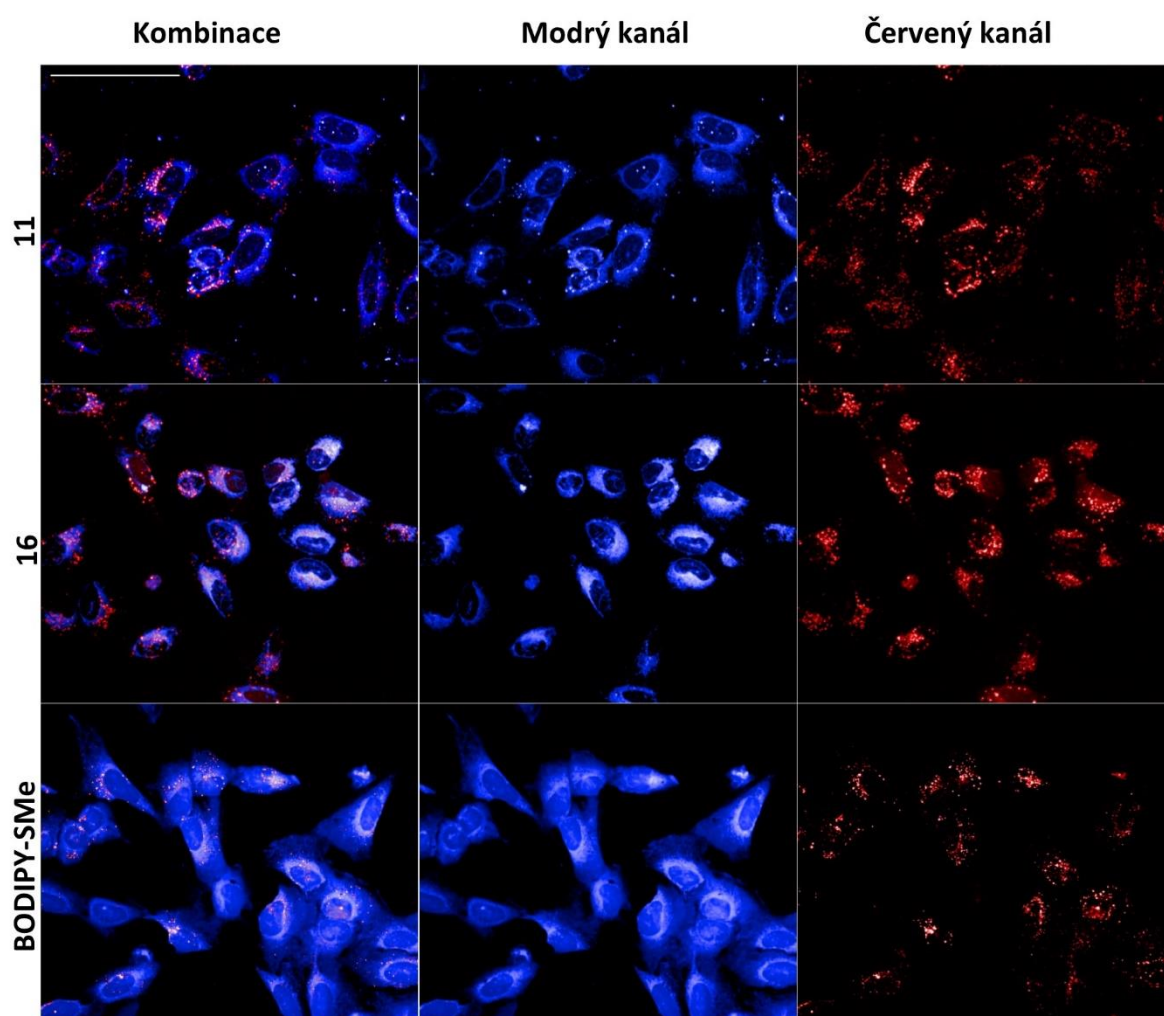
▲ ER = endoplazmatické retikulum, Mito = mitochondrie, GA = Golgiho aparát. **B** – Určení kolokalizace pomocí Pearsonova a Mandersonova koeficientu. Kolokalizace byla odečtena z plných snímků uvedených na obrázcích **16–18** v programu ImageJ (plug-in JACoP).



Obrázek 16: Buněčná linie U2OS, se značeným endoplazmatickým retikulem mCherry fluorescenčním proteinem, ovlivněná testovanými triterpen-BODIPY **11** a **16** a kontrolním **BODIPY-SMe** derivátem. Buňky byly ošetřeny 10 μ M koncentrací látky po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 100 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561 nm, Em BP 595/20 nm.



Obrázek 17: Buněčná linie U2OS, se značenými mitochondriemi mCherry fluorescenčním proteinem, ovlivněná testovanými triterpen-BODIPY **11** a **16** a kontrolním **BODIPY-SMe** derivátem. Buňky byly ošetřeny 10 μ M koncentrací látky po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 100 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561 nm, Em BP 595/20 nm.



Obrázek 18: Buněčná linie U2OS, se značeným Golgiho aparátem mCherry fluorescenčním proteinem, ovlivněná testovanými triterpen-BODIPY **11** a **16** a kontrolním **BODIPY-SMe** derivátem. Buňky byly ošetřeny 10 μ M koncentrací látky po dobu 1 hodiny a následně opláchnuty čerstvým médiem. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 100 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, červený kanál = Ex 561 nm, Em BP 595/20 nm.

3.4. Diskuze

V této části práce byly zkoumány na buněčné linii U2OS dvě skupiny derivátů BA značené BODIPY. První skupinu tvořilo devět derivátů BA značených BODIPY-FL (konjugáty **1–9**), jako kontrola sloužil samotný linker s BODIPY-FL značkou (konjugát **10**). Struktury jsou uvedeny na **obrázku 7**. Po krátké inkubaci (3 h) byla většina testovaných konjugátů, s výjimkou variant **5** a **10**, lokalizována v živých buňkách (**obrázek 8**). Čas experimentu byl optimalizován tak, aby bylo možné pozorovat prvotní reakci buněk na testované látky. Jednotná koncentrace (50 μM) byla vybrána na základě dat z cytotoxického MTS testu, kde nejvyšší aktivitu na linii U2OS vykazoval konjugát **2** a dále konjugáty **7**, **1** a **9** (seřazeno podle míry cytotoxicity). Ostatní testované konjugáty nevykazovaly žádnou cytotoxickou aktivitu na buněčné linii U2OS (tedy $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). Data nejsou součástí této práce, ale jsou publikovaná v Krajčovičová a kol. 2018 (Příloha 3). Konjugát **5**, stejně jako kontrolní konjugát **10**, nevykazoval žádnou aktivitu v cytotoxických testech ani při mikroskopii živých buněk jím ošetřených. Toto naznačuje, že aktivita testovaných látek souvisí s triterpenoidní částí. Konjugát **2** obsahuje Michaelův akceptor (v tomto případě akroleinovou skupinu), který byl pravděpodobně zodpovědný za jeho vysokou cytotoxicitu a také odlišný vzor fluorescenčního barvení. Pozorovali jsme homogenní označení buněčné cytoplazmy, což je pravděpodobně způsobeno nespecifickou kovalentní interakcí s mnoha intracelulárními proteiny.⁸⁵

Vzor barvení ostatních analyzovaných látek odpovídal strukturám endoplazmatického retikula a mitochondrií, což jsou publikované cíle triterpenoidních derivátů lupanu.^{86,87} Provedli jsme proto doplňující značení ER-Trackerem pro vizualizaci endoplazmatického retikula a výpočet kolokalizačního koeficientu. Bohužel, signál ER-Trackeru byl kontaminován signálem testovaných konjugátů, jako příklad je uveden konjugát **7** na **obrázku 9**. K tomuto došlo pravděpodobně kvůli špatné rozpustnosti lipofilních derivátů BA ve vodných roztocích a tvorbě agregátů testované látky. Vzhledem k tomu, že agregace nastala i v prostředí samotného HEPES pufru (**obrázek 9B**), tedy v prostředí bez proteinů a dalších složek kultivačního média, můžeme tyto z reakce vyloučit. Problematická rozpustnost BA ve vodných roztocích je navíc dobře popsáný jev.⁸⁸ Pro další testování kolokalizace jsme se rozhodli ověřit detekci konjugátů ve fixovaných buňkách, které poskytují možnost více promývacích kroků a to i organickými rozpouštědly a tedy potencionálně omezení kontaminace signálu ER-Trackeru.

Snímky z mikroskopie U2OS buněk ošetřených konjugáty **1–10** (bez konjugátu **5**, který nebyl lokalizován v živých buňkách) a poté fixovaných metanolem jsou na **obrázku 10**. Oproti

experimentu s živými buňky, jsme nyní detekovali pouze konjugáty **2**, **7** a **9** a s nízkou intenzitou fluorescence konjugáty **1**, **3** a **4**. Uvedené konjugáty patří k těm cytotoxicky aktivním. Konjugát **7** nese na triterpenové struktuře pyrazin a stejná struktura byla naznačena jako konjugát **6**, který ale obsahuje kratší linker. Rozdíl mezi barvením živých a fixovaných buněk, kdy u fixovaných přetrval jen konjugát **7**, dokázal, že pro aktivitu derivátů byla stěžejní délka linkeru, kdy favorizovaná byla delší varianta. Toto tvrzení bylo podpořeno i výsledky MTS testu. Později Brandes a kol. publikovali, že i rozdílné složení linkeru může být důležité pro aktivitu fluorescenčních derivátů.⁷⁸ Paterní značení byl u fixovaných buněk narušen, proto jsme nemohli dále specifikovat míru kolokalizace.

Nicméně, tato pozorování nás vedla k hypotéze o vzniku kovalentní vazby derivátů na jejich buněčný cíl. Tuto myšlenku jsme se rozhodli otestovat provedením SDS-PAGE za denaturujících podmínek. Separace proteinů z buněčných lyzátů ošetřených konjugáty detekovanými ve fixovaných buňkách a následná detekce fluorescenčního signálu (odpovídajícímu fluorescenci BODIPY-FL) v gelu je na **obrázku 11**. Signál byl detekován i v případě, kdy SDS-PAGE předcházela precipitace proteinů TCA/Aceton metodou a promytí THF, tedy silným organickým rozpouštědlem⁸⁹ (**obrázek 11B**). Jak již bylo uvedeno výše, konjugát **2** obsahuje velmi reaktivní Michaelův akceptor a podobně jako v předchozích experimentech jsme v gelu detekovali četné bandy, odpovídající pravděpodobně mnoha proteinům. Konjugát **4** nese motiv diketonu, zatímco konjugát **3** nese monoketonovou skupinu. Diketon v tomto případě je více potentní pro tvorbu kovalentní vazby, což jsme pozorovali na poměrně vyšším signálu fluorescence z bandu detekovaného u vzorku ošetřeného konjugátem **4**.

Druhou skupinou testovanou v této části práce bylo šest derivátů BA a BT značených BODIPY s modrou fluorescencí, které do této doby v tomto kontextu nebyly použity. Jejich potenciální přínos byl zmíněn již v úvodu této kapitoly. Jako kontrolní vzorky byly použity barviva BODIPY-NH₂ a BODIPY-CO₂H spolu s prekurzorem BODIPY-SMe. Struktury těchto sloučenin jsou uvedeny na **obrázcích 12** a **13**. Krátká inkubace (1 h) s fluorescenčními konjugáty (10 μM) ukázala lokalizaci konjugátů **11** a **16** v živých buňkách (**obrázek 14**). Konjugát **11** má ve své struktuře fluorofor připojený ke karboxylové skupině v poloze C-28, takže je více podobný původní struktuře BA a má nízkou cytotoxicitu (blízko volné BA). Naopak konjugát **16** obsahuje amin v poloze C-28 a fluorofor je připojen k hydroxylové skupině v poloze C-3, jeho cytotoxicita je vyšší než u konjugátu **11**. Data z testu cytotoxicity nejsou součástí této práce, ale jsou publikovaná v Kodr a kol. 2021 (Příloha 2).

Kromě ovlivnění cytotoxicity může být tato amino skupina použita pro intracelulární cílení na mitochondrie, jak bylo popsáno v předchozích výzkumných pracích.^{75,90} Pro ověření jsme provedli kolokalizační experimenty (**obrázek 15**), kde jsme byli schopni oba konjugáty **11** a **16** téměř dokonale kolokalizovat s endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi, což je v souladu s předchozími pracemi, včetně výše uvedené, ukazujícími interakci s procesy a proteiny lokalizovanými v těchto organelách.^{84,91,92} Protože lokalizace obou sloučenin je podobná, je pravděpodobné, že přímý cíl zůstal nezměněn, ale účinek konjugátu **16** byl zesílen přítomností volné aminové skupiny v molekule. Lokalizace sloučenin v kompartmentech bohatých na lipidy (mitochondrie, endoplazmatické retikulum) může být také vysvětlena polárním charakterem BA a jeho analogů.⁹³

Celkem bylo studováno 13 fluorescenčních derivátů BA a 2 fluorescenční deriváty BT. Jejich biologické vlastnosti byly závislé jak na výchozí struktuře, tak na použitém linkeru pro konjugaci s BODIPY značkou. Nejlepší výsledky byly dosaženy značením molekuly triterpenu na pozicích C3 nebo C28, čímž byla allylová funkční skupina zachována volná pro vazbu. Zavedení amino skupiny se ukázalo jako velmi účinné pro zvýšení biologické aktivity. Buněčné cíle testovaných fluorescenčních derivátů byly lokalizovány v endoplasmatickém retikulu, mitochondriích a částečně v Golgiho aparátu. Tato část práce popisuje první publikované spojení triterpenů s BODIPY barvivem a také první spojení s modrým BODIPY barvivem.

4. Lokalizace buněčných cílů a monitorování uvolňování aktivní látky z konjugátů kyseliny 3-hydroxy-chinolinové s aminoBODIPY.

4.1. Úvod

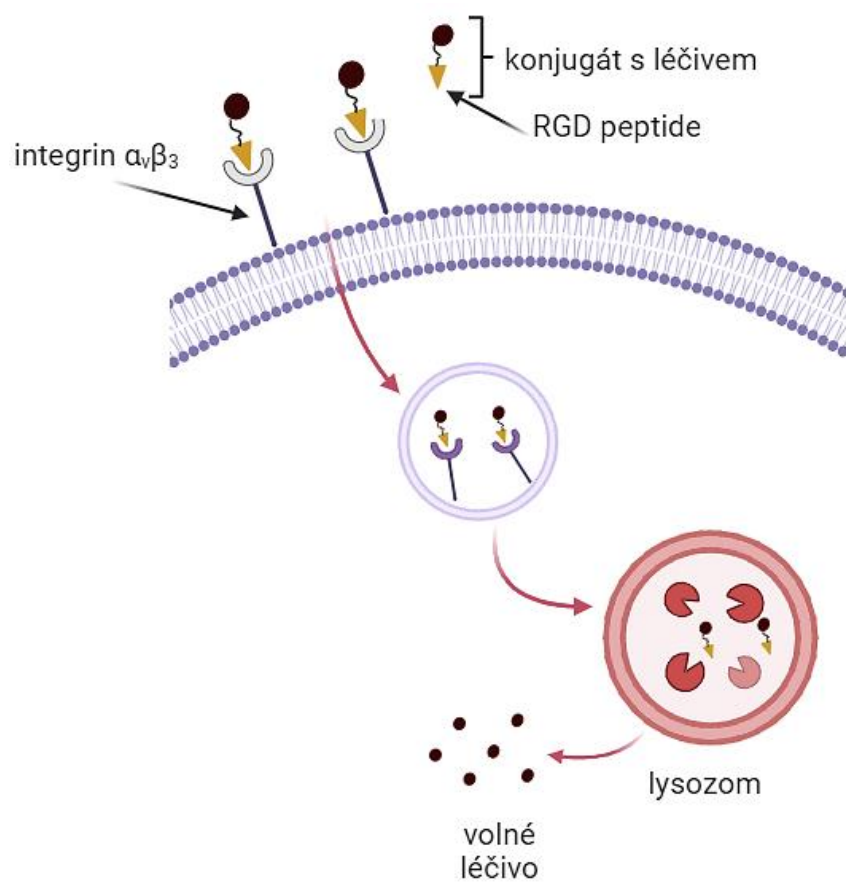
Schopnost lokalizovat a monitorovat léčivo v biologickém systému, včetně jeho buněčné penetrace a následného uvolnění aktivní látky, je jedním z klíčových kroků ve vývoji nových transportních lékových systémů (drug delivery systém, DDS).⁹⁴ Nejčastěji využívanou metodou jsou fluorescenční techniky s použitím různých barviv (kumaríny, cyaniny, atd). Velmi často jsou používána k těmto účelům BODIPY barviva s celkovým neutrálním nábojem, jejichž optické vlastnosti lze řídit derivatizací, jak již bylo zmíněno dříve. Optické zobrazovací metody často využívají aktivovatelné sondy, jejichž signál se zesiluje v přítomnosti biomarkeru, nebo v důsledku specifických molekulárních událostí. Tento jev je zásadní pro OFF-ON nebo ON-OFF systémy používané v různých experimentálních nebo i diagnostických aplikacích.⁹⁵⁻⁹⁷ Největší výhodou těchto fluorescenčních systémů je potom měření poměru signálů^{98,99}, kdy při jedné excitační vlnové délce jsou dosažena dvě emisní maxima, nebo dvě excitační vlnové délky mají jeden emisní vrchol. Takové systémy překonávají některé nevýhody jednoduchých intenziometrických systémů, především tedy falešnou odezvu způsobenou kolísáním místní koncentrace sondy, rozptylem světla maticí vzorku, nebo mikroprostředím sondy. Tyto sondy najdou i uplatnění v oboru teranostiky, která kombinuje terapeutické a diagnostické techniky do jediného integrovaného přístupu.¹⁰⁰

Glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin) je nízkomolekulární cystein obsahující thiol, jde o nejčastěji vyskytující se thiol v buňkách, kde má klíčovou roli jako buněčný antioxidant. Glutathion se vyskytuje ve své redukované (GSH) nebo oxidované formě a poměr GSH k jeho oxidované formě je důležitým indikátorem buněčného redoxního stavu, určujícího antioxidantní kapacitu buněk.¹⁰¹ Změny syntézy, metabolismu a homeostázy GSH jsou spojeny s mnoha nemocemi: nedostatek GSH může vést například k progresi Parkinsonovy choroby, imunitním dysfunkcím, onemocněním jater a cystické fibróze¹⁰², zatímco zvýšené hladiny GSH se nacházejí u mnoha typů rakoviny, a mohou ovlivnit rezistenci na radiační terapii nebo chemoterapii.¹⁰³ Hladina GSH u některých nádorů (0,5 –10 mM) je 10násobná ve srovnání s normálními buňkami¹⁰⁴, čehož lze využít jako intracelulárních stimulů pro uvolnění aktivní látky z DDS nebo teranostik, které ve struktuře obsahují disulfidový linker. Přes to, že několik teranostik obsahujících motiv disulfidu, bylo v posledních letech zavedeno pro monitorování uvolňování aktivní látky pomocí fluorescence¹⁰⁵⁻¹⁰⁸, jen několik jich umožňovalo sledování poměrů

signálů.^{109,110} Tyto zavedené ratiometrické systémy s OFF-ON efektem reagují na přítomnost GSH a jsou založeny na principu jedné excitace a dvou emisích při různých podmínkách. Jejich nevýhodou je využití FRET přenosu mezi kampotecinem (léčivo) a fluorescenčním barvivem. Takový systém tedy postrádá obecnou aplikaci pro léčiva bez ohledu na jejich fluorescenční vlastnosti.

Jeden z nejúčinnějších přístupů, jak selektivně cílit léčivo do vybraných buněk, je založen na interakci konjugátu léku a ligandu, se schopností cílit na specifický membránový receptor.¹¹¹⁻¹¹³ Jako možný receptor, potom může sloužit heterodimerní transmembránový receptor integrin $\alpha_v\beta_3$ ¹¹⁴, který je vysoce exprimován v aktivovaných endoteliálních buňkách, ale chybí v klidových endoteliálních buňkách, což činí tento receptor vhodným cílem pro antiangiogenní terapii.¹¹⁵ Kromě toho byla nadměrná exprese integrinu $\alpha_v\beta_3$ popsána v nádorových buňkách karcinomu tlustého střeva¹¹⁶, slinivky břišní¹¹⁷, prsu¹¹⁸ a plic¹¹⁹, u melanomů¹²⁰ a mozkových tumorů.¹²¹ Integriny $\alpha_v\beta_3$ reagují s peptidovým motivem RGD (arginin-glycin-asparagin) zejména v jeho cycklické formě (cRGD), což vede k aktivní internalizaci RGD/cRGD (zobrazeno na **obrázku 19**).¹¹⁵ Cycklické RGD peptidy konjugované s chemoterapeutickými léčivy, jako je doxorubicin¹²², kamptotecin¹²³ a paklitaxel¹²⁴ ukázaly, že dosahují zlepšených terapeutických účinků *in vitro* stejně jako *in vivo* ve srovnání s odpovídajícími volnými léky. Konjugát s cilengitidem a cRGD byl testován v klinické studii zaměřené na terapii glioblastomu.¹²⁵

Specifická odezva DDS v přítomnosti vybraného biomarkeru, způsobujícího následné uvolnění léčiva, umožňuje využití konjugátů jako možných teranostik.¹²⁶ Význam těchto konjugátů pro terapii je dobře popsán v několika publikovaných přehledových článcích.¹²⁷⁻¹²⁹ Jak již bylo zmíněno výše, přestože se vizualizace běžně provádí pomocí fluorescence, tato technika obvykle závisí na intenziometrické nebo poměrové odezvě fluorescence z léků, jako je kamptotecin¹⁰⁸ nebo doxorubicin.¹¹⁰ V této práci testované a diskutované konjugáty obsahují univerzální a jednoduché fluorescenční barvivo aminoBODIPY, které umožňuje sledování vstupu konjugátu do buňky a poté uvolňování léčiva. Jako modelová léčiva byly vybrány deriváty 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolinonu (3HQ), známé pro svou protinádorovou aktivitu.¹³⁰



Obrázek 19: Integrin $\alpha_v\beta_3$ reagující s RGD peptidem, který nese konjugát DDS.

4.2. Materiál a metody

Pro testování jsme použili buněčnou linii HeLa odvozenou od karcinomu děložního čípku a zakoupenou z ATCC. Buněčná linie byla udržována v TPP 75 cm² tkáňových kultivačních lahvích a kultivována v Eaglově minimálním kultivačním médiu s 10% fetálním telecím sérem, za standartních kultivačních podmínek při 37 °C a 5% CO₂. Buněčné suspenze byly připraveny podle instrukcí ATCC pro subkultivaci. Všechny testované látky byly rozpuštěny v 100% roztoku DMSO, skladovány byly v monitorovaných podmínkách chemické knihovny ÚMTM a byl u nich proveden MTS test cytotoxicity.

Seznam použitých chemikálií a roztoků:

Glutathion, redukováná forma (GSH) (kat. č. G4251-10G, SIGMA ALDRICH)

Glutathion etyl ester (GSHOEt) (kat. č. G1404-100MG, SIGMA ALDRICH)

Hoechst 33342 (kat. č. H21492, INVITROGEN)

N-ethylmaleimid (NEM) (kat. č. 04259-25G, SIGMA ALDRICH)

Postup práce při mikroskopii živých buněk ošetřených 3HQ-aminoBODIPY konjugáty 17–19

Buňky HeLa (3000 buněk v objemu 30 µl v jamce) byly nasazeny do 384jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂ pro adherenci buněk. Buňky byly před samotným ošetřením látkami preinkubovány s 20 mM GSH po dobu 2 hodin, přičemž posledních 20 minut byla jádra nabarvena fluorescenčním barvivem Hoechst v koncentraci 1,62 µM. Dále byly obarvené buňky opláchnuty čerstvým médiem a ošetřeny testovanými látkami v koncentraci 10 µM pomocí Echo®550 liquid handler (Labcyte, USA) po dobu 2 min a opláchnuty znovu čerstvým médiem. Zobrazování živých buněk bylo provedeno pomocí konfokálního mikroskopu Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Všechny mikroskopické snímky byly pořízeny za využití objektivu 40× s vodní imerzí a následně zpracovány, včetně odečtení pozadí a dekonvoluce pomocí softwaru Image J. Kvantifikace intenzity fluorescence byla provedena v programu Columbus (PerkinElmer), intenzita byla počítána jako medián fluorescenčního signálu v jamce dvou technických opakování počítaných v celkem 40 mikroskopických polích neupravených snímků pro jednu variantu experimentu.

Postup práce při mikroskopii živých buněk ošetřených 3HQ-aminoBODIPY konjugáty 20–21

Buňky HeLa (10 000 buněk v objemu 100 μ l v jamce) byly nasazeny do 96jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂ pro adherenci buněk. V první skupině byly buňky, před samotným ošetřením látkami, preinkubovány s 1 mM NEM po dobu 30 min, poté opláchnuty čerstvým médiem a inkubovány s testovanými sloučeninami (50 μ M) po dobu 1 hod a znovu propláchnuty čerstvým médiem. Druhá skupina buněk byla pouze inkubována s testovanými látkami (50 μ M) po dobu 1 hodiny a opláchnuta čerstvým médiem. Třetí skupina buněk byla inkubována s testovanými látkami (50 μ M) po dobu 1 hodiny a poté opláchnuta čerstvým médiem s 20 mM GSHOEt. Zobrazování živých buněk bylo provedeno pomocí mikroskopu Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Živé buňky byly mikroskopovány objektivem 60 $\times$ s vodní imerzí v čase 0 a 2 h. Snímky byly pořízeny po excitaci laserem při 488 nm a následné emisi BP 515/30 a BP 595/20. Všechny snímky byly následně zpracovány, včetně odečtení pozadí a dekonvoluce pomocí softwaru Image J. Kvantifikace intenzity fluorescence byla provedena v programu Columbus (PerkinElmer) jako medián intenzity v jamce dvou technických opakování počítaných v celkem 40 mikroskopických polích neupravených snímků na variantu experimentu.

Postup práce při intracelulárním štěpení konjugátu 20 glutathionem a sledování jeho fluorescence

Buňky HeLa (10 000 buněk v objemu 100 μ l v jamce) byly nasazeny do 96jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a byly inkubovány pro adherenci buněk po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂. V první skupině byly buňky, před samotným ošetřením látkami, preinkubovány s 1 mM NEM po dobu 30 min, poté opláchnuty čerstvým médiem a inkubovány s testovanými sloučeninami (50 μ M) po dobu 1 hod a znovu propláchnuty čerstvým médiem. Druhá skupina buněk byla pouze inkubována s testovanými látkami (50 μ M) po dobu 1 hod a opláchnuta čerstvým médiem. Třetí skupina buněk byla inkubována s testovanými látkami (50 μ M) po dobu 1 hod a poté opláchnuta čerstvým médiem s 20 mM GSHOEt. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí EnSpire spektrofotometru (PerkinElmer, USA) se dvěma

odečty pro každý časový bod a každou variantu experimentu, nejdříve excitace při 480 nm a emise při 530 nm a poté excitace při 510 nm a emise při 530 nm.

Postup práce při kompetitivním vazebném testu s volným cRGD

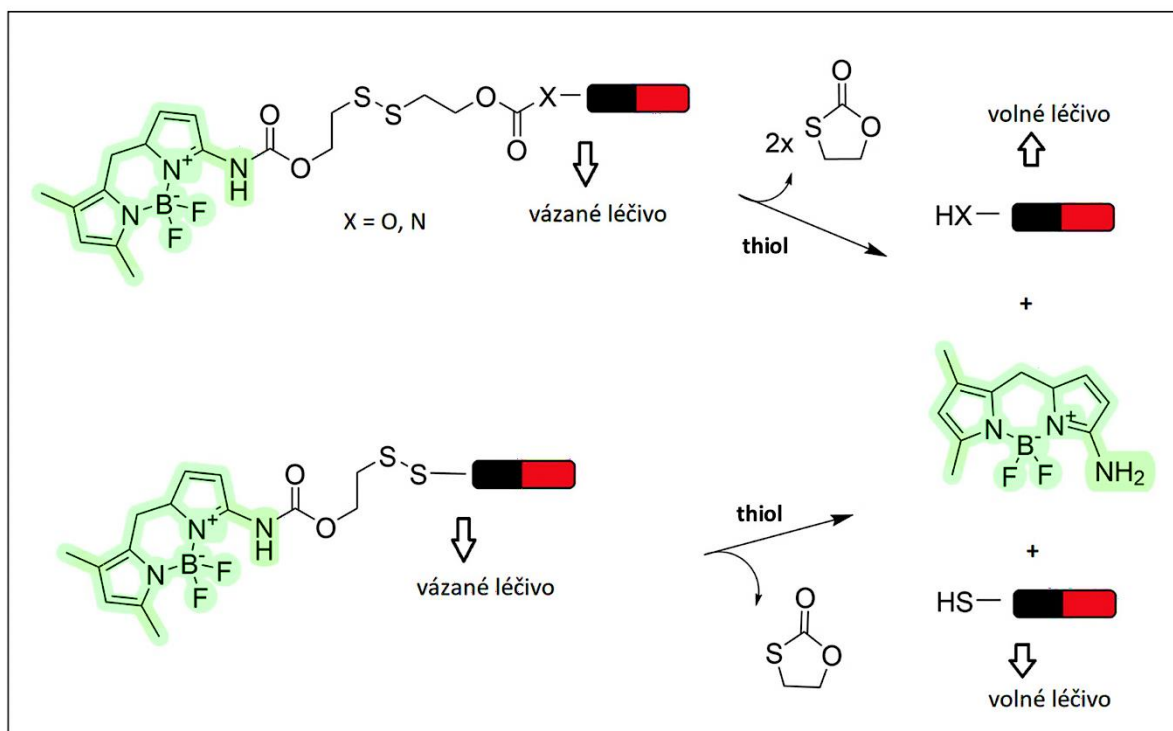
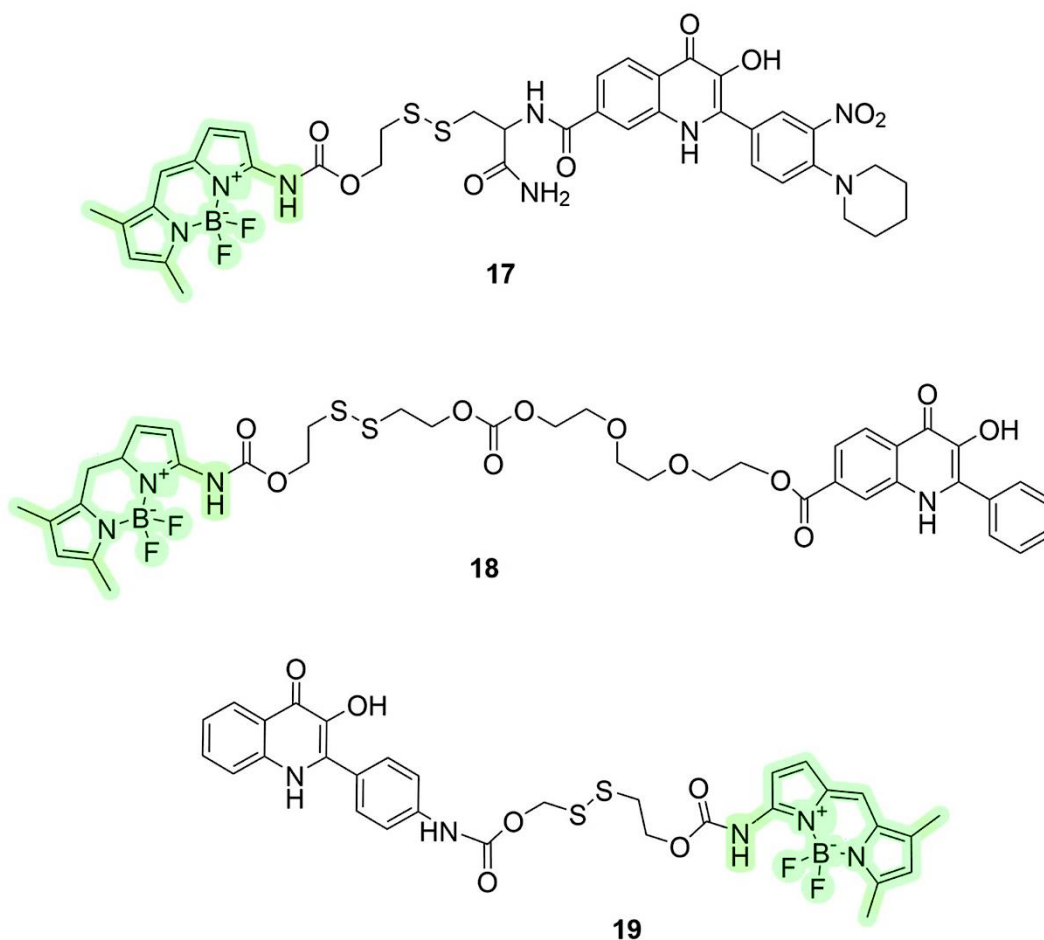
Buňky HeLa (10 000 buněk v objemu 100 μ l v jamce) byly nasazeny do 96jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a byly inkubovány pro adherenci buněk po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Buňky byly preinkubovány s volným cRGD peptidem v koncentraci 10–100 μ M po dobu 30 min před ošetřením testovanými látkami. Poté bylo odpipetováno médium a buňky byly ošetřeny testovanými látkami (10 μ M) po dobu 10 minut. Buňky byly dále promyty čerstvým médiem a intenzita emise fluorescence byla měřena pomocí EnSpire spektrofotometru (PerkinElmer, USA) s nastavením excitace při 480 nm a emise při 530 nm.

4.3. Výsledky

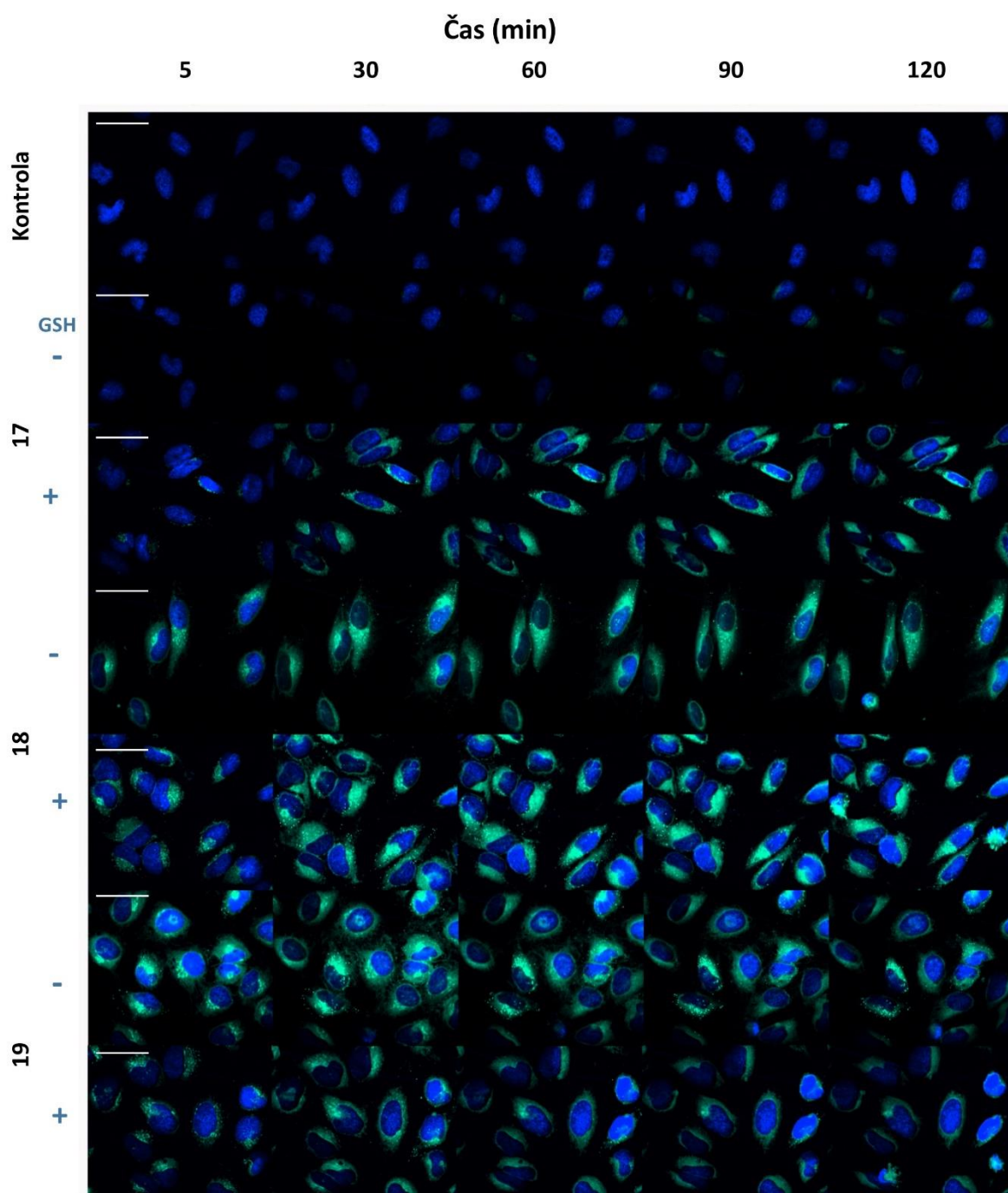
Deriváty 3HQ konjugované s aminoBODIPY – výsledky publikované v Porubský a kol. 2019 (Příloha 4) a Porubský a kol. 2021 (Příloha 5).

Ke studiu možnosti sledování uvolňování léčiva byly použity sloučeniny **17–19** ze skupiny derivátů 3HQ. Struktura těchto modelových konjugátů a mechanismus uvolňování aktivní látky je uveden na **obrázku 20**. Uvolňování aktivní látky uvnitř buněk lze teoreticky sledovat pomocí OFF-ON efektu fluorescenční mikroskopii. Toto bylo ověřeno na buněčné linii HeLa, kdy bylo sledováno uvolňování aktivní látky při přirozené hladině GSH a také při preinkubaci buněk s 20 mM GSH. Detekována byla fluorescence aminoBODIPY barviva v zeleném kanálu v časovém intervalu 5–120 minut. Mikroskopické snímky jsou uvedeny na **obrázku 21**. Kvantifikace detekovaných fluorescenčních intenzit je uvedena na **obrázku 22**.

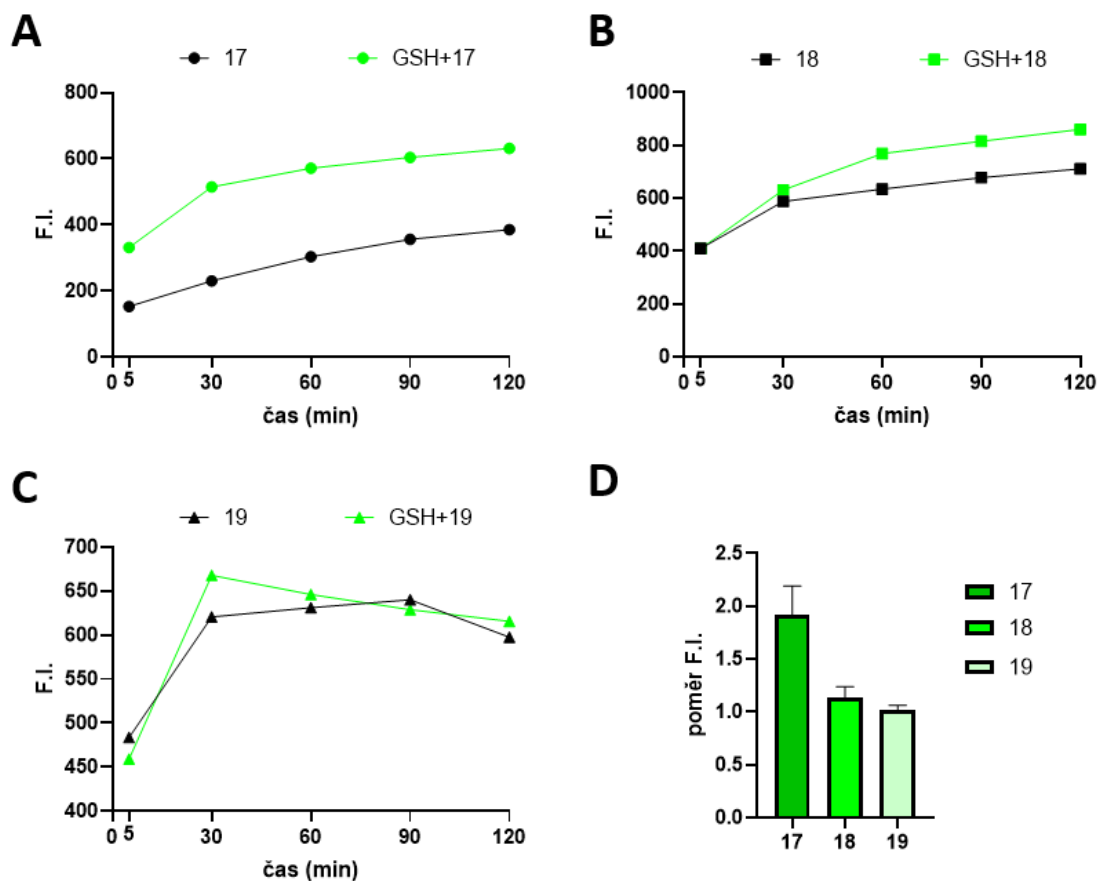
Dále bylo testováno uvolňování léčiva z modelových konjugátů **20–21**. Konjugát **20** má ve své struktuře obsaženou aktivní látku 3HQ, cRGD peptid odpovědný za specifickou vazbu na integriny a aminoBODIPY, které slouží k monitorování štěpení. Konjugát **21** se skládal z aktivní látky 3HQ, aminoBODIPY barviva, které lze detekovat samostatně, nebo slouží jako FRET dárce a červeného BODIPY, které funguje jako FRET akceptor. Struktura těchto modelových konjugátů a mechanismus uvolňování aktivní látky je uveden na **obrázku 23**. Oba konjugáty byly testovány na buněčné linii HeLa pro uvolňování aktivní látky, a tudíž detekci fluorescenčního signálu. Fluorescenční mikroskopii byla detekována míra intenzity fluorescence pro samotné konjugáty a varianty v kombinaci s NEM a GSHoEt. Mikroskopické snímky a kvantifikace detekovaných fluorescenčních intenzit pro konjugát **20** jsou uvedeny na **obrázku 24** a pro konjugát **21** na **obrázku 26**. Uvolňování aktivní látky uvnitř buněk lze teoreticky také sledovat pomocí OFF-ON efektu, což jsme otestovali monitorováním v reálném čase pomocí fluorescenčního spektrofotometru. Data naměřená pro konjugát **20** jsou uvedena na **obrázku 25A**. Dále byl proveden kompetitivní vazebný test s volným cRGD peptidem, pro ověření vlivu této části struktury konjugátu **20** na vstup do buňky, výsledky jsou zobrazeny na **obrázku 25B** pro čas 0 a 2 hod a koncentraci volného cRGD 10–100 μM .



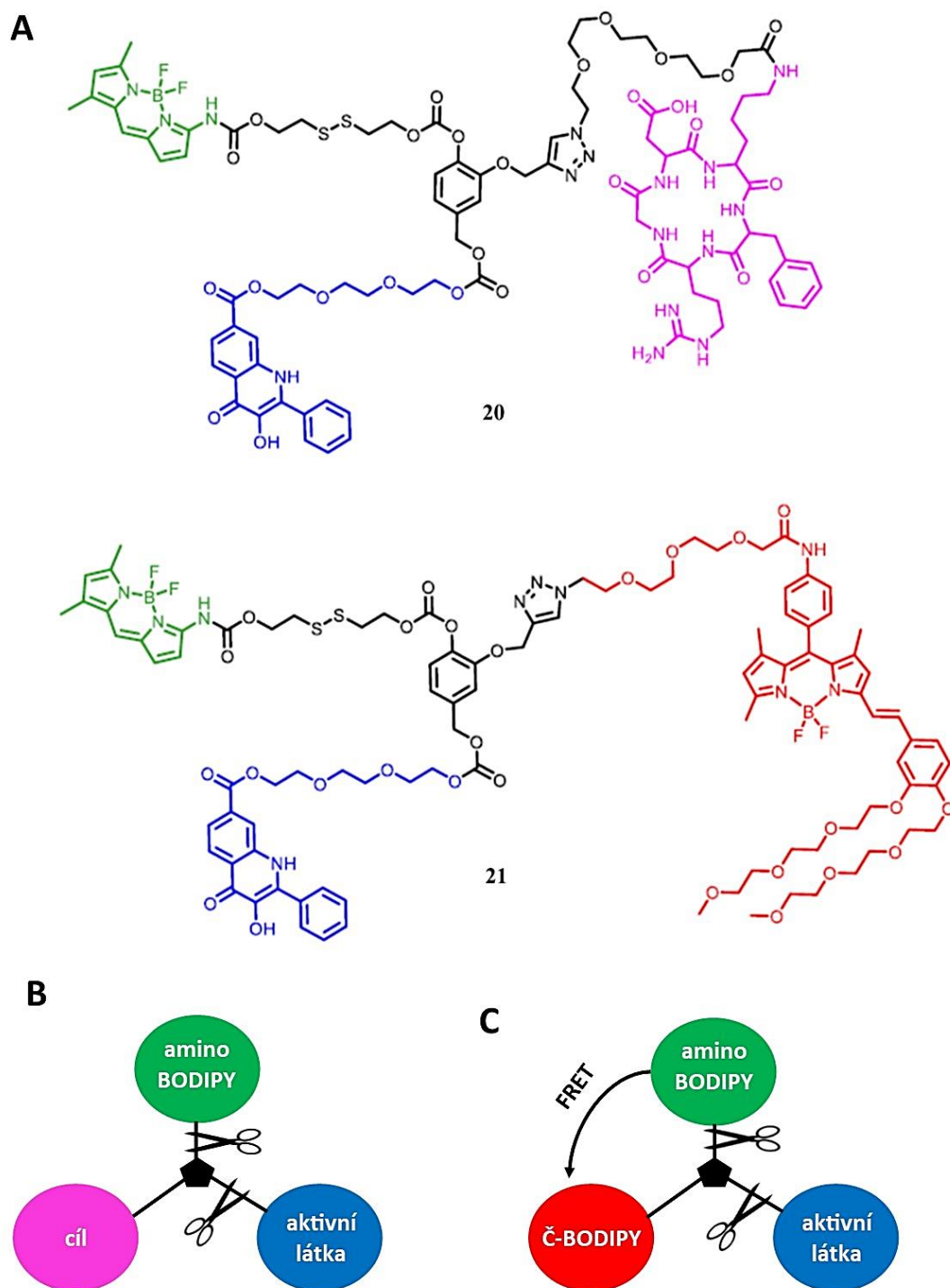
Obrázek 20: Molekulární struktury konjugátů 3HQ-BODIPY 17–19 a mechanismus uvolnění aktivní látky z konjugátů po působení glutathionu.



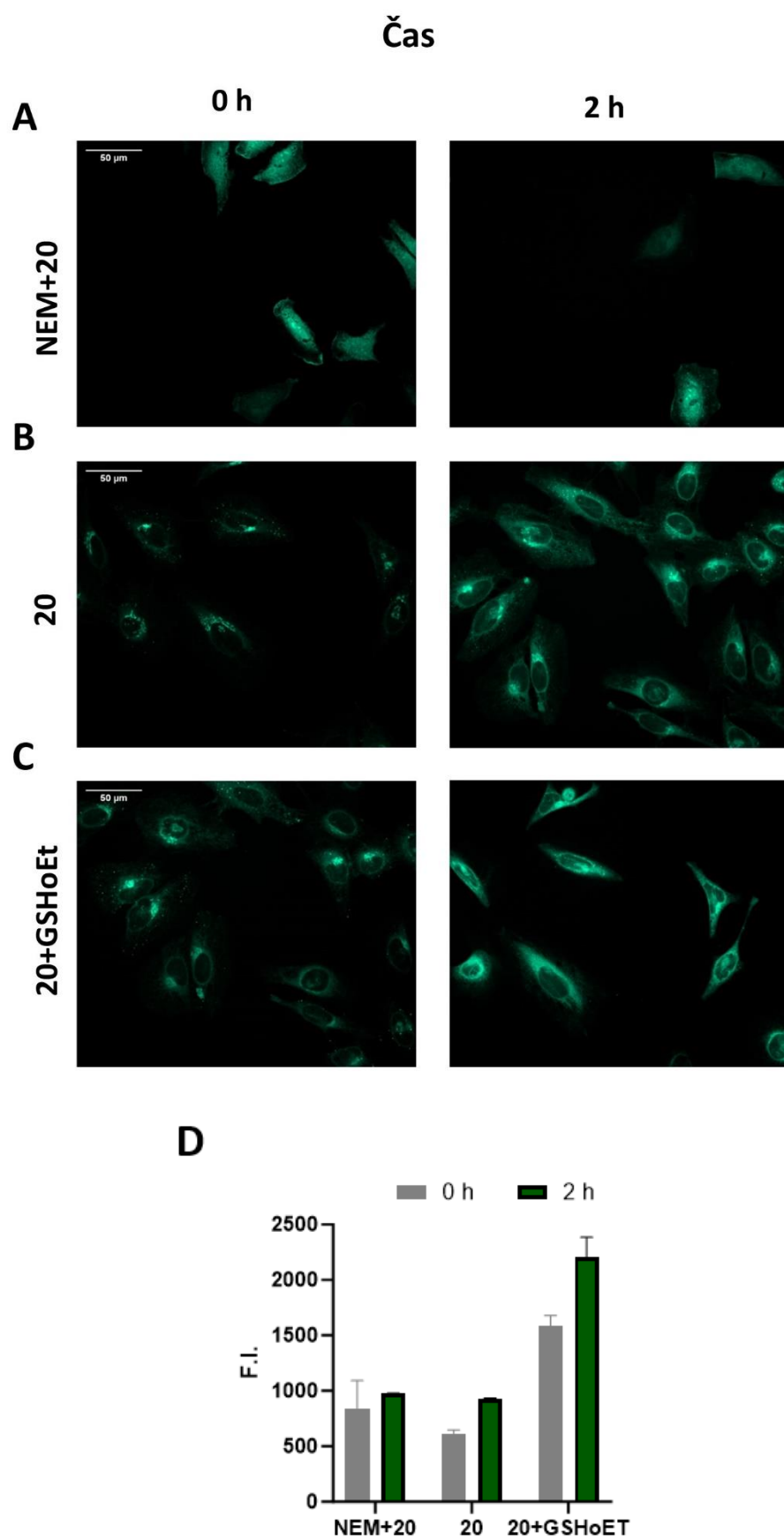
Obrázek 21: Buněčná linie HeLa ošetřená testovanými konjugáty 17–19. Buňky byly ošetřeny 10 μ M látkami po dobu 2 min a poté opláchnuty čerstvým médiem. Případná preinkubace s GSH (20 mM, 2 h) je uvedena u každého panelu, kde - značí bez preinkubace a + značí s preinkubací. Jádra byla nabarvena fluorescenčním barvivem Hoechst. Zobrazení objektivem 40 $\times$ (měřítko 50 μ m), modrý kanál = Ex 405 nm, Em BP 445/45 nm, zelený kanál = Ex 488 nm, Em BP 515/30 nm.



Obrázek 22: A-C – Kvantifikace intenzit fluorescence mikroskopických snímků testovaných konjugátů 17–19 lokalizovaných v buněčné linii HeLa. Kvantifikace byla provedena ze snímků na obrázku 20. D – Poměr intenzity fluorescence testovaných konjugátů 17–19 detekované v preinkubovaných buňkách s GSH vůči intenzitě fluorescence detekované v buňkách s jejich přirozenou hladinou GSH. Poměr byl vypočítán v čase 2 h, pro 3 biologická opakování.

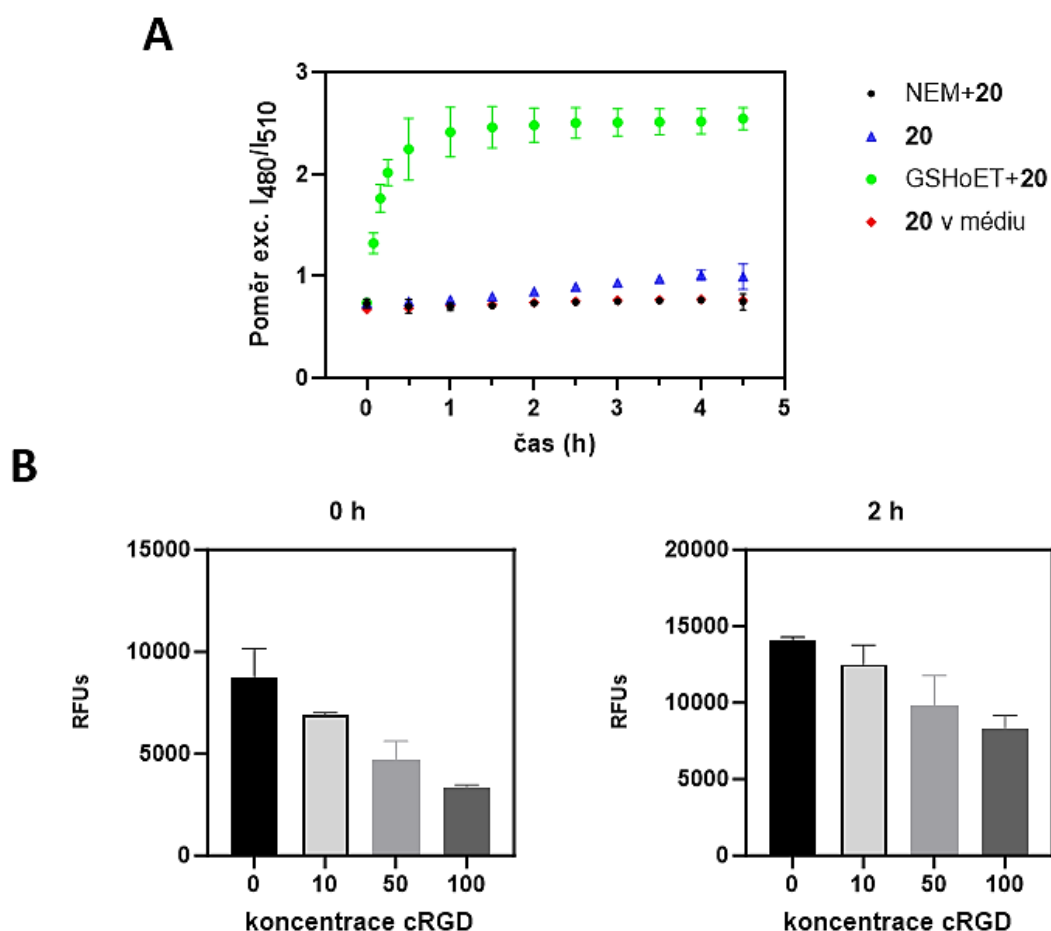


Obrázek 23: A – Molekulární struktury konjugátů 3HQ-BODIPY 20–21. B – Mechanismus uvolnění aktivní látky z konjugátu 20 po působení glutathionu. C – Mechanismus uvolnění aktivní látky z konjugátu 21 po působení glutathionu.

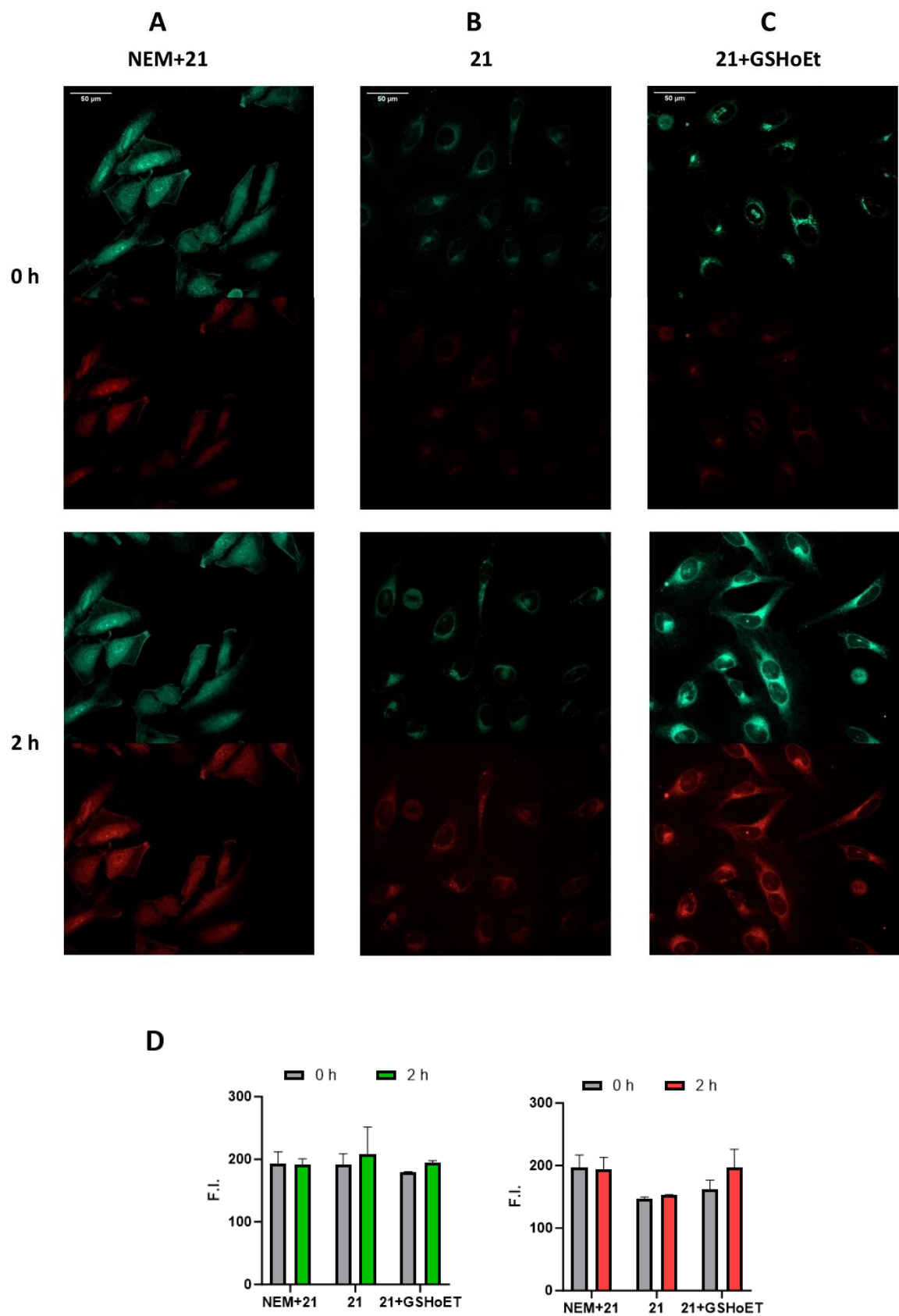


Obrázek 24: Buněčná linie HeLa ošetřená testovaným konjugátem 20. ▼

▲**A** – Buňky byly preinkubovány s NEM (1 mM, 30 min) a poté ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem. **B** – Buňky byly ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem. **C** – Buňky byly ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem s 20 mM GSHoEt. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 50 μ m), zelený kanál = Ex 488 nm, Em BP 515/30 nm. **D** – Kvantifikace intenzity fluorescence byla provedena pro celkem 3 biologické replikáty, v čase 0 a 2 h pro dané varianty experimentu.



Obrázek 25: **A** – Poměr intenzit fluorescencí detekovaných při Ex= 480 nm, Em= 530 nm a Ex= 510 nm, Em= 530 nm pro konjugát **20** detekovaný v buněčné linii HeLa (černá, modrá a zelená křivka) a případně v samotném médiu (červená křivka). **B** – Kompetitivní vazebný test s cRGD. Buňky HeLa byly preinkubovány s volným cRGD peptidem (0–100 μ M, 30 min) poté byly ošetřeny konjugátem **20** (10 μ M, 10 min). Buňky byly dále promyty čerstvým médiem a byla změřena intenzita fluorescence při Ex= 480 nm a Em= 530 nm. Oba experimenty byly provedeny ve třech biologických replikátech.



Obrázek 26: Buněčná linie HeLa ošetřená testovaným konjugátem 21. ▼

▲A – Buňky byly preinkubovány s NEM (1 mM, 30 min) a poté ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem. **B** – Buňky byly ošetřeny 50 μ M látkami po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem. **C** – Buňky byly ošetřeny 50 μ M koncentrací látky po dobu 1 hod a poté opláchnuty čerstvým médiem s 20 mM GSHoEt. Zobrazení objektivem 60 $\times$ (měřítko 50 μ m), zelený kanál = Ex 488 nm, Em BP 515/30 nm, červený kanál = Ex 488 nm, Em BP 595/200 nm. **D** – Kvantifikace intenzity fluorescence byla provedena pro celkem 3 biologické replikáty, v čase 0 a 2 h a pro dané varianty experimentu.

4.4. Diskuze

Tato část práce sleduje buněčnou lokalizaci a poté uvolňování aktivní látky z celkem pěti konjugátů 3HQ-aminoBODIPY. Tento systém zahrnuje „sebedestrukční“ disulfidový linker spojující aktivní látku určenou k uvolnění a fluorescenční barvivo. Design je inspirován předchozí studií Jain a kol. 2013.¹³¹ Disulfidová vazba působí jako spínač, spouští tedy uvolňování léčiva a aminoBODIPY v přítomnosti thiolů, zejména GSH. Konjugáty **17–21** (struktury na **obrázcích 20 a 23**) byly charakterizovány z hlediska excitačních maxim, intenzity emise a kvantových výběžků. Byl ověřen OFF-ON efekt v několika roztocích a vliv polarizace rozpouštědla na tento efekt. Schopnost disulfidového linkeru uvolňovat jak aminoBODIPY, tak i modelové léčivo v přítomnosti GSH, byla potvrzena pomocí LC/MS. Data mapující tuto charakterizaci nejsou součástí této práce, ale byla publikována v Porubský a kol. 2019 (Příloha 4) a Porubský a kol. 2021 (Příloha 5).

Uvolňování léčiva uvnitř buněk bylo monitorováno pomocí OFF-ON efektu za pomoci fluorescenční mikroskopie. Pro ověření toho principu byly buňky HeLa lokalizovány barvením jader barvivem Hoechst a poté ošetřeny konjugáty **17–19**. Snímky z fluorescenční mikroskopie živých buněk jsou na **obrázku 21**. Detekce fluorescence v zeleném kanálu v důsledku uvolňování aminoBODIPY a odpovídající aktivní látky, byla pozorována časově závislým způsobem. Všechny testované konjugáty se po krátké inkubaci (10 μ M, 10 min) nacházely v cytoplazmatickém prostoru (mimo jádro), přičemž charakter barvení byl difúzní, s často detekovanými agregáty. Nejlepších výsledků dosahoval konjugát **17**, jehož fluorescence detekovaná v čase 5 min a při nativních podmínkách byla minimální, zatím co rostla v čase a také narůstala při zvýšení hladiny GSH, což lze pozorovat na **obrázcích 21 a 22A**. Konjugát **18** vykazoval změnu intenzity fluorescence s rostoucím časem inkubace, nicméně rozdíl mezi štěpením v nativních podmínkách a po zvýšení hladiny GSH byl nízký, což je zřejmé na **obrázcích 21 a 22B**. Poslední testovaný konjugát **19** vykazoval měřitelnou změnu intenzity fluorescence, nicméně byl detekován nulový rozdíl mezi štěpením konjugátu v nativních podmínkách a při zvýšení hladiny GSH., jak je možné pozorovat na **obrázcích 21 a 22C**. Z kvantifikované intenzity fluorescence byl vypočítán také poměr intenzity detekované pro štěpení konjugátu při zvýšené hladině GSH k intenzitě detekované při nativní koncentraci GSH, což je uvedeno na **obrázku 22D**. Vypočítaný poměr potvrzuje předešlé tvrzení, že pouze konjugát **17** vykazuje násobný rozdíl fluorescence v čase 2 hodiny. Z tohoto pohledu se tedy jeví linker, který je ve struktuře konjugátu **17** a obsahuje amino skupinu ve štěpitelném místě

jako lépe účinný než linkery obsahující hydroxyskupinu (konjugát **18**) nebo thiolovou skupinu (konjugát **19**).

V dalších experimentech byl ověřen koncept dvou konjugátů se schopností detekce štěpení v reálném čase pomocí měřitelné fluorescence aminoBODIPY. Konjugát **20** obsahuje ve své struktuře c(RGDfK) motiv pro specifické cílení na integrinové receptory $\alpha_v\beta_3$. Konjugát **21** má ve své struktuře „redBODIPY“ pro monitorování štěpení konjugátu prostřednictvím FRET. Systém umožňuje poměrovou odezvu založenou na měření intenzity emise při dvou různých vlnových délkách excitace (konjugát **20**) nebo intenzit dvou vlnových délek emise po jedné excitaci (konjugát **21**). Struktury obou konjugátů jsou zobrazeny na **obrázku 23**. Buněčná linie HeLa byla ošetřena oběma konjugáty za tří různých podmínek. Nejprve byly buňky HeLa preinkubovány s NEM pro inhibici celkové thiolové aktivity, dále byly buňky bez předchozí inkubace ošetřeny oběma konjugáty. Poslední varianta experimentu byla, kdy po ošetření konjugáty byla v buňkách HeLa zvýšena hladina glutathionu pomocí GSHoEt. Snímky z fluorescenční mikroskopie živých buněk pro konjugát **20** jsou na **obrázku 22** a pro konjugát **21** na **obrázku 26**. Bohužel, konjugát **21** nevykazoval žádnou míru FRET fluorescence detekovanou fluorescenční mikroskopií, a proto nebyl dále experimentálně testován. Lokalizace konjugátu **20** se lišila v závislosti na čase a variantě experimentu. V čase 5 minut byly pozorovány agregáty soustředěné kolem oblasti jádra a s pozdějším časem se distribuce změnila na více difúzní profil se síťovitým vzorem barvení.

Získané snímky HeLa buněk preinkubovaných s NEM ukazují, že náš modelový konjugát **20** emituje fluorescenční signál v zeleném kanálu na začátku experimentu a po 2 hodinách s nezměněnou intenzitou (**obrázek 24A a D**). Tento fakt odpovídá předpokladu, že NEM vyčerpá aktivní thioley v buňkách, takže konjugát **20** není štěpen, a jsou pozorovány žádné nebo zanedbatelné změny intenzity fluorescence. Dále byla pozorována pozměněná distribuce konjugátu **20** uvnitř buněk ošetřených NEM. Pravděpodobně lze toto chování vysvětlit skutečností, že SH skupiny hrají klíčovou roli v regulaci propustnosti transmembránových pórů, navíc NEM je membránové permeabilní alkylační činidlo a jeho vazba na cysteinové zbytky může ovlivnit póry v membránách. Bylo publikováno, že vysoké koncentrace NEM (0,5–1,0 mM) vyvolávají otevření pórů v membránách.^{132,133}

Buňky HeLa bez předchozí úpravy NEM inkubované s konjugátem **20** ukázaly zvýšení fluorescence po 2 hodinách (**obrázek 24B, D**), protože konjugát byl štěpen nativním GSH na aminoBODIPY uvolněné spolu s aktivní látkou. Navíc intenzita emisí byla výrazně zesílená, když byly buňky ošetřeny GSHoEt (**obrázek 24C, D**), což vedlo k uvolnění významně většího

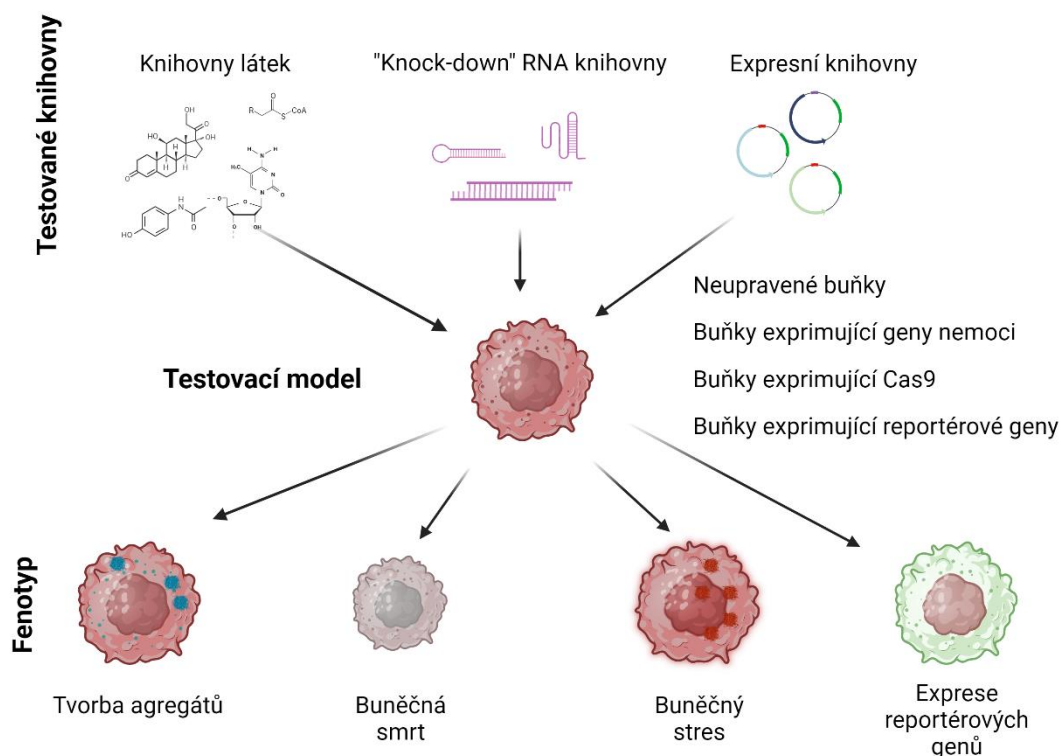
množství aminoBODIPY, stejně jako aktivní látky. Uvolňování léčiva tak může být snadno detekované OFF-ON efektem, což bylo potvrzeno experimenty s monitorováním štěpení v reálném čase pomocí fluorescenční spektrofotometrie (**obrázek 25A**). Dále bylo potvrzeno, že konjugát **20** s c(RGDfK) ve struktuře proniká do buněk prostřednictvím interakce s integrinovými receptory. Toto bylo prokázáno při kompetitivním vazebném testu s volným cRGD peptidem (**obrázek 25B**). Detekce snížené fluorescence při preinkubaci s vyššími koncentracemi cRGD peptidu naznačovaly, že vazebná místa na integrinu $\alpha_v\beta_3$ byly obsazeny volnými cRGD. Toto v podstatě vede ke snížení buněčného příjmu konjugátu **20**. Preinkubace s 100 μ M cRGD vedla ke snížení buněčného příjmu konjugátu **20** o 53 %.

Ve všech pěti testovaných konjugátech byly použity deriváty 3HQ jako modelové protinádorové léčivo, ale tyto deriváty vykazují špatnou rozpustnost ve vodě a často způsobují toxicitu i normálním zdravým buňkám.^{134,135} Obecně, tyto nově vyvinuté konjugáty by mohly zlepšit fyzikálně-chemické vlastnosti, selektivitu vůči nádorovým buňkám a farmakologické vlastnosti problematických látek. Zavedení aminoBODIPY, jako fluoroforu pro reportérové systémy sloužící k monitorování uvolňování léčiv při reakci na přítomnost zvýšené koncentrace thiolů, by mohlo vést k vytvoření teranostik vhodných pro studium v oboru personalizované medicíny.¹³⁶ Tento přístup by mohlo být dále vylepšen použitím specifických motivů pro cílení na konkrétní proteiny, jako je námi publikovaný systém cRGD a receptor pro integrin.

5. Prokázání proveditelnosti vysokokapacitní fenotypové testovací metody založené na mikroskopii fázového kontrastu a analýze dat pomocí konvoluční neurální sítě

5.1. Úvod

Jak již bylo zmíněno na začátku této práce, jedním z přístupů, jak identifikovat molekulární cíle biologicky aktivních látek je fenotypové testování. Vyhodnocení tohoto přístupu probíhá na principu pozorovatelných a měřitelných změnách fenotypu nebo buněčného chování. Fenotypové testování často začíná výběrem vhodného buněčného modelu a testovacího systému. Většinou jsou potom buňky vystaveny knihovně malých molekul, přírodních produktů nebo jiných aktivních látek. Dochází k pozorování a měření změn jejich fenotypu, včetně změny buněčné morfologie, růstu, expresních paternů, nebo přítomnosti specifických markerů. Takovými markery jsou myšleny zejména agregáty, faktory dokazující buněčný stres nebo doprovázející buněčnou smrt. Látka, která vyvolá požadované anebo zajímavé změny je považována za tzv. „hit“. Hity jsou potom dále validovány, až vedou k selekci kandidátní molekuly.¹³⁷



Obrázek 27: Příklady možných schémat fenotypového testování.

Velkými výhodami oproti běžným přístupům jsou pokrytí komplexních biologických dějů, objevení nových cílů (včetně kompletních buněčných drah) a identifikace polyfarmakologických látek. Na rozdíl od testovacích metod založených na cílení vybraného a dobře definovaného molekulárního cíle („targeted-based screening“) dochází k posouzení celkového vlivu látek na buněčné funkce, morfologii a chování. V tomto nastavení jsou možné různé typy testování, a to od knihoven malých molekul, přes protilátky po siRNA a CRISPR/dCas9 knihovny. Velikost takových testů se může také značně lišit, mohou být zapojeny HTS platformy nebo se uplatňuje výběr vstupní knihovny založený na hypotézách.¹³⁸

Při zapojení HTS platformy sledujeme/detekujeme účinek velkého souboru potencionálních sloučenin (knihoven) a testy probíhají v miniaturizovaných podmínkách a automatických módech. Cílem je otestovat knihovny za co nejkratší možný čas. Nejrychlejším a nejméně invazivním způsobem hodnocení stavu buněk je automatická mikroskopie. Celý proces může být robotizován a produkovat obrovské množství mikroskopických obrazů buněk ovlivněných konkrétními látkami v různých časových bodech. Stávající metody jsou obvykle založeny na fluorescenční mikroskopii, která poskytuje velmi přehledné snímky (zejména buněčných jader), které lze snadno segmentovat a vyhodnocovat automaticky pomocí relativně jednoduchých metod.¹³⁹

Nejrozšířenější fenotypovou HTS metodou je „Cell Painting“ vyvinutý výzkumnou skupinou Anne Carpenter v roce 2016. Tato metoda zahrnuje barvení buněk kombinací fluorescenčních barviv pro zachycení detailních informací o různých buněčných strukturách a procesech. Takový multiparametrický přístup poskytuje holistický pohled na morfologii a funkci buňky. Po ošetření buněk látkami, následuje jejich fixování a obarvení. V originálním znění dochází k obarvení jádra a jadérka, cytoskeletu, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, mitochondrií a plazmatické membrány, toto ale může být upraveno podle konkrétních požadavků na testování. Na získaných snímcích se provádí výpočetní analýza, aby se extrahovala kvantitativní data o mnoha buněčných rysech. Výstupem je sestavení pomyslných otisků prstů testovaných látek, tedy jejich profilů, které se dále porovnávají s profily získanými testováním standardů nebo látek s požadovanými vlastnostmi.²⁴

Nevýhodami této metody může být náročnost standardizace, tedy zajištění reprodukovatelnosti jak v barvení, tak v následném snímkování. Navíc použití barviv zvyšuje náklady a dobu zpracování a současně lze použít pouze omezenou kombinaci barviv.¹⁴⁰ Jako alternativu k fluorescenční mikroskopii můžeme použít mikroskopii digitálního fázového kontrastu (digital phase contrast, DPC), která nepoškozuje buňky a snímky můžeme získat

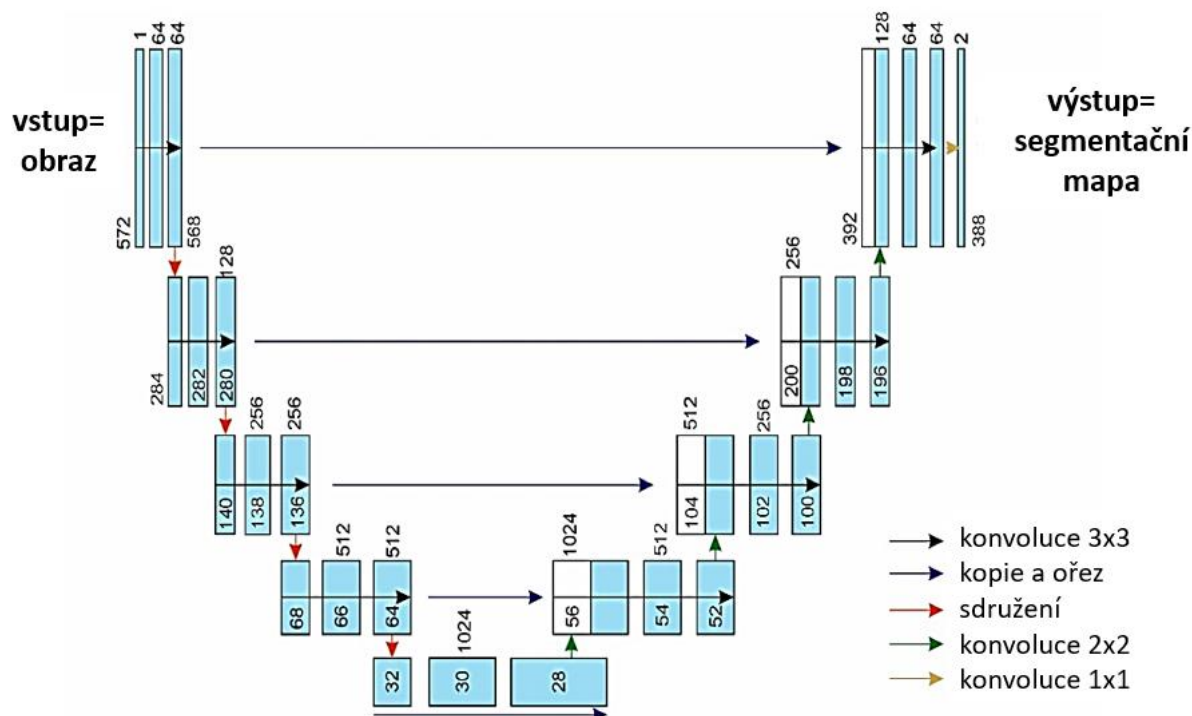
mnohem snadněji a rychleji. Analýza těchto obrazů je však více náročná na segmentaci a další analýzu kvůli složitosti vzhledu buněk a častému výskytu artefaktů. Proto se při ní uplatní rozvoj strojového učení a umělé inteligence (artificial intelligence, AI).¹⁴¹

Klasické přístupy obvykle začínají segmentací jednotlivých buněk a hodnocení zejména tvarových znaků, které popisují buněčnou morfologii, tedy součást buněčného fenotypu. Poslední krok zahrnuje strojové učení pro klasifikaci založenou na funkcích nebo shlukování. Takové procesy lze implementovat pomocí otevřeného softwaru, jako je například ImageJ/Fiji¹⁴², Icy¹⁴³, CellProfiler¹⁴⁴ a EBImage.¹⁴⁵ Později se objevily metody hlubokého učení, které kombinují funkce extrakce a klasifikace pro jednobuněčnou analýzu.¹⁴⁶ Tyto metody jsou obvykle založeny na dobře známých architekturách neuronových sítí z počítačového vidění pro segmentaci obrazu, například U-Net¹⁴⁷ a klasifikaci, například ResNet.¹⁴⁸

Konvoluční neuronové sítě (CNN nebo ConvNets) jsou třídou hlubokých neuronových sítí, které jsou zvláště účinné v oblastech, jako je počítačové vidění a zpracování obrazu.¹⁴⁹ Byly úspěšné například v úkolech rozpoznávání obrazu, detekce objektů a generování obrazu.¹⁵⁰ CNN využívají konvoluční vrstvy k automatickému učení prostorových vzorců ze vstupních dat. Tyto vrstvy aplikují konvoluční operace s malými váhovými filtry na vstupní data, což umožňuje zachytit relevantní vzory. Sdružovací vrstvy se následně používají k zmenšení prostorových rozměrů vstupních dat. Po konvolučních a sdružovacích vrstvách následují plně propojené vrstvy, které spojují neurony mezi sebou a jsou běžné v klasifikačních nebo regresních úlohách. Před přenosem na plně propojené vrstvy jsou výsledky konvolučních vrstev zploštěny do vektoru. Tento vektor slouží jako vstup do plně propojených vrstev. Pro dodání nelinearity do sítě jsou použity nelineární aktivační funkce. To umožňuje modelu flexibilněji se přizpůsobit složitým vztahům v datech. Architektury CNN se mohou lišit v počtu vrstev, velikosti filtrů, hloubce sítě a dalších komponentách, jako jsou normalizační vrstvy a přeskoková připojení.¹⁵¹

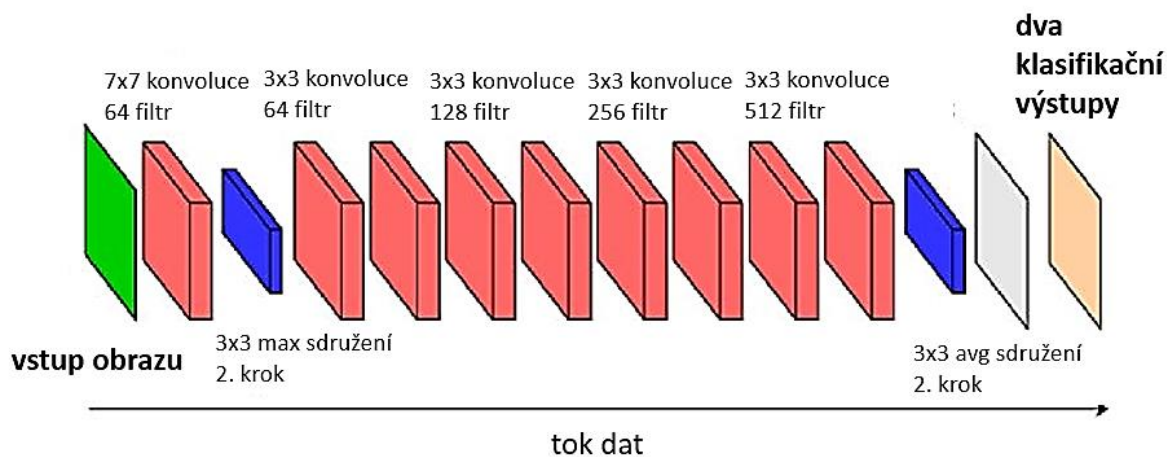
CNN jsou často trénovány na velkých souborech dat a lze je použít jako extraktory funkcí při přenosu učení. To zahrnuje použití předem trénovaného modelu CNN pro jiný úkol a jeho jemné doladění na menší datové sadě specifické pro cílový úkol.¹⁵² CNN prokázaly pozoruhodný úspěch v různých úkolech souvisejících s obrazem a staly se základním kamenem v oblasti hlubokého učení, zejména v aplikacích počítačového vidění.¹⁵³⁻¹⁵⁶

U-Net je speciální typ CNN, navržený pro sémantickou segmentaci v oblasti počítačového vidění. Cílem sémantické segmentace je zařadit každý pixel v obrázku do určité třídy. Tuto architekturu představili Ronneberger a kol. v roce 2015¹⁴⁷, a od té doby se hojně využívá v lékařských analýzách obrazu a dalších segmentačních úlohách. Klíčovým prvkem U-Netu je jeho písmeno U, které symbolizuje strukturu sestávající ze dvou hlavních částí: stahovací cesty (kodér) a expanzivní cesty (dekodér). Kodér zmenšuje prostorové rozměry vstupního obrazu a extrahuje hierarchické prvky pomocí konvolučních a sdružovacích vrstev. V dolní části U je vrstva úzkého hrdla, která uchovává klíčové informace. Dekodér potom obnovuje prostorové rozlišení a zpřesňuje výsledky segmentace. U-Net obsahuje přeskoková spojení, která propojují vrstvy kodéru přímo s odpovídajícími vrstvami dekodéru. Tato spojení pomáhají udržet detaily a prostorové informace během procesu převzorkování a minimalizují ztrátu informací. Finální vrstva používá konvoluční vrstvu s aktivační funkcí softmax pro vytvoření segmentační masky, přiřazující každému pixelu pravděpodobnost, že patří do určité třídy. U-Net se osvědčil především v úlohách segmentace lékařských obrázků, kde je klíčové přesné vymezení struktur nebo abnormalit. Jeho architektura umožňuje přesné lokalizace a segmentace objektů na snímcích, což ho činí populární volbou nejen v lékařském zobrazování, ale i v dalších oblastech počítačového vidění.¹⁵⁷



Obrázek 28: Obecná architektura neuronové sítě U-Net. Adaptováno Ronneberger a kol. 2015.¹⁴⁷

ResNet, což znamená Residual Network (reziduální síť), je populární architektura CNN publikovaná He a kol. v roce 2016.¹⁴⁸ Tato architektura byla vyvinuta k překonání problémů s trénováním velmi hlubokých sítí, které se často potýkají s mizejícími gradienty a degradací výkonu. Klíčovým prvkem ResNetu jsou zbytkové bloky obsahující zkratková spojení, která obcházejí jednu nebo více vrstev sítě. Tato přeskoková spojení umožňují gradientům snáze protékat sítí během tréninku, což řeší problém mizejícího gradientu. Díky zbytkovým blokům může síť efektivně trénovat velmi hluboké modely, které vedlo k úspěšnému využití ResNetu v různých úlohách počítačového vidění, včetně klasifikace obrazu, detekce objektů a segmentace. Základní stavební kámen ResNetu, zbytkový blok, umožňuje síti učit se reziduum, tj. rozdíl mezi vstupem a požadovaným výstupem. Architektury ResNet mohou být velmi hluboké, aniž by trpěly mizejícím gradientem. V hlubších verzích ResNetu se používá architektura úzkého hrdla, která snižuje výpočetní náklady při zachování reprezentativní kapacity. Modely ResNet obvykle využívají globální průměrné sdružování na konci, což pomáhá snížit počet parametrů a zvyšuje odolnost modelu vůči různým vstupním variantám. ResNet měl značný vliv na oblast hlubokého učení a inspiroval vývoj dalších pokročilých architektur. Jeho přístup zbytkového učení se stal základním konceptem při návrhu hlubokých neuronových sítí.¹⁵⁸



Obrázek 29: Architektura neuronové sítě ResNet s 18 vrstvami. Adaptováno z Atik a kol. 2021.¹⁵⁹

5.2. Materiál a metody

Pro vytvoření datasetů byla použita buněčná linie U2OS odvozená od osteosarkomu a zakoupená z ATCC. Dále byla použita verze této linie s transdukovaným fluorescenčním fúzním proteinem mCherry-NLS (U2OS-Nuc), popis její přípravy je shrnut v kapitole 3.2. Buněčné linie byly udržovány v TPP 75 cm² tkáňových kultivačních lahvích a v McCoyově 5a kultivačním médiu s 10% fetálním telecím sérem, za standardních kultivačních podmínek při 37 °C a 5% CO₂. Buněčné suspenze byly připraveny podle instrukcí ATCC pro subkultivaci buněčných linií. Testované látky jsou součástí LOPAC ®1280 knihovny (kat. č. LO3300-1KT, SIGMA ALDRICH), byly rozpuštěny v 100% roztoku DMSO a byl u nich proveden test cytotoxicity (MTS test). Skladovány byly v monitorovaných podmínkách chemické knihovny ÚMTM.

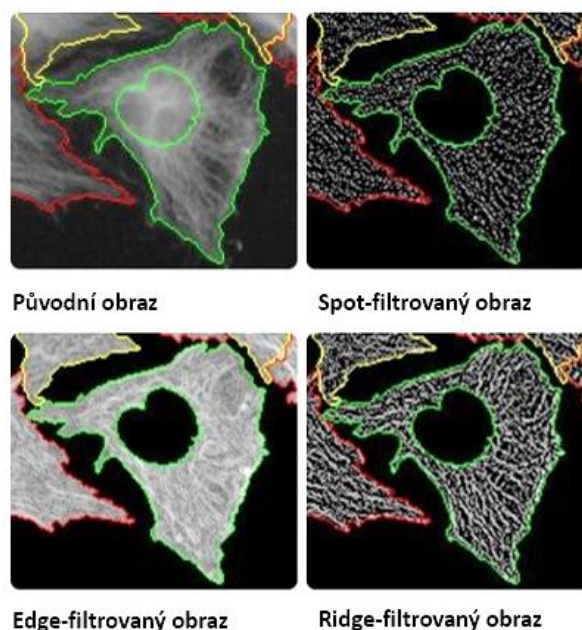
Postup práce při vytváření datasetu s jednotnou koncentrací látky

Buňky U2OS-Nuc (1500 buněk v objemu 30 µl v jamce) byly nasazeny den před ošetřením do 384jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ pro stabilizaci. Buňky byly ošetřeny třemi různými inhibitory topoizomerázy: topotekanem, daunorubicinem a etoposidem v koncentraci 0,5 µM. Ošetřené a kontrolní buňky byly zobrazeny po inkubaci 24 a 72 hodin s látkami. Zobrazování živých buněk bylo provedeno pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Snímky byly pořízeny s objektivem 20× po excitaci laserem při 561 nm a následné emisi BP 595/20. Fluorescenční snímky byly pořizovány paralelně s digitálním fázovým kontrastem (lampa a BP 525/50). Z dataset byl vytvořen ze dvou biologických opakování a byly z něj vyloučeny snímky s méně než třemi buňkami.

Postup práce při analýze obrazu pomocí programu Columbus

Fluorescenční snímky byly vyhodnoceny v programu Columbus (PerkinElmer), kde jsou připravené bloky analýzy obrazu, které lze dále upravit uživatelem. Po nahrání dat do programu byla provedena segmentace obrazu, na základě fluorescenčního signálu z fúzního proteinu mCherry, lokalizovaného v jádrech buněk. K segmentaci slouží blok – find cells, který vybere populaci objektů na snímku. Objektem se v našem případě myslí buňky, ale je možné provést analýzu i jiných částí. V dalším bloku došlo ke kalkulaci intenzity fluorescence, standardní metodou, kdy se počítá medián intenzity v jamce. Dále byl do analýzy zahrnut blok výpočtu morfologických vlastností (metodou STAR), umožňující výpočet velikosti buněk. Dále se

zapojil blok výpočtu vlastností textury SER metodou. V této metodě, dochází k vytvoření filtrovaných obrazů pro každou podčást analýzy (zobrazeno na **obrázku 30**), z filtrovaných obrazů potom byly vypočítány vlastnosti SER, tedy Spot, Edge, Ridge (toto jsou pouze základní prvky SER metody). Poté se pomocí pluginu PhenoLOGIC program naučil, na základě manuální selekce několika živých a mrtvých buněk, rozeznat tyto populace a provedl se výpočet jejich % zastoupení.



Obrázek 30: Filtrované obrazy vzniklé při SER analýze obrazu v programu Columbus.

Postup práce při vytváření datasetu po ošetření buněk látkami v koncentraci odpovídající IC50

Buňky U2OS (1500 buněk v objemu 30 μ l v jamce) byly nasazeny den před ošetřením do 384jamkové destičky CellCarrier (PerkinElmer, USA) a inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ pro stabilizaci. Buňky byly ošetřeny třemi různými inhibitory topoizomerázy v koncentracích jejich naměřených IC₅₀: topotekanem (1,24 μ M), daunorubicinem (5,88 μ M) a etoposidem (0,18 μ M). Ošetřené a kontrolní buňky byly zobrazeny po inkubaci 24 a 72 hodin s látkami. Zobrazování živých buněk bylo provedeno pomocí Cell Voyager CV8000 (Yokogawa, Japonsko) při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Živé buňky byly monitorovány s objektivem 20 $\times$ s vodní imerzí. Snímky byly pořízeny digitálním fázovým kontrastem (lampa a BP 525/50). Z datasetů byly vyloučeny snímky s méně než třemi buňkami.

5.3. Výsledky

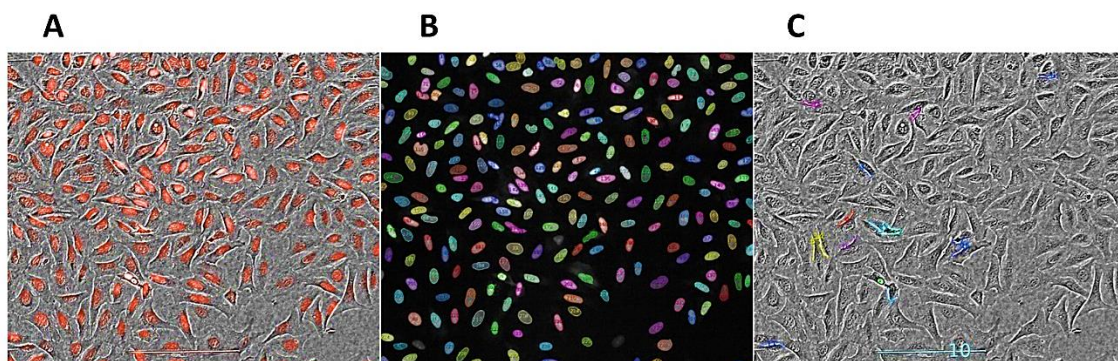
Fenotypové testování založené na DPC mikroskopii a analýze dat AI – data publikovaná v Baručić a kol. 2022 (Příloha 6) a doplňující data.

Tři inhibitory topoizomerázy (etoposid, topotekan a daunorubicin) byly studovány na buněčných liniích U2OS-Nuc a U2OS. Tímto bylo experimentálně ověřeno, zda lze z mikroskopických snímků určit mechanismus účinku látek, případně jejich buněčné cíle. Proto byly vytvořeny dva datasety, obsahující jak snímky linie U2OS-Nuc ošetřené jednotnou koncentrací inhibitorů topoizomerázy zobrazené v časech 24 a 72 hodin inkubace technikou fluorescenční mikroskopie a DPC (set číslo 1) a také, snímky linie U2OS ošetřené koncentrací IC50 jednotlivých inhibitorů topoizomerázy zobrazené v časech 24 a 72 hodin inkubace pouze mikroskopickou technikou DPC (set číslo 2).

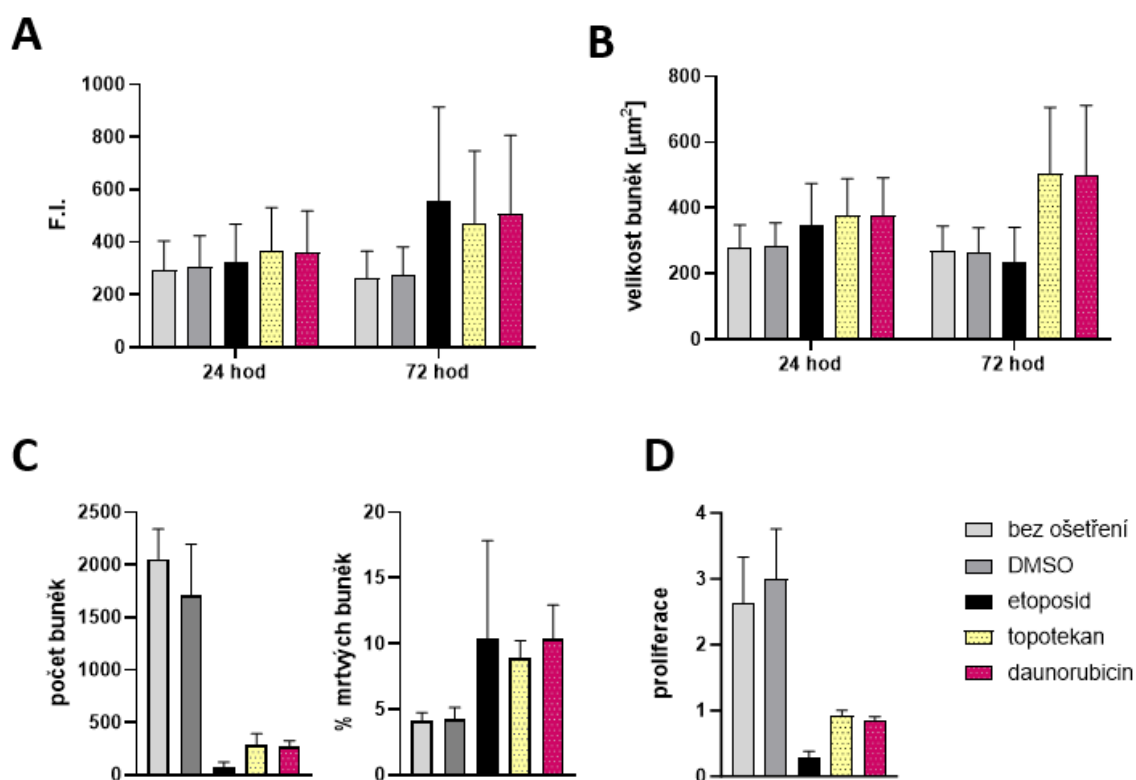
V této práci byla provedena analýza datasetu číslo 1, kdy po neúspěšné segmentaci obrazu (zobrazeno na **obrázku 31**) u DPC snímků, byly dále analyzovány pouze fluorescenční obrazy. Byla provedena analýza intenzity fluorescence (**obrázek 32A**), morfologická analýza (**obrázek 32B**), analýza počtu buněk a zastoupení mrtvých buněk (**obrázek 32C**), dále byla vypočítána proliferace buněk – jako podíl počtu buněk v čase inkubace 72 hodin k počtu v čase inkubace 24 hodin (**obrázek 32D**). Na toto bylo navázáno analýzou textury obrazu pomocí SER metody (**obrázek 33**), která byla uplatněna pouze v čase 24 hodin, kvůli velmi malému počtu buněk v pozdějším čase inkubace.

Dataset 1 byl také analyzován ResNet18 neuronovou sítí, kdy byly klasifikovány jak fluorescenční, tak DPC snímky. Provedení klasifikace není součástí této práce, ale interpretace a diskuze výsledků byla provedena v rámci této práce. Výstupem klasifikace jsou **tabulky 1 a 2** a také **obrázek 33**.

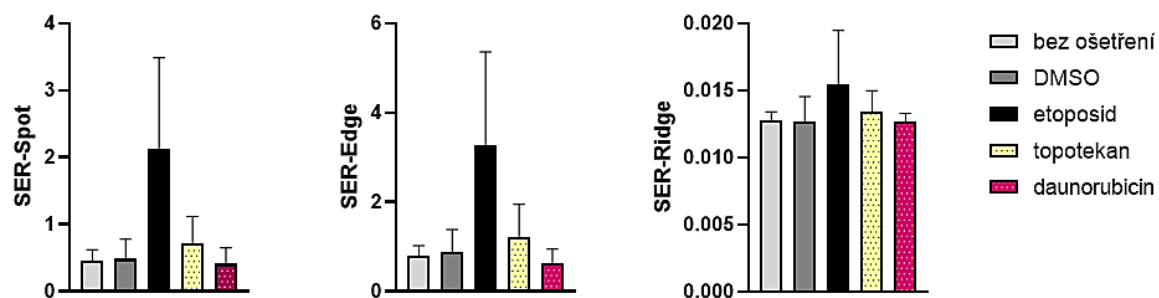
Dále byl vytvořen dataset 2, kde byly získány pouze snímky buněk technikou DPC. Příklady jednotlivých obrazů buněk ošetřených inhibitory topoizomerázy uveden na **obrázku 34**. Tento dataset byl také analyzován ResNet18 neuronovou sítí, kdy provedení klasifikace není součástí práce, ale interpretace a diskuze výsledků ano. Výstupem klasifikace je **tabulka 3**.



Obrázek 31: **A** – Fluorescenční snímky (červený kanál) v překryvu se snímky DPC. **B** – Segmentace obrazu (označení oblasti jader) u fluorescenčních snímků pomocí softwaru Columbus. **C** – Segmentace obrazu u DPC snímků provedená v programu Columbus.



Obrázek 32: Analýza fluorescenčních snímků buněk U2OS-Nuc ošetřených inhibitory topoizomerázy v programu Columbus. **A** – Kvantifikace intenzity fluorescence u jednotlivých variant experimentu. **B** – Vypočítaná velikost buněk u jednotlivých variant experimentu. **C** – Počet buněk a % vyjádření mrtvých buněk v čase 72 hodin inkubace u jednotlivých variant experimentu. **D** – Stanovená proliferace buněk pro jednotlivé varianty experimentu, vypočítáno jako poměr počtu buněk v čase 72 hod k počtu buněk v čase 24 hod.



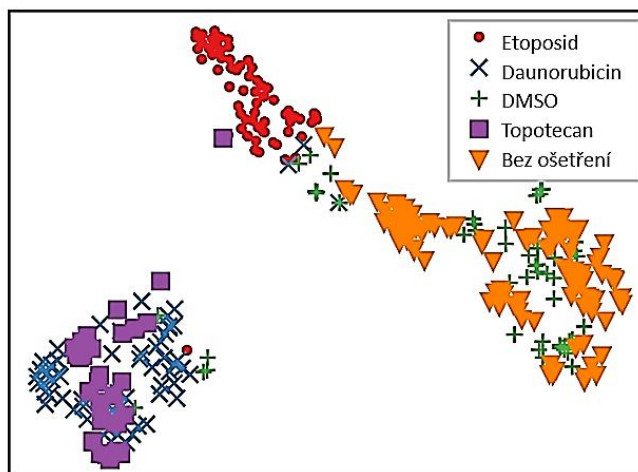
Obrázek 33: Analýza fluorescenčních snímků buněk U2OS-Nuc ošetřených inhibitory topoizomerázy (24 hod inkubace) v programu Columbus – analýza textury SER metodou.

Tabulka 1: Klasifikace aplikací AI metody na fluorescenční snímky buněk U2OS-Nuc ošetřených inhibitory topoizomeráz v koncentraci 0,5 μ M. **A** – klasifikace 5 tříd s průměrnou přesností 65 %. **B** – snížení počtu tříd na 3, spojením nejednoznačných párů tříd. Toto vedlo k 99% přesnosti klasifikace správné třídy. *provedení klasifikace nebylo součástí této práce.

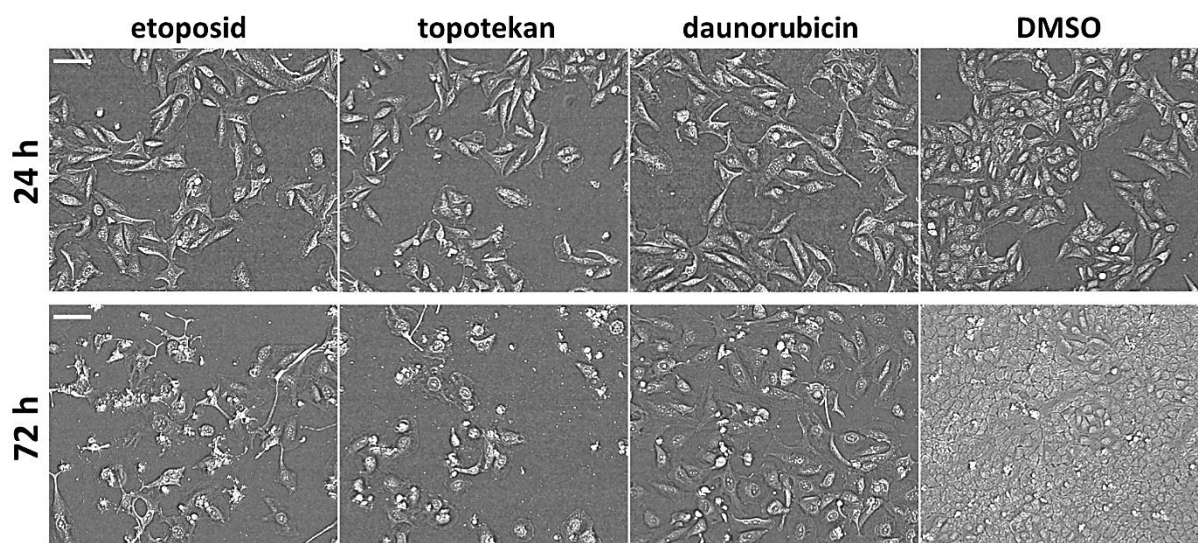
A – klasifikace 5 tříd						B – klasifikace 3 tříd				
Pravá Třída	Predikce					Pravá Třída	Predikce			
	BezO	DMSO	Etop	Topo	Dauno		BezO +DMSO	Etop	Topo +Dauno	
BezO	51	0	0	1	0	BezO	87	0	2	
DMSO	32	4	0	0	1	+DMSO				
Etop	0	0	33	0	0	Etop	0	33	0	
Topo	0	0	0	21	19	Topo	0	0	68	
Dauno	0	0	0	14	14	+Dauno				
Přesnost (%)	61,4	100	100	58,3	61,4	Přesnost (%)	100	100	97,0	
Citlivost (%)	98,1	10,8	100	52,5	98,1	Citlivost (%)	98,0	100	100	

Tabulka 2: Klasifikace aplikací AI metody na DPC snímky buněk U2OS ošetřených inhibitory topoizomerázy v koncentraci 0,5 μ M. **A** – klasifikace 5 tříd s průměrnou přesností 70 %. **B** – snížení počtu tříd na 3, spojením nejednoznačných párů tříd. Toto vedlo k 98% přesnosti klasifikace správné třídy. *provedení klasifikace nebylo součástí této práce.

A – klasifikace 5 tříd						B – klasifikace 3 tříd			
Pravá Třída	Predikce					Pravá Třída	Predikce		
	BezO	DMSO	Etop	Topo	Dauno		BezO +DMSO	Etop	Topo +Dauno
BezO	59	1	0	0	0	BezO	92	0	1
DMSO	28	4	0	1	0	+DMSO			
Etop	1	0	31	1	0	Etop	1	31	1
Topo	0	0	0	16	15	Topo	0	0	66
Dauno	0	0	0	10	25	+Dauno			
Přesnost (%)	67,0	80,0	100	57,1	62,5	Přesnost (%)	98,9	100	97,1
Citlivost (%)	98,3	12,1	93,9	51,6	71,4	Citlivost (%)	98,9	93,9	100



Obrázek 33: Zobrazení jednotlivých tříd látek, případně kontrol, klasifikovaných AI metodou v 2D prostoru. *provedení zobrazení klasifikace nebylo součástí této práce.



Obrázek 34: Buňková linie U2OS ošetřená inhibitory topoizomeráz v koncentraci odpovídající IC₅₀. Zobrazení objektivem 20× s vodní imerzí (měřítko 100 μ m) a DPC metodou.

Tabulka 3: Klasifikace aplikací AI metody na DPC snímky buněk U2OS ošetřených inhibitory topoizomeráz v koncentraci IC50. **A** – klasifikace 5 tříd s průměrnou přesností 87,5 %. **B** – snížení počtu tříd na 4, spojením nejednoznačných párů tříd. Toto vedlo k 97,7% přesnosti klasifikace správné třídy. *provedení klasifikace nebylo součástí této práce.

A – klasifikace 5 tříd						B – klasifikace 3 tříd				
Pravá Třída	Predikce					Pravá Třída	Predikce			
	BezO	DMSO	Etop	Topo	Dauno		BezO +DMSO	Etop	Topo	Dauno
BezO	12	6	0	0	0	BezO	52	0	0	0
DMSO	12	22	0	1	0	+DMSO				
Etop	0	1	37	1	0	Etop	1	37	1	0
Topo	0	0	0	44	1	Topo	0	0	44	1
Dauno	0	0	1	0	39	Dauno	0	1	0	39
Přesnost (%)	50	75,9	97,4	97,8	97,5	Přesnost (%)	98,1	97,4	97,8	97,5
Citlivost (%)	66,7	64,7	94,9	97,8	97,5	Citlivost (%)	100	94,9	97,8	97,5

5.4. Diskuze

V této části práce byly vytvořeny, analyzovány a dále diskutovány datasety pro studii průkazu proveditelnosti fenotypové testovací metody založené na DPC mikroskopii a analýze obrazu umělou inteligencí. Cílem studie bylo identifikovat mechanismus účinku látek mikroskopickou metodou bez potřeby dalšího barvení preparátu, což je nezbytné při použití techniky „cell painting assay“.

Nejprve byla provedena analýza datasetu 1 komerčně dostupným programem Columbus. Tímto programem nebylo možné provést základní segmentaci obrazu na snímcích pořízených DPC technologií (**obrázek 31C**), proto byly dále využity jen fluorescenční snímky. Na **obrázcích 32 a 33** můžeme vidět výpočet intenzity fluorescence, analýzu morfologie a textury SER metodou. Z těchto analýz a výpočtů je patrné, že s časem se prohluboval účinek použitých inhibitorů topoizomerázy. Toto bylo ukázáno nízkým počtem buněk v čase inkubace 72 hodin a vysokým % mrtvých buněk ve stejném čase (**obrázek 32C**), dále velmi nízkým poměrem znásobení populace buněk (**obrázek 32D**), ale také i vyšší intenzitou fluorescence ošetřených buněk (**obrázek 32A**) a změnou jejich buněčné velikosti (**obrázek 32B**). Nejprve, v čase 24 hodin inkubace s látkami, byly ošetřené buňky větší než kontroly, v pozdějším čase byl ale viditelný propad u buněk ošetřených etoposidem a naopak ještě zvýšená velikost buněk ošetřených topotekanem a daunorubicinem. Obecně můžeme říci, že buňky ošetřené inhibitory se lišily od kontrolních buněk, a navíc etoposid vykazoval unikátní profil oproti ostatním dvěma použitým látkám. Toto bylo viditelné i na kalkulaci výskytu spotů (SER-Spot) a SER-Edge profilu.

Při uplatnění analýzy tohoto datasetu pomocí umělé inteligence, přesněji použitím konvoluční neuronové sítě ResNet18, byla provedena klasifikace inhibitorů topoizomerázy na základě jejich účinku na buněčnou linii U2OS. Použitá CNN byla trénovaná end-to-end přímo na vstupních datech bez nutnosti manuální segmentace nebo jakýchkoliv dalších pomocných dat. Hlavním výsledkem byla vícetřídní klasifikační metoda pro DPC snímky. Nicméně klasifikace byla aplikována i na fluorescenční snímky, výsledek je uveden v **tabulce 1**. Nejednoznačné páry (topotekan-daunorubicin a DMSO-bez ošetření) byly často zaměňovány, což vedlo k průměrné přesnosti klasifikace, pouze 65 %. Proto jsou také uvedeny výsledky, kdy byly tyto dvojice posuzovány společně (**tabulka 1B**), výsledkem pak byla téměř dokonalá klasifikace s průměrnou přesností 99 %. Podobných výsledků bylo dosaženo i pro DPC snímky, jak shrnuje **tabulka 2**. Klasifikace 5 tříd vedla k průměrné přesnosti metody 70 %

a při snížení počtu tříd spojením nejednoznačných párů (**tabulka 2B**) byla dosažena průměrná přesnost 98 %. Tímto experimentem jsme prokázali, že DPC snímky jsou pro klasifikaci tříd látek na základě různého mechanismu účinku stejně dobré, jako snímky pořízené fluorescenční mikroskopií. Navíc, pokud zobrazíme v 2D prostoru funkce extrahované z naší CNN pro analýzu obrazových dat, jsme schopni vidět klastrování látek, které odpovídá datům jak z analýzy v programu Columbus, tak samotnou CNN. Na **obrázku 33** můžeme vidět tři shluky látek, přičemž nejednoznačné třídy patří do stejných shluků.

Dále jsme se rozhodli ověřit, zda jsme schopni zcela klasifikovat 5 tříd látek, pokud buňky U2OS ošetříme biologicky aktivní koncentrací, tedy jejich naměřenou hodnotou IC₅₀. Proto jsme zopakovali experiment vícetřídní klasifikace na DPC snímcích z datasetu 2. Již pouhým okem je viditelné, že paterny jednotlivých obrazů se liší v závislosti na použitém inhibitoru a času inkubace, příklad je zobrazen na **obrázku 34**. Samotné výsledky klasifikace se výrazně zlepšily ze 70 % na 87,5 % v případě 5 tříd (uvedeno v **tabulce 3A**). V tomto případě bylo možné rozlišit dříve nejednoznačný pár topotekan-daunorubicin. Spojením třídy DMSO a snímků buněk bez ošetření, které jsou skutečně nejednoznačné páry, vedlo k téměř dokonalé přesnosti klasifikace 98 % pro problém 4 tříd (**tabulka 3B**), stejně jako jsme dříve pozorovali u klasifikace 3 tříd (**tabulka 2B**).

Námi využívané mikroskopické snímky získané DPC technikou jsou rychleji a snadněji získatelné než fluorescenční snímky a podporují zobrazování živých buněk. Naše metoda dokáže rozlišit testovaná cytotoxická léčiva s přesností 98 %, za předpokladu, že se liší jejich mechanismus účinku. Výsledky jsou přesnější, když se použijí koncentrace biologicky relevantní pro testovanou látku. Dále jsme ukázali, že 2D vizualizace sdílených funkcí klasifikace odhaluje shluky, které dobře odpovídají zadaným třídám látek, což znamená možné použití naší metodologie pro vývoj a výzkum léčiv, kdy by se mohla uplatnit při identifikaci mechanismu účinků látek. Naše metoda může zlepšit rychlost a přesnost testování, což potenciálně vede ke zlepšení účinnosti procesu objevování léků, a tím i k lepším klinickým výsledkům v dlouhodobém horizontu. Hlavním omezením naší studie je relativně malá velikost souboru dat – plánujeme jej rozšířit na mnohem větší soubor dat s více aktivními látkami, různými mechanismy účinku a možná i více typy buněčných linií a dalšími matoucími faktory, které by měly zlepšit robustnost klasifikace.

6. Závěr

Součástí práce byly získány a publikovány důležité poznatky o biologické aktivitě derivátů kyseliny betulinové s BODIPY. Tyto výsledky nejenže přispívají k porozumění chemie a biologie derivátů kyseliny betulinové, ale také zdůrazňují potenciál těchto látek pro následný vývoj léčiv. Důkladná charakterizace biologické aktivity a mechanismů účinku těchto konjugátů představuje důležitý krok směrem k aplikaci triterpenů v léčbě onemocnění. Konjugáty **11** a **16** s BODIPY emitující modrou fluorescencí, které vykazují lokalizaci v konkrétních částech buňky, mohou proto sloužit jako základ pro vývoj léčiv s cíleným působením na mitochondrie, endoplazmatické retikulum nebo jiné organely.

Dále byly získány a publikovány výsledky studie konjugátů s disulfidovým linkerem, které umožňují uvolňování aktivní látky v přítomnosti thiolů, a mohou být využity pro cílené uvolňování léčiv v konkrétních buňkách nebo mikroprostředí s vysokým obsahem thiolů. Konjugát **20**, který prokázal specifické cílení na integrinové receptory, může být perspektivní pro vývoj teranostik zaměřených na buňky s vyšším výskytem těchto receptorů, což je typické například pro nádorové buňky.¹⁶⁰

V neposlední řadě byly získány a publikovány výsledky studie zaměřené na ověření proveditelnosti fenotypové testovací metody s využitím DPC mikroskopie a analýzy obrazu pomocí umělé inteligence. Klasifikace inhibitorů topoizomerázy pomocí hlubokého učení může být aplikována ve vývoji nových látek s léčebným potenciálem. Metodika použitá v této části práce může být implementována a rozvíjena v dalších studiích k posouzení účinků různých látek na buněčné struktury s vysokou přesností.

Závěrem, tato práce přináší příklady využití mikroskopických metod k lokalizaci nebo identifikaci buněčných cílů a mechanismu účinku biologicky aktivních látek. Mikroskopie patří mezi velmi vyhledávanou techniku ve vývoji nových léčiv^{4,13,161-163}, především ve spojení s vysokopropustným testováním¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ a stále častěji i umělou inteligencí.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Výsledky této práce mají tedy potenciál v několika vědeckých oblastech, především v biomedicinském výzkumu a vývoji léčiv a personalizované medicíně. Toto bylo také prokázáno jejich publikováním v časopisech spadajících do kategorie QD-Q2 dle hodnocení Journal Citation Reports™ vedeného Web of Science.

7. Summary

As part of this research, significant findings regarding the biological activity of betulinic acid derivatives with BODIPY have been obtained and published. These results contribute to the understanding of the chemistry and biology of betulinic acid derivatives, emphasizing the potential of these substances for subsequent drug development. The comprehensive characterization of the biological activity and mechanisms of action of these conjugates represents a crucial step toward applying triterpenes in disease treatment. Notably, the blue-fluorescent BODIPY conjugates **11** and **16**, which exhibit localization in specific cellular compartments, may serve as a foundation for developing drugs targeting mitochondria, endoplasmic reticulum, or other organelles.

Additionally, the study's results on conjugates featuring a disulfide linker have been obtained and published. These conjugates facilitate the release of the active substance in the presence of thiols, providing a means for targeted drug release in specific cells or microenvironments with a high thiol content. Notably, conjugate **20**, which exhibited specific integrin-targeting receptors, holds promise for the development of theranostics aimed at cells with a higher abundance of these receptors, a characteristic often observed in tumor cells.¹⁶⁰

Lastly, the results of the proof-of-concept study on the phenotypic screening method, conducted using DPC microscopy and image analysis through artificial intelligence, have been obtained and published. The application of deep learning for the classification of topoisomerase inhibitors can be pivotal in the development of new agents with therapeutic potential. The methodology employed in this section of the work can be extrapolated to other research studies, offering a high-accuracy assessment of the effects of various substances on cellular structures.

In conclusion, this work exemplifies the application of microscopic methods for the localization and identification of cellular targets associated with biologically active substances. Microscopy stands out as a highly sought-after technique in of new drug development^{4,13,161-163}, particularly in combination with high-throughput screening¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ and, increasingly, artificial intelligence.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Consequently, the findings from this work have significant potential across various scientific fields, especially in biomedical research, drug development, and personalized medicine. This potential was further demonstrated by the publication of these results in journals categorized as QD-Q2 according to the Journal Citation Reports™ ranking maintained by Web of Science.

8. Seznam zkratek

3HQ	2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolinon
ABPP	activity-based profiling, profilování proteinů na základě aktivity
AI	artificial intelligence, umělá inteligence
ATCC	american tissue culture collection, americká sbírka tkáňových kultur
BA	betulinová kyselina
BODIPY	dipyrrromethenbordifluorid
BT	beviritmat
CNN	convolutational neural networks, konvoluční neuronové sítě
cRGD	cyklická forma RGD peptidu
DDS	drug delivery system, transportní lékový systém
DPC	digital phase contrast, digitální fázový kontrast
ER	endoplazmatické retikulum
F.I.	intenzita fluorescence
FRET	Forster resonance energy transfer, Forsterův rezonanční přenos energie
GA	Golgiho aparát
GSH	glutathion, redukováná forma
GSHOEt	ethylester glutathionu
HCA	high-content analysis, vysokokapacitní analýza
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina
HTS	high-throughput screening, vysokopropustné testování
MDR1	multi-drug resistance transporter protein 1
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
NF-κB	nukleární faktor kappa B

NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
RFUs	relativní jednotky fluorescence
ResNet	residual network, reziduální síť
RGD peptid	peptid složený ze sekvence argininu, glycinu a asparaginu
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát–polyakrylamidová gelová elektroforéza
SER	spot, edge, ridge metoda
TCA	trichloroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran

9. Reference

1. Davis R. L.: *iScience* 23, 101487 (2020). doi:10.1016/j.isci.2020.101487.
2. Tautermann C. S. v knize: *Quantum Mechanics in Drug Discovery* (Heifetz A., ed.) kap. 1, str. 1. Humana New York, NY 2020. doi:10.1007/978-1-0716-0282-9_1.
3. Ayon N. J.: *Metabolites* 13, 625 (2023). doi:10.3390/metabo13050625.
4. Stossi F., Singh P. K., Safari K., Marini M., Labate D., Mancini M. A.: *Biochemical Pharmacology* 216, 115770 (2023). doi:10.1016/j.bcp.2023.115770.
5. Rauscher B., Heigwer F., Breinig M., Winter J., Boutros M.: *Nucleic Acids Research* 45, D679 (2017). doi:10.1093/nar/gkw997.
6. Yue Q. X., Xie F. B., Guan S. H., Ma C., Yang M., Jiang B. H., Liu X., Guo D. A.: *Cancer Science* 99, 1461 (2008). doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00824.x.
7. Kovacevic T., Nujic K., Cindric M., Dragojevic S., Vinter A., Hozic A., Mesic M.: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 38, 2183809 (2023). doi:10.1080/14756366.2023.2183809.
8. Eirich J., Orth R., Sieber S. A.: *Journal of the American Chemical Society* 133, 12144 (2011). doi:10.1021/ja2039979.
9. Hrubá L., Polishchuk P., Das V., Hajduch M., Dzubak P.: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146, 112549 (2022). doi:10.1016/j.biopha.2021.112549.
10. Newman H., Krajnc A., Bellini D., Eyermann C. J., Boyle G. A., Paterson N. G., McAuley K. E., Lesniak R., Gangar M., von Delft F., Brem J., Chibale K., Schofield C. J., Dowson C. G.: *Journal of Medicinal Chemistry* 64, 11379 (2021). doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00717.
11. Kumar N., Acharya V.: *Journal of Cheminformatics* 14, 48 (2022). doi:10.1186/s13321-022-00630-7.
12. Xu Y. X., Zheng X. K., Li Y. J., Ye X. M., Cheng H. T., Wang H., Lyu J.: *Journal of Evidence Based Medicine* (2023). doi:10.1111/jebm.12548.
13. Bullen A.: *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 54 (2008). doi:10.1038/nrd2446.

14. Abdelfatah S., Berg A., Böckers M., Efferth T.: *Journal of Advanced Research* 16, 145 (2019). doi:10.1016/j.jare.2018.10.002.
15. Abu-Elheiga L., Brinkley W. R., Zhong L., Chirala S. S., Woldegiorgis G., Wakil S. J.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1444 (2000). doi:10.1073/pnas.97.4.1444.
16. Gao B. B., Gao L., Wang F.: *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 16, (2023). doi:10.1142/s1793545822300087.
17. Petschnigg J., Kotlyar M., Blair L., Jurisica I., Stagljär I., Ketteler R.: *Journal of Molecular Biology* 429, 280 (2017). doi:10.1016/j.jmb.2016.12.006.
18. Ropraz P., Imhof B. A., Matthes T., Wehrle-Haller B., Sidibé A.: *Journal of Visualized Experiments* e58509 (2018). doi:10.3791/58509.
19. Vejux A., Kahn E., Dumas D., Bessède G., Ménétrier F., Athias A., Riedinger J. M., Frouin F., Stoltz J. F., Ogier-Denis E., Todd-Pokropek A., Lizard G.: *Cytometry Part A* 64A, 87 (2005). doi:10.1002/cyto.a.20124.
20. Dunn M., Boltaev U., Beskow A., Pampou S., Realubit R., Meira T., Silva J. V., Reeb R., Karan C., Jockusch S., Sulzer D., Chang Y. T., Sames D., Waites C. L.: *Acs Chemical Neuroscience* 9, 673 (2018). doi:10.1021/acscchemneuro.7b00263.
21. Hardebeck S., Schreiber S., Adick A., Langer K., Jose J.: *International Journal of Molecular Sciences* 24, 11858 (2023). doi:10.3390/ijms241411858.
22. Wang Y., Zhao X. P., Gao X. M., Nie X. J., Yang Y. X., Fan X. H.: *Analytica Chimica Acta* 702, 87 (2011). doi:10.1016/j.aca.2011.06.020.
23. Abu-Abied M., Avisar D., Belausov E., Holdengreber V., Kam Z., Sadot E.: *Protoplasma* 236, 3 (2009). doi:10.1007/s00709-009-0038-7.
24. Bray M. A., Singh S., Han H., Davis C. T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S. M., Gibson C. C., Carpenter A. E.: *Nature Protocols* 11, 1757 (2016). doi:10.1038/nprot.2016.105.
25. Menduti G., Boido M.: *International Journal of Molecular Sciences* 24, 14689 (2023). doi:10.3390/ijms241914689.

26. Matula P., Kumar A., Wörz I., Erfle H., Bartenschlager R., Eils R., Rohr K.: *Cytometry Part A* 75A, 309 (2009). doi:10.1002/cyto.a.20662.
27. Pomerantz A. K., Sari-Sarraf F., Grove K. J., Pedro L., Rudewicz P. J., Fathman J. W., Krucker T.: *Expert Opinion on Drug Discovery* 14, 115 (2019). doi:10.1080/17460441.2019.1559147.
28. Razansky D., Deliolanis N. C., Vinegoni C., Ntziachristos V.: *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13, 504 (2012). doi:10.2174/138920112799436258.
29. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K.: *Chemical Society Reviews* 44, 4953 (2015). doi:10.1039/c5cs00030k.
30. Loudet A., Burgess K.: *Chemical Reviews* 107, 4891 (2007). doi:10.1021/cr078381n.
31. Treibs A., Kreuzer F. H.: *Liebigs Ann. Chem.* 718, 208 (1968). doi.org/10.1002/jlac.19687180119.
32. Fetz V., Prochnow H., Bronstrup M., Sasse F.: *Natural Product Reports* 33, 655 (2016). doi:10.1039/c5np00113g.
33. Zhang X. J., Wen J. Y., Bidasee K. R., Besch H. R., Wojcikiewicz R. J. H., Lee B., Rubin R. P.: *Biochemical Journal* 340, 519 (1999). doi:10.1042/0264-6021:3400519.
34. Bradshaw T. D., Dive C., Gescher A.: *British Journal of Cancer* 62, 538 (1990).
35. Xu S. T., Luo S. S., Yao H., Cai H., Miao X. M., Wu F., Yang D. H., Wu X. M., Xie W. J., Yao H. Q., Chen Z. S., Xu J. Y.: *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 5022 (2016). doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00408.
36. Umezawa K., Yoshida M., Kamiya M., Yamasoba T., Urano Y.: *Nature Chemistry* 9, 279 (2017). doi:10.1038/nchem.2648.
37. Zhang X., Ba Q., Gu Z. N., Guo D. L., Zhou Y., Xu Y. E., Wang H., Ye D. J., Liu H.: *Chemistry-a European Journal* 21, 17415 (2015). doi:10.1002/chem.201502543.
38. Takahashi M., Kawamura A., Kato N., Nishi T., Hamachi I., Ohkanda J.: *Angewandte Chemie-International Edition* 51, 509 (2012). doi:10.1002/anie.201106995.
39. Sung D. B., Lee J. S.: *Rsc Medicinal Chemistry* 14, 412 (2023). doi:10.1039/d2md00376g.

40. Antina E., Bumagina N., Marfin Y., Guseva G., Nikitina L., Sbytov D., Telegin F.: *Molecules* 27, 1396 (2022). doi:10.3390/molecules27041396.
41. Tholl D.: *Current Opinion in Plant Biology* 9, 297 (2006). doi:10.1016/j.pbi.2006.03.014.
42. Juang Y. P., Liang P. H.: *Molecules* 25, 4974 (2020). doi:10.3390/molecules25214974.
43. Gang F. L., Zhu F., Yang C. F., Li X. T., Yang H., Sun M. X., Wu W. J., Zhang J. W.: *Natural Product Research* 34, 1521 (2020). doi:10.1080/14786419.2018.1519709.
44. Ighachane H., Boualy B., Ali M. A., Sedra M. H., El Firdoussi L., Lazrek H. B.: *Advances in Materials Science and Engineering* 2017, 2784303 (2017). doi:10.1155/2017/2784303.
45. Gur'eva Y. A., Zalevskaya O. A., Shevchenko O. G., Slepukhin P. A., Makarov V. A., Kuchin A. V.: *Rsc Advances* 12, 8841 (2022). doi:10.1039/d2ra00223j.
46. Novotna E., Waisser K., Kunes J., Palat K., Buchta V., Stolarikova J., Beckert R., Wsol V.: *Archiv Der Pharmazie* 347, 381 (2014). doi:10.1002/ardp.201300407.
47. Wu H. F., Morris-Natschke S. L., Xu X. D., Yang M. H., Cheng Y. Y., Yu S. S., Lee K. H.: *Medicinal Research Reviews* 40, 2339 (2020). doi:10.1002/med.21708.
48. Song J. G., Su J. C., Song Q. Y., Huang R. L., Tang W., Hu L. J., Huang X. J., Jiang R. W., Li Y. L., Ye W. C., Wang Y.: *Organic Letters* 21, 9579 (2019). doi:10.1021/acs.orglett.9b03743.
49. Alho D. P. S., Salvador J. A. R., Cascante M., Marin S.: *Molecules* 24, 2938 (2019). doi:10.3390/molecules24162938.
50. Rogers D., Phillips F. L., Joshi B. S., Viswanathan N.: *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1048 (1980). doi:10.1039/c39800001048.
51. Vo N. N. Q., Nomura Y., Muranaka T., Fukushima E. O.: *Journal of Natural Products* 82, 3311 (2019). doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00538.
52. Villarroel-Vicente C., Gutierrez-Palomo S., Ferri J., Cortes D., Cabedo N.: *European Journal of Medicinal Chemistry* 221, 113535 (2021). doi:10.1016/j.ejmech.2021.113535.
53. Yang H. J., Dou Q. P.: *Current Drug Targets* 11, 733 (2010). doi:10.2174/138945010791170842.

54. Rybalkina E. Y., Moiseeva N. I., Karamysheva A. F., Eroshenko D. V., Konysheva A. V., Nazarov A. V., Grishko V. V.: *Chemico-Biological Interactions* 348, 109645 (2021). doi:10.1016/j.cbi.2021.109645.
55. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M.: *Cancer Research* 57, 4956 (1997).
56. Xu Y., Shu B., Tian Y., Wang G. X., Wang Y. J., Wang J. W., Dong Y. F.: *Molecular Carcinogenesis* 57, 896 (2018). doi:10.1002/mc.22810.
57. Bhola P. D., Letai A.: *Molecular Cell* 61, 695 (2016). doi:10.1016/j.molcel.2016.02.019.
58. Sousa J. L. C., Freire C. S. R., Silvestre A. J. D., Silva A. M. S.: *Molecules* 24, 355 (2019). doi:10.3390/molecules24020355.
59. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: *Cancer Letters* 175, 17 (2002). doi:10.1016/s0304-3835(01)00718-2.
60. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Dasgupta T. K., Pezzuto J. M.: *Nature Medicine* 1, 1046 (1995). doi:10.1038/nm1095-1046.
61. Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y.: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45, 1665 (1997). doi.org/10.1248/cpb.45.1665
62. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: *Journal of Natural Products* 57, 243 (1994). doi:10.1021/np50104a008.
63. Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E., Debatin K. M.: *Journal of Biological Chemistry* 273, 33942 (1998). doi:10.1074/jbc.273.51.33942.
64. Melzig M. F., Bormann H.: *Planta Medica* 64, 655 (1998). doi:10.1055/s-2006-957542.
65. Kwon H. J., Shim J. S., Kim J. H., Cho H. Y., Yum Y. N., Kim S. H., Yu J.: *Japanese Journal of Cancer Research* 93, 417 (2002). doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb01273.x.
66. Mullauer F. B., van Bloois L., Daalhuisen J. B., Ten Brink M. S., Storm G., Medema J. P., Schiffelers R. M., Kessler J. H.: *Anti-Cancer Drugs* 22, 223 (2011). doi:10.1097/CAD.0b013e3283421035.

67. Kashiwada Y., Nagao T., Hashimoto A., Ikeshiro Y., Okabe H., Cosentino L. M., Lee K. H.: *Journal of Natural Products* 63, 1619 (2000). doi:10.1021/np990633v.
68. Sundquist W. I., Kräusslich H. G.: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006924 (2012). doi:10.1101/cshperspect.a006924.
69. Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin D. E.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3574 (2007). doi:10.1128/aac.00152-07.
70. Martin D. E., Blum R., Wilton J., Doto J., Galbraith H., Burgess G. L., Smith P. C., Ballow C.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3063 (2007). doi:10.1128/aac.01391-06.
71. Margot N. A., Gibbs C. S., Miller M. D.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 2345 (2010). doi:10.1128/aac.01784-09.
72. Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran P., Siddiqui M. J. A., Srivastava S. K., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 2181 (2004). doi:10.1016/j.bmcl.2004.02.044.
73. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 2405 (2001). doi:10.1016/s0960-894x(01)00460-7.
74. Chowdhury A. R., Mandal S., Mitra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K.: *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 8, BR254 (2002).
75. Bildziukevich U., Vida N., Rárová L., Kolár M., Saman D., Havlíček L., Drasar P., Wimmer Z.: *Steroids* 100, 27 (2015). doi:10.1016/j.steroids.2015.04.005.
76. Bildziukevich U., Rárová L., Janovská L., Saman D., Wimmer Z.: *Steroids* 148, 91 (2019). doi:10.1016/j.steroids.2019.04.004.
77. Krajcovicova S., Stankova J., Dzubak P., Hajdich M., Sural M., Urban M.: *Chemistry-a European Journal* 24, 4957 (2018). doi:10.1002/chem.201706093.
78. Brandes B., Hoenke S., Fischer L., Csuk R.: *Eur J Med Chem* 185, 111858 (2020). doi:10.1016/j.ejmech.2019.111858.

79. Hoenke S., Brandes B., Csuk R.: *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 7, 100099 (2023). doi:10.1016/j.ejmcr.2022.100099.
80. Spivak A. Y., Davletshin E. V., Gubaidullin R. R., Tukhbatullin A. A., Nedopekina D. A.: *Chemistry of Natural Compounds* 58, 1062 (2022). doi:10.1007/s10600-022-03869-6.
81. Gubaidullin R., Nedopekina D., Tukhbatullin A., Davletshin E., Spivak A.: *Chemistry Proceedings* 3, (2021). doi:10.3390/ecsoc-24-08102.
82. Kodr D., Stankova J., Rumlova M., Dzubak P., Rehulka J., Zimmermann T., Krizova I., Gurska S., Hajdich M., Drasar P. B., Jurasek M.: *Biomedicines* 9, 1104 (2021). doi:10.3390/biomedicines9091104.
83. Datta S., Asim M. N., Dengel A., Ahmed S.: *Briefings in Functional Genomics* (2023). doi:10.1093/bfgp/elad018.
84. Hoenke S., Serbian I., Deigner H. P., Csuk R.: *Molecules* 25, 5443 (2020). doi:10.3390/molecules25225443.
85. Kaminskas L. M., Pyke S. M., Burcham P. C.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 1155 (2007). doi:10.1002/rcm.2945.
86. Ye Y. Q., Zhang T., Yuan H. Q., Li D. F., Lou H. X., Fan P. H.: *Journal of Medicinal Chemistry* 60, 6353 (2017). doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00679.
87. Mitsuda S., Yokomichi T., Yokoigawa J., Kataoka T.: *Febs Open Bio* 4, 229 (2014). doi:10.1016/j.fob.2014.02.009.
88. Suresh C., Zhao H., Gumbs A., Chetty C. S., Bose H. S.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 1734 (2012). doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.102.
89. Cheng Y., Shao Y. D., Yan W. D.: *Journal of Chemical and Engineering Data* 56, 4587 (2011). doi:10.1021/je200531k.
90. Bildziukevich U., Rarova L., Janovska L., Saman D., Wimmer Z.: *Steroids* 148, 91 (2019). doi:10.1016/j.steroids.2019.04.004.
91. Sommerwerk S., Heller L., Kerzig C., Kramell A. E., Csuk R.: *European Journal of Medicinal Chemistry* 127, 1 (2017). doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.040.
92. Wolfram R. K., Heller L., Csuk R.: *European Journal of Medicinal Chemistry* 152, 21 (2018). doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.031.

93. Sim P. F., Wan Mohamad Noor W. N. I., Inaba T., Suetsugu S., v knize: Plasma Membrane Shaping (Suetsugu S., ed.), str. 7. Academic Press, 2023.
94. Lu Z. R., Qiao P.: *Molecular Pharmaceutics* 15, 3603 (2018). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00037.
95. Zhang D. W., Cochrane J. R., Martinez A., Gao G. H.: *Rsc Advances* 4, 29735 (2014). doi:10.1039/c4ra02828g.
96. Shanmugaraju S., Mukherjee P. S.: *Chemical Communications* 51, 16014 (2015). doi:10.1039/c5cc07513k.
97. Rasheed T., Bilal M., Nabeel F., Adeel M., Iqbal H. M. N.: *Environment International* 122, 52 (2019). doi:10.1016/j.envint.2018.11.038.
98. Lee M. H., Kim J. S., Sessler J. L.: *Chemical Society Reviews* 44, 4185 (2015). doi:10.1039/c4cs00280f.
99. Wu P., Hou X. D., Xu J. J., Chen H. Y.: *Nanoscale* 8, 8427 (2016). doi:10.1039/c6nr01912a.
100. Mao Z. Q., Kim J. H., Lee J., Xiong H., Zhang F., Kim J. S.: *Coordination Chemistry Reviews* 476, 214908 (2023). doi:10.1016/j.ccr.2022.214908.
101. Wu G. Y., Fang Y. Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D.: *Journal of Nutrition* 134, 489 (2004). doi:10.1093/jn/134.3.489.
102. Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H.: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 145 (2003). doi:10.1016/s0753-3322(03)00043-x.
103. Balendiran G. K., Dabur R., Fraser D.: *Cell Biochemistry and Function* 22, 343 (2004). doi:10.1002/cbf.1149.
104. Britten R. A., Green J. A., Warenus H. M.: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 24, 527 (1992). doi:10.1016/0360-3016(92)91069-y.
105. Lee M. H., Sessler J. L., Kim J. S.: *Accounts of Chemical Research* 48, 2935 (2015). doi:10.1021/acs.accounts.5b00406.
106. Xu F. N., Li X. L., Huang X. H., Pan J. M., Wang Y., Zhou S. B.: *Science Advances* 6, eabb8725 (2020). doi:10.1126/sciadv.abb8725.

107. Lai J. P., Shah B. P., Garfunkel E., Lee K. B.: *Acs Nano* 7, 2741 (2013). doi:10.1021/nn400199t.
108. Santra S., Kaittanis C., Santiesteban O. J., Perez J. M.: *Journal of the American Chemical Society* 133, 16680 (2011). doi:10.1021/ja207463b.
109. Liu Y., Pei Q., Chen L., Li Z. S., Xie Z. G.: *Journal of Materials Chemistry B* 4, 2332 (2016). doi:10.1039/c6tb00009f.
110. Hu Y. Y., Zeng F.: *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 72, 77 (2017). doi:10.1016/j.msec.2016.11.056.
111. Chen S. Y., Zhao X. R., Chen J. Y., Chen J., Kuznetsova L., Wong S. S., Ojima I.: *Bioconjugate Chemistry* 21, 979 (2010). doi:10.1021/bc9005656.
112. Dcona M. M., Sheldon J. E., Mitra D., Hartman M. C. T.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27, 466 (2017). doi:10.1016/j.bmcl.2016.12.036.
113. Cho H. J., Lee S. J., Park S. J., Paik C. H., Lee S. M., Kim S., Lee Y. S.: *Journal of Controlled Release* 237, 177 (2016). doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.032.
114. Liu Z. G., Yu L., Wang X. B., Zhang X. T., Liu M. H., Zeng W. B.: *Current Protein & Peptide Science* 17, 570 (2016). doi:10.2174/1389203717666160101124015.
115. Sancey L., Garanger E., Foillard S., Schoehn G., Hurbin A., Albiges-Rizo C., Boturyn D., Souchier C., Grichine A., Dumy P., Coll J. L.: *Molecular Therapy* 17, 837 (2009). doi:10.1038/mt.2009.29.
116. Danhier F., Le Breton A., Pr  at V.: *Molecular Pharmaceutics* 9, 2961 (2012). doi:10.1021/mp3002733.
117. Nieberler M., Reuning U., Reichart F., Notni J., Wester H. J., Schwaiger M., Weinm  ller M., R  der A., Steiger K., Kessler H.: *Cancers* 9, 116 (2017). doi:10.3390/cancers9090116.
118. Rolli M., Fransvea E., Pilch J., Saven A., Felding-Habermann B.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9482 (2003). doi:10.1073/pnas.1633689100.
119. Chen X. Y., Sievers E., Hou Y. P., Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading J. R., Conti P. S.: *Neoplasia* 7, 271 (2005). doi:10.1593/neo.04538.

120. Seftor R. E. B., Seftor E. A., Gehlsen K. R., Stetlerstevenson W. G., Brown P. D., Ruoslahti E., Hendrix M. J. C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1557 (1992). doi:10.1073/pnas.89.5.1557.
121. Gladson C. L., Cheresch D. A.: *Journal of Clinical Investigation* 88, 1924 (1991). doi:10.1172/jci115516.
122. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.: *Science* 279, 377 (1998). doi:10.1126/science.279.5349.377.
123. Dal Pozzo A., Ni M. H., Esposito E., Dallavalle S., Musso L., Bargiotti A., Pisano C., Vesci L., Bucci F., Castorina M., Foderà R., Giannini G., Aulicino C., Penco S.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 64 (2010). doi:10.1016/j.bmc.2009.11.019.
124. Chen X. Y., Plasencia C., Hou Y. P., Neamati N.: *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 1098 (2005). doi:10.1021/jm049165z.
125. Reardon D. A., Neyns B., Weller M., Tonn J. C., Nabors L. B., Stupp R.: *Future Oncology* 7, 339 (2011). doi:10.2217/fon.11.8.
126. Ma Y. F., Huang J., Song S. J., Chen H. B., Zhang Z. J.: *Small* 12, 4936 (2016). doi:10.1002/smll.201600635.
127. Fernandez A., Vendrell M.: *Biochemistry* 57, 175 (2018). doi:10.1021/acs.biochem.7b00889.
128. Zhuang C. L., Guan X. H., Ma H., Cong H., Zhang W. N., Miao Z. Y.: *European Journal of Medicinal Chemistry* 163, 883 (2019). doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.035.
129. Casi G., Neri D.: *Journal of Medicinal Chemistry* 58, 8751 (2015). doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00457.
130. Hradil P., Hlavác J., Soral M., Hajdúch M., Kolár M., Vecerová R.: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9, 696 (2009). doi:10.2174/138955709788452720.
131. Jain A. K., Gund M. G., Desai D. C., Borhade N., Senthilkumar S. P., Dhiman M., Mangu N. K., Mali S. V., Dubash N. P., Halder S., Satyam A.: *Bioorganic Chemistry* 49, 40 (2013). doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.06.007.
132. Costantini P., Colonna R., Bernardi P.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1365, 385 (1998). doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00090-5.

133. García N., Pavón N., Chávez E.: *Cell Biochemistry and Biophysics* 51, 81 (2008). doi:10.1007/s12013-008-9016-5.
134. Motyka K., Hlaváč J., Soural M., Funk P.: *Tetrahedron Letters* 51, 5060 (2010). doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.07.103.
135. Cagno M. d., Stein P. C., Styskala J., Hlaváč J., Skalko-Basnet N., Bauer-Brandl A.: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 657 (2012). doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.11.016.
136. Jo S. D., Ku S. H., Won Y.-Y., Kim S. H., Kwon I. C.: *Theranostics* 6, 1362 (2016). doi:10.7150/thno.15335.
137. Isgut M., Rao M., Yang C. H., Subrahmanyam V., Rida P. C. G., Aneja R.: *Medicinal Research Reviews* 38, 504 (2018). doi:10.1002/med.21444.
138. Plowright A. T., Drowley L.: *Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 50: Platform Technologies in Drug Discovery and Validation* 50, 263 (2017). doi:10.1016/bs.armc.2017.07.001.
139. Lang P., Yeow K., Nichols A., Scheer A.: *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 343 (2006). doi:10.1038/nrd2008.
140. Carracedo-Reboredo P., Liñares-Blanco J., Rodríguez-Fernández N., Cedrón F., Novoa F. J., Carballal A., Maojo V., Pazos A., Fernandez-Lozano C.: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19, 4538 (2021). doi:10.1016/j.csbj.2021.08.011.
141. Barucic D., Kaushik S., Kybic J., Stanková J., Dzubák P., Hajdúch M.: *Computers in Biology and Medicine* 151, 106171 (2022). doi:10.1016/j.compbiomed.2022.106171.
142. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A.: *Nature Methods* 9, 676 (2012). doi:10.1038/nmeth.2019.
143. de Chaumont F., Dallongeville S., Chenouard N., Hervé N., Pop S., Provoost T., Meas-Yedid V., Pankajakshan P., Lecomte T., Le Montagner Y., Lagache T., Dufour A., Olivo-Marin J. C.: *Nature Methods* 9, 690 (2012). doi:10.1038/nmeth.2075.

144. Carpenter A. E., Jones T. R., Lamprecht M. R., Clarke C., Kang I. H., Friman O., Guertin D. A., Chang J. H., Lindquist R. A., Moffat J., Golland P., Sabatini D. M.: *Genome Biology* 7, R100 (2006). doi:10.1186/gb-2006-7-10-r100.
145. Pau G., Fuchs F., Sklyar O., Boutros M., Huber W.: *Bioinformatics* 26, 979 (2010). doi:10.1093/bioinformatics/btq046.
146. Gupta A., Harrison P. J., Wieslander H., Pielawski N., Kartasalo K., Partel G., Solorzano L., Suveer A., Klemm A. H., Spjuth O., Sintorn I. M., Wählby C.: *Cytometry Part A* 95A, 366 (2019). doi:10.1002/cyto.a.23701.
147. Ronneberger O., Fischer P., Brox T.: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, Pt Iii* 9351, 234 (2015). doi:10.1007/978-3-319-24574-4_28.
148. He K.M., Zhang X.Y., Ren S.Q., Sun, J.: *Proceedings of the 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 770 (2016). doi.org/10.1109/CVPR.2016.90.
149. Anwar S. M., Majid M., Qayyum A., Awais M., Alnowami M., Khan M. K.: *Journal of Medical Systems* 42, 226 (2018). doi:10.1007/s10916-018-1088-1.
150. Yang R. X., Yu Y. Y.: *Frontiers in Oncology* 11, 638182 (2021). doi:10.3389/fonc.2021.638182.
151. Maduranga K. D. G., Zadorozhnyy V., Ye Q.: *Neural Computing & Applications* 35, 4421 (2023). doi:10.1007/s00521-022-08168-3.
152. Wang W., Yang Y. J., Wang X., Wang W. Z., Li J.: *Optical Engineering* 58, 040901 (2019). doi:10.1117/1.oe.58.4.040901.
153. Vodrahalli K., Bhowmik A. K.: *Journal of the Society for Information Display* 25, 676 (2017). doi:10.1002/jsid.617.
154. Cao P. P., Zhu Z. Q., Wang Z. Y., Zhu Y. P., Niu Q.: *Neural Computing & Applications* 34, 13387 (2022). doi:10.1007/s00521-022-07368-1.
155. Kang J. S., Kang J. K. Y., Kim J. J., Jeon K. W., Chung H. J., Park B. H.: *Sensors* 23, 1713 (2023). doi:10.3390/s23031713.
156. Yamashita R., Nishio M., Do R. K. G., Togashi K.: *Insights into Imaging* 9, 611 (2018). doi:10.1007/s13244-018-0639-9.

157. Siddique N., Paheding S., Elkin C. P., Devabhaktuni V.: *Ieee Access* 9, 82031 (2021). doi:10.1109/access.2021.3086020.
158. Sohail A., Nawaz N. A., Shah A. A., Rasheed S., Ilyas S., Ehsan M. K.: *Ieee Access* 10, 134557 (2022). doi:10.1109/access.2022.3230983.
159. Atik M.E., Duran Z.: *Proceedings of the Innovations in Smart Cities Applications* 797 (2021). doi.org/10.1007/978-3-030-66840-2_60.
160. Ramsay A. G., Marshall J. F., Hart I. R.: *Cancer and Metastasis Reviews* 26, 567 (2007). doi:10.1007/s10555-007-9078-7.
161. Zhang C. Y., Tian Z. Q., Chen R., Rowan F., Qiu K. Q., Sun Y. J., Guan J. L., Diao J. J.: *Advanced Drug Delivery Reviews* 199, 114978 (2023). doi:10.1016/j.addr.2023.114978.
162. Vinegoni C., Feruglio P. F., Gryczynski I., Mazitschek R., Weissleder R.: *Advanced Drug Delivery Reviews* 151, 262 (2019). doi:10.1016/j.addr.2018.01.019.
163. Yan T. Y., Zeng Q., Wang L., Wang N., Cao H. H., Xu X. Y., Chen X. L.: *Frontiers in Pharmacology* 10, 1438 (2019). doi:10.3389/fphar.2019.01438.
164. Blay V., Tolani B., Ho S. P., Arkin M. R.: *Drug Discovery Today* 25, 1807 (2020). doi:10.1016/j.drudis.2020.07.024.
165. Beghin A., Kechkar A., Butler C., Levet F., Cabillic M., Rossier O., Giannone G., Galland R., Choquet D., Sibarita J. B.: *Nature Methods* 14, 1184 (2017). doi:10.1038/nmeth.4486.
166. Iles L. R., Bartholomeusz G. A.: *High-Throughput Rnai Screening: Methods and Protocols* 1470, 121 (2016). doi:10.1007/978-1-4939-6337-9_10.
167. Hiroshima M., Yasui M., Ueda M.: *Microscopy* 69, 69 (2020). doi:10.1093/jmicro/dfz116.
168. Ramakrishna R. R., Abd Hamid Z., Zaki W., Huddin A. B., Mathialagan R.: *Peerj* 8, e10346 (2020). doi:10.7717/peerj.10346.
169. Kapoor Y., Meyer R. F., Ferguson H. M., Skomski D., Daublain P., Troup G. M., Dalton C., Ramasamy M., Templeton A. C.: *Molecular Pharmaceutics* 18, 2455 (2021). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.1c00210.

10. Bibliografie

Publikace v časopise s IF

- [9] **J. STANKOVÁ**, M. HAJDÚCH, M. JURÁŠEK, P. DŽUBÁK, Terpenes and terpenoids conjugated with BODIPYs: An overview of biological and chemical properties. *Journal of Natural Products* **IF: 5.051** – manuskript v druhém kole recenzního řízení
- [8] **J. STANKOVÁ**, M. HAJDÚCH, P. DŽUBÁK, Identifikace buněčných cílů aktivních látek pomocí mikroskopických metod a fluorescenčních sond. *Chemické listy* **IF: 0.595** – přijatý manuskript (Příloha 1)
- [7] D. BARUCIC, S. KAUSHIK, J. KYBIC, **J. STANKOVÁ**, P. DŽUBÁK, M. HAJDÚCH, Characterization of drug effects on cell cultures from phase-contrast microscopy images, *Computers in Biology and Medicine*, **2022**, 151, 106171, 0010-4825, **IF: 6.698**, PMID: 36306582 (Příloha 6)
- [6] D. KODR*, **J. STANKOVÁ***, M. RUMLOVA, P. DŽUBÁK, J. ŘEHULKA, T. ZIMMERMANN, I. KRIZOVA, S. GURSKÁ, M. HAJDÚCH, P. DRAŠAR, M. JURÁŠEK, Betulinic Acid Decorated with Polar Groups and Blue Emitting BODIPY Dye: Synthesis, Cytotoxicity, Cell-Cycle Analysis and Anti-HIV Profiling, *Biomedicines*, **2021**, 9, 1104, 2227-9059, **IF: 6.081**, PMID: 34572290 (Příloha 2) *sdílené autorství
- [5] M. PORUBSKÝ, K. VYCHODILOVÁ, D. MILICEVIC, M. BUDESINKY, **J. STANKOVÁ**, P. DŽUBÁK, M. HAJDÚCH, J. HLAVÁČ, Cytotoxicity of Amino-BODIPY Modulated via Conjugation with 2-Phenyl-3-Hydroxy-4(1H)-Quinolinones, *ChemistryOpen*, **2021**, 10, 1104-1110, 2191-1363, **IF: 2.911**, PMID: 34427046
- [4] M. PORUBSKÝ, S. GURSKÁ, **J. STANKOVÁ**, M. HAJDÚCH, P. DŽUBÁK, J. HLAVÁČ, AminoBODIPY Conjugates for Targeted Drug Delivery Systems and Real-Time Monitoring of Drug Release, *Molecular Pharmaceutics*, **2021**, 18, 2385-2396, 1543-8384, **IF: 3.500**, PMID: 33961440 (Příloha 5)
- [3] M. PORUBSKÝ, S. GURSKÁ, **J. STANKOVÁ**, M. HAJDÚCH, P. DŽUBÁK, J. HLAVÁČ, Amino-BODIPY as the ratiometric fluorescent sensor for monitoring drug release or "power supply" selector for molecular electronics, *RSC Advances*, **2019**, 9, 25075-25083, 2046-2069, **IF: 3.119**, PMID: 35528670 (Příloha 4)

[2] S. KRAJČOVIČOVÁ, **J. STANKOVÁ**, P. DŽUBÁK, M. HAJDÚCH, M. SOURAL, M. URBAN, A Synthetic Approach for the Rapid Preparation of BODIPY Conjugates and their use in Imaging of Cellular Drug Uptake and Distribution, Chemistry- A European Journal, **2018**, 24, 4957-4966, 0947-6539, **IF: 5.317**, PMID: 29411907 (Příloha 3)

[1] T. OŽDIAN, D. HOLUB, Z. MACEČKOVÁ, L. VARANASI, G. RYLOVÁ, J. ŘEHULKA, J. VÁCLAVKOVÁ, H. SLAVÍK, P. MOUDRÝ, P. ZNOJEK, **J. STANKOVÁ**, J. DE SANCTIS, M. HAJDÚCH, P. DŽUBÁK, Proteomic profiling reveals DNA damage, nucleolar and ribosomal stress are the main responses to oxaliplatin treatment in cancer cells, Journal of Proteomics, **2017**, 162, 73-85, 1874-3919, **IF: 3.867**, PMID: 28478306

Kapitoly v knize

J. STANKOVÁ Reporters for subcellular localization and image analysis v knize: Agrawal K, Bouchal J, Das V, Drábek J, Džubák P, Hajdúch M, Koberna K, Ligasová A, Mistrík M, Sanctis JBD, Srovnal J Laboratory techniques in cellular and molecular medicine, 1st edition, Palacký University Olomouc, **2021**, ISBN 978-80-244-6049-9

Aktivní účast na konferencích s tištěným abstraktem

Stanková J.; Baručić D.; Kybic J.; Džubák P.; Hajdúch M. The drugs' mechanism of action identification with HTS based on digital-phase contrast images analyzed by deep learning method. *SLAS2023 International Conference and Exhibition*. San Diego, USA. 25. 2. – 1. 3. 2023

Stanková J.; Baručić D.; Kybic J.; Džubák P.; Hajdúch M. The drugs' mechanism of action identification based on digital-phase contrast images analyzed by AI. *Czech Annual Cancer Research Meeting*. Olomouc, Česká Republika. 1. – 2. 12. 2022

Stanková J.; Vrbková J.; Holub D.; Džubák P.; Hajdúch M. Czech multi-omics cohort from a proteomics perspective. *IMTM REACTOR: 6th Annual IMTM Retreat*. Velké Karlovice, Česká Republika. 3. – 5. 10. 2022

Stanková J.; Kodr D.; Rumlová M.; Džubák P.; Řehulka J.; Zimmermann T.; Křížová I.; Gurská S.; Hajdúch M.; Drašar P. B.; Jurášek M. Biological properties of Betulinic acid analogues with polar groups and BODIPY dye. *OLAPERMED*. Olomouc, Česká Republika. 25. – 27. 11. 2021

Stanková J.; Václavková J.; Vrbková J.; Holub D.; Srovnal J.; Džubák P.; Hajdúch M. Human plasma analysis by HR-MS: An approach for plasma profiling of large population-based cohort. *IMTM REACTOR*. Skalský dvůr, Česká Republika. 6. – 8. 10. 2021

Stanková J. The MicroScale Thermophoresis: Principles and advantages of technology. *IMTM REACTOR*. Skalský dvůr, Česká Republika. 7. – 9. 9. 2020

Stanková J.; Medvedíková M.; Šárek J.; Vlk M.; Urban M.; Hajdúch M.; Džubák P. Mitochondrial protein Cytochrome c as a molecular target of new betulinic acid derivate JS8 (3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlupan-22-oic acid). *EuPA School of Advanced Practical Proteomics*. Vídeň, Rakousko. 15. – 20. 7. 2018

11. Přílohy

Příloha 1

IDENTIFIKACE BUNĚČNÝCH CÍLŮ AKTIVNÍCH LÁTEK POMOCÍ MIKROSKOPICKÝCH METOD A FLUORESCENČNÍCH SOND

Jarmila Stanková, Marián Hajdúch, Petr Džubák

Jarmila Stanková <https://orcid.org/0000-0002-9200-3107>

Marián Hajdúch <https://orcid.org/0000-0002-4834-908X>

Petr Džubák <https://orcid.org/0000-0002-3098-5969>

*Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v
Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc 9*

J. Stanková, M. Hajdúch, P. Džubák (*Ústav molekulární a translační medicíny, LF UPOL*)

Identifikace buněčných cílů aktivních látek pomocí mikroskopických metod a fluorescenčních sond. Identifikace buněčných cílů aktivních látek má zásadní význam pro optimalizaci léčiv a minimalizaci jejich nežádoucích vedlejších účinků. Komplexní povaha biologických systémů ztěžuje tuto identifikaci, ale mikroskopické metody, zejména fenotypové testování, reprezentované metodou „Cell Painting“, představují cenný nástroj pro pochopení vlivu látek na úrovni buněk a organel. Tyto metody umožňují rychlé testování rozsáhlých knihoven látek a nabízejí unikátní pohled na mechanismus jejich účinku pozorováním chování buněk, pomocí hodnocení jejich morfologie, pohyblivosti, dělení a migrace. Mikroskopie živých buněk čelí výzvám, jako je fototoxicita, což vyžaduje pečlivý výběr fluorescenčních značek a optimalizaci podmínek. Mezi syntetickými fluorescenčními sondami pro mikroskopii živých buněk vynikají BODIPY barviva, se svou syntetickou

univerzálností a fotofyzikálními vlastnostmi, které zajišťují minimální poškození vzorku během biozobrazování.

Klíčová slova: buněčný cíl, mechanismus účinku, mikroskopie, fluorofory, BODIPY

J. Stanková, M. Hajdúch, P. Džubák (*Institute of Molecular and Translational Medicine, LF UPOL*) **Identification of cellular targets of active substances using microscopic methods and fluorescent probes.** Target identification of active substances is critical in optimizing drugs and minimizing side effects. The complex nature of biological systems presents challenges but microscopic methods, particularly phenotypic screening, represented by "Cell Painting" method and fluorescent probes, are valuable tools for understanding the impact of substances at the cellular and organelle levels. These methods enable rapid testing of large libraries of compounds and offer unique insights into their mechanism of action by observing cell behavior, assessing cell morphology, motility, division, and migration. However, live cell microscopy faces challenges like phototoxicity, requiring careful selection of fluorescent labels and the optimized conditions. Among synthetic probes for live cell microscopy, BODIPY dyes stand out for their synthetic versatility and photophysical properties, providing minimal sample damage during bioimaging.

Keywords: drug target, mechanism of action, microscopy, fluorophores, BODIPY

Obsah

1. Úvod
2. Fenotypové testování
- 2.2 Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování
3. Mikroskopie živých buněk
- 3.2 Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk
4. Závěr

1. Úvod

Objevení molekulárního cíle aktivních látek je „svatým grálem“ a mnohdy zásadním krokem ve vývoji léčiv, přičemž v důsledku vede k pochopení jejich mechanismu účinku. Tyto informace jsou nezbytné pro optimalizaci účinnosti léků a minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků. Znalost cíle umožňuje lepší terapeutické zacílení léčiva, optimalizaci klinických studií a vede k ideálu personalizované medicíny. Kromě toho, identifikace nových molekulárních cílů pro existující léčiva může vést k jejich použití v nových terapeutických indikacích, a to v mnohem kratším časovém horizontu než při zcela novém vývoji léčiva. Zacílením vývoje léčiva, také dochází ke zefektivnění celého procesu, a tím i ke snížení nákladů na čas a zdroje potřebné k uvedení konkrétního léku na trh¹. Do vývoje léčiv se přitom investují nemalé prostředky. Bez ohledu na dostupné finanční zdroje může být identifikace molekulárního cíle v kontextu vývoje léčiv náročná z několika objektivních důvodů. Biologické systémy jsou složité a často zahrnují síť vzájemně propojených drah a molekul. Potencionální lék může v různé míře, s různou specificitou a afinitou, interagovat s více cíli, jak žádoucími, tak i nežádoucími (off-target), v různých tkáních nebo buněčných kontextech. Mnoho cílů jsou proteiny, které fungují jako součást větších komplexů nebo nepřímo interagují s jinými proteiny v buněčných drahách. Některá léčiva fungují prostřednictvím nekonvenčních mechanismů, jako je modulace konformace proteinů a interakce s DNA a RNA, jejichž identifikace pomocí tradičních metod může být náročná². Mikroskopické metody, které jsou klíčové pro zobrazování buněk a subcelulárních organel, hrají zásadní roli při identifikaci cílů biologicky aktivních látek. Tyto metody, včetně technik jako fluorescenční a elektronová mikroskopie jsou neocenitelnými nástroji pro studium účinků látek na buněčné struktury a organely³. Tyto látky totiž mohou vyvolat velmi specifické změny jak na buněčné úrovni, tak na úrovni organel. Mohou například způsobit kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra, změnit distribuci cytoplasmu a vést k nabobtnání

a přestavbě mitochondrií. Podle těchto změn můžeme usuzovat na specifický mechanismus účinku látky⁴.

2. Fenotypové testování

Velmi zajímavým přístupem pro hledání mechanismu účinku a molekulárního cíle je fenotypové testování, které analyzuje sloučeniny z hlediska jejich účinku na fenotyp, a to jak na buněčné úrovni, tak i na úrovni celého organismu⁵. Takové testování často začíná výběrem vhodného buněčného modelu a testovacího systému. Většinou jsou potom buňky vystaveny knihovně malých molekul, přírodních produktů nebo jiných aktivních látek a potom pozorujeme a analyzujeme změny jejich fenotypu. Fenotypem se rozumí změny buněčné morfologie, růstu, expresních vzorů, nebo přítomnost specifických markerů⁶. Schéma fenotypového testování je uvedeno na obrázku 1.

Při zapojení platformy pro vysokopropustné testování do fenotypového testování⁷ (High-Throughput Screening, HTS) můžeme v relativně krátkém čase sledovat/detekovat účinek velkého souboru potencionálních sloučenin (knihoven) přičemž testy probíhají v miniaturizovaných podmínkách a automatických režimech. Jedním z nejrychlejších a nejméně invazivních způsobů fenotypového hodnocení stavu buněk je automatická mikroskopie^{4,8}. Celý proces může být robotizován a produkovat obrovské množství mikroskopických obrazů buněk ovlivněných konkrétními látkami v různých časových bodech. Takový přístup poskytuje velmi komplexní data pro identifikaci cíle. Stávající metody jsou obvykle založeny na fluorescenční mikroskopii, která poskytuje velmi přehledné snímky, které lze snadno segmentovat a automaticky vyhodnocovat pomocí relativně jednoduchých metod⁹.

Nejrozšířenější fenotypovou HTS metodou je „Cell Painting“¹⁰ vyvinutý výzkumnou skupinou Anne Carpenterové v roce 2016. Tato metoda je založena na barvení buněk

kombinaci specifických fluorescenčních barviv pro zachycení detailních informací o různých buněčných strukturách a procesech. Takový multiparametrický přístup poskytuje holistický pohled na morfologii a funkci buňky. Po ošetření buněk testovanými látkami, dochází k jejich fixaci a barvení. V originálním protokolu je fluorescenčně barveno jádro a jadérko, cytoskelet, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a plasmatická membrána. Výběr jiného setu fluorescenčních sond dle požadavku na testování určitého cíle je možný, ale pak přicházíme o výhodu porovnatelnosti s původními daty. Na získaných snímcích se následně provádí výpočetní analýza, která generuje kvantitativní data číselně vyjadřující různé obrazové charakteristiky analyzovaných buněk, se kterými je možné dále pracovat. Výstupem je sestavení pomyslných otisků prstů specifických pro testované látky, tedy jejich profilů, které se dále porovnávají s profily získanými testováním standardů nebo látek s požadovanými vlastnostmi. Pokud je v nich významná shoda, můžeme usuzovat na společný mechanismus biologického účinku.

Nedávným příkladem úspěšného fenotypového testování je studie Baillache a kol. 2023¹¹, kde byly identifikovány pyrazolopyrimidiny, které selektivně inhibují CSF-1R kinasu u glioblastomových buněk.

2.2 Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování

Fluorescenční sondy jsou relativně malé molekuly, které obsahují skupiny detekovatelné na základě vnitřní chemické vlastnosti – fluorescence. Fluorescenční molekuly mají schopnost absorbovat energii fotonů v jedné vlnové délce a následně ji vyzářit v jiné vlnové délce. Dále sondy obsahují reaktivní skupinu schopnou se vázat na funkční biomolekuly. Používané fluorescenční sondy by měly dosahovat vysokých kvantových výtěžků a také mít dostatečně posunuté emisní spektrum, aby byla zajištěna izolace detekovaného signálu¹². Většina používaných fluoroforů obsahuje systém aromatických kruhů a přítomnost donátorových

skupin nejčastěji v *ortho*- a *para*- polohách může zvýšit kvantový výtěžek. Naopak přítomnost elektronegativní skupiny kvantový výtěžek snižuje. Další potenciální substituentem s velkým vlivem na fluorescenci jsou těžké atomy. Aromatické kruhy obsahující těžké atomy mají typicky nižší kvantový výtěžek¹³. Nejčastěji používané fluorescenční struktury jsou ve vodě rozpustné deriváty cyaninu, fluoresceinu, rhodaminu a kumarinu¹⁴. Fluorescenční sondy jsou klíčové pro fenotypové testování a mohou být vhodné k barvení fixovaných buněk s permeabilizovanou membránou¹⁵, nebo je možné použít kombinovaný přístup, kdy se barví živé buňky, které jsou následně fixovány a dobarvovány dalšími barviv, které by bez fixace nepronikly buněčnou membránou¹⁶. Důležitou součástí původního protokolu dle Carpenterové¹⁰ je použití specifických fluorescenčních barviv, jejichž charakteristiky jsou podrobněji popsány níže a shrnuty v tabulce I.

Hoechst 33342 patří do rodiny bisbenzimidových barviv a používá se k značení buněčných jader. Specificky se váže na DNA, zejména do míst bohatých na adenin a thymin¹⁷. Název „Hoechst“ pochází od německého výrobce barviv Hoechst AG, který tato barviva původně vyvinul a prodával. Hoechst 33342 proniká přes buněčnou a jadernou membránu, což znamená, že může snadno proniknout i do živých buněk a díky tomu je použitelný pro barvení jader fixovaných i živých buněk. Kromě mikroskopických metod ho lze použít i pro průtokovou cytometrii¹⁸.

Konkanavalin A (ConA) je lektin, tedy typ proteinu, který se může vázat na specifické sacharidové struktury. ConA pochází ze semen tropické bobovité rostliny *Canavalia ensiformis* a je široce používán v buněčné biologii, díky své schopnosti selektivně se vázat na α -mannosylové a α -glukosylové zbytky na glykoproteinech a glykolipidech, včetně buněčných membrán endoplasmatického retikula¹⁹. Tato vazba je závislá na iontech Ca^{2+} a vazebné místo je na každé ze čtyř podjednotek tetrameru tohoto lektinu. ConA je aktivní

mitogen a v buněčné a molekulární biologii se používá ke stimulaci lymfocytů²⁰. Může být konjugován s fluorofory a poté se používá pro metody fluorescenční mikroskopie²¹ nebo průtokové cytometrie²², kdy značí buňky na základě složení povrchových glykoproteinů. ConA se také používá v biochemických purifikačních a chromatografických technikách²³, může být imobilizován na pevných nosičích a použit k separování a izolaci glykoproteinů nebo glykolipidů z komplexních směsí. Vazebná afinita lektinu může být ovlivněna různými typy glykosylace přítomnými na buněčném povrchu.

SYTO 14 patří do rodiny barviv SYTO, což jsou buněčná permeabilní barviva, vázající se na nukleové kyseliny. Tato barviva se často používají k detekci apoptózy u živých buněk, protože jsou netoxická. Při snížené fluorescenci sledujeme rozklad nukleových kyselin a detekce mikropartikulí značí poškození membrány u aktivovaných a apoptických buněk²⁴⁻²⁶. SYTO 14 barví konkrétně RNA a může být použito jak ve fluorescenční mikroskopii²⁵, tak v průtokové cytometrii²⁶.

Faloidin je cyklický heptapeptid, patřící do skupiny falotoxinů, který pochází ze smrtelně jedovaté houby muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*). Faloidin se selektivně váže na filamentární aktin (F-aktin), hlavní složku eukaryotického cytoskeletu. Po navázání zabraňuje depolymerizaci aktinových filamentů a stabilizuje jejich strukturu²⁷. Faloidin je často konjugován s fluorofory (jako jsou barviva FITC nebo AlexaFluor) za účelem vizualizace aktinového cytoskeletu pomocí fluorescenční mikroskopie²⁸. Zatímco faloidin se typicky používá ve fixovaných buňkách, existují deriváty, které byly vyvinuty pro zobrazování živých buněk²⁹. Tyto deriváty jsou méně toxické a umožňují pozorovat dynamické změny v aktinovém cytoskeletu v průběhu času. Kromě mikroskopie lze faloidin použít v průtokové cytometrii ke kvantifikaci a analýze obsahu F-aktinu v buňkách³⁰.

WGA (Wheat Germ Agglutinin) pochází z pšeničných klíčků a je široce používán v biologickém a biochemickém výzkumu pro svou schopnost selektivně se vázat na rezidua *N*-acetylglukosaminu a kyseliny sialové na glykoproteinech a glykolípidech³¹. Pokud je konjugován s fluoroforem, může být použit k vizualizaci a studiu buněčné membrány ve fluorescenční mikroskopii³². Dále ho lze použít v průtokové cytometrii k selektivnímu značení a třídění buněk na základě obsahu povrchových glykoproteinů³³. WGA se používá v biochemických a molekulárně biologických technikách pro afinitní čištění glykoproteinů³⁴. Využitím jeho vazebné specifity lze izolovat glykoproteiny pro další analýzu³⁵.

Mitotracker barviva jsou skupinou fluorescenčních sond používaných v buněčné biologii k značení a sledování mitochondrií v živých buňkách, přičemž některá z nich jsou stabilní i po jejich fixaci³⁶. Tato barviva jsou užitečná ke studiu morfologie, dynamiky a funkce mitochondrií prostřednictvím různých zobrazovacích technik, jako je fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie³⁷. Mitotracker barviva jsou navržena tak, aby se selektivně akumulovala v aktivních mitochondriích. Jejich selektivní akumulace je závislá na potenciálu mitochondriální membrány a tato vlastnost je neocenitelná pro hodnocení změn v mitochondriálním membránovém potenciálu, který je klíčovým indikátorem mitochondriální funkce³⁸. Mitotracker barviva díky své dostupnosti v různých barvách (např. červená - Mitotracker Red CMXRos, zelená - Mitotracker Green FM, tmavě červená Mitotracker Deep Red FM a oranžová - MitoTracker Orange CMTMRos, chemické struktury zobrazeny na obrázku 2) poskytují vysokou flexibilitu při přípravě vícebarevných fluorescenčních experimentů.

3. Mikroskopie živých buněk

Zobrazení živých buněk je zásadní pro studium dynamických procesů v reálném čase, což umožňuje detailní sledování účinků látky na chování buněk, včetně vlivu na buněčnou

motilitu, dělení, migraci, změny tvaru a organel. Některé aktivní látky mají rychlé a dynamické účinky na buněčné procesy³⁹. Časosběrná mikroskopie nabízí možnost dlouhodobého sledování, čímž odhaluje časovou dynamiku buněčných změn, funkce a morfologie subcelulárních struktur vyvolaných působením studované látky. Na druhou stranu má mikroskopie živých buněk několik výzev, mezi které patří fototoxicita a díky tomu i omezení frekvence snímání v čase. Proto je důležité věnovat pozornost volbě vhodných fluorescenčních značek a optimalizaci experimentálních podmínek⁴⁰. Studium kolokalizace látky s buněčnými složkami nebo organelami, případně proteinovými komplexy pomocí FRET (Försterův rezonanční přenos energie) techniky, může poskytnout cenné informace o potenciálních interakcích s cíli⁴¹. Označením látky a potencionálního cílového proteinu fluorofory, z nichž jeden je aktivovaný pouze při přenosu energie, můžeme při změně ve fluorescenčním signálu usuzovat na jejich těsnou blízkost, a tedy vzájemnou interakci⁴².

3.2 Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk

Pro mikroskopii živých buněk se často používají různé fluorescenční sondy. Tradičně používané fluorescenční proteiny, spojené s cílovými proteiny nebo peptidy, mohou negativně ovlivnit funkci takto fúzovaného proteinu. Proto se k překonání těchto problémů využívají syntetické sondy založené na malých chemických molekulách, které nabízejí menší velikost, možnosti jednoduchých syntetických úprav i optimalizaci a využití různých spektrálních charakteristik⁴³. Mezi ideální luminofoxy pro tyto účely patří BODIPY (z anglického boron-dipyrrromethene) barviva, jejichž intenzivní a zářivé barvy, vysoká molární absorptivita a široký rozsah fluorescenční emise jsou ideální pro fluorescenční mikroskopii, průtokovou cytometrii a biozobrazování *in vivo*. BODIPY barviva jsou často využívána pro detekci a monitorování biologických procesů, včetně interakcí protein-protein, enzymové aktivity, případně buněčné lokalizace. Strukturální modifikace těchto barviv umožňují regulaci jejich klíčových charakteristik⁴⁴. Prvním komplexem, který byl publikován v roce

1968, je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen⁴⁵ (struktura uvedena na obrázku 3). Mimo experimentálně připravené sondy s BODIPY je několik dostupných i komerčně, například **LysoTracker** a **ER-Tracker**⁴³. Struktury komerčních sond jsou zobrazeny na obrázku 3. Příkladem využití komerční BODIPY sondy je **PARPi-FL**, fluorescenční sonda založená na BODIPY a olaparibu (inhibitor poly(ADP-ribose)polymerasy 1 (PARP1), která se ukázala jako slibná při detekci a hodnocení chirurgických okrajů epitelálních karcinomů v klinických podmínkách^{46,47}. Fluorescenční vlastnosti BODIPY lze navíc rozšířit do téměř infračervené oblasti zavedením atomů dusíku do pyrrolové kostry (aza-BODIPY)⁴⁸, nebo rozšířením konjugovaného systému⁴⁹. V poslední době přitahují takové fluorofory pozornost, díky tomu, že umožňují biovizualizaci se sníženou autofluorescencí a rozptylem světla, navíc snižují poškození či ztrátu fluorescence (photobleaching) způsobený excitací fluoroforu⁵⁰. BODIPY sondy mohou být využívány i pro pokročilé mikroskopické techniky jako je super-rezoluční mikroskopie. Ve studii Adhikari a kol. z roku 2019⁵¹, byla využita tvorba dimerů s posunem emitujícího světla do červené oblasti spektra. Takto byly ve vysokém rozlišení lokalizovány jednotlivé analogy mastných kyselin v membráně živých kvasinek pomocí mikroskopické metody lokalizace jednotlivých molekul (Single Molecule Localization Microscopy - SMLM). Další práce využila BODIPY sondy pro super-rezoluční techniku fotoaktivací lokalizační mikroskopie (PhotoActivated Localization Microscopy, PALM). Tato metoda se opírá o stochastickou excitaci fluorescenčních molekul, kdy je aktivována jen malá podmnožina fluorescenčních značek, což umožňuje jejich individuální lokalizaci s vysokým rozlišením. Po nasnímání velkého množství snímků jsou tyto snímky kombinovány do jednoho vysokorozlišovacího obrazu, kdy po obrazové rekonstrukci můžeme dosáhnout zobrazení biologických vzorků v rozlišení až téměř na molekulární úrovni 10 nm⁵². Kromě toho mohou být do výsledných fotoaktivovatelných fluoroforů začleněny cílené ligandy pro označení vybraných subcelulárních složek v živých buňkách⁵³⁻⁵⁵. Díky svému lipofilnímu

charakteru se BODIPY uplatňuje při syntéze sond pro značení plasmatických membrán⁵⁶. Struktury experimentálně připravených sond jsou na obrázku 4. Například sonda **BPDPA-Zn** byla vytvořena na základě BODIPY a zinkového komplexu, který specificky váže fosfatidylserin v plasmatické membráně. Slouží k rozlišení stupně apoptózy, protože se selektivně váže na membránu časných apoptotických buněk a internalizuje se do pozdních apoptotických buněk⁵⁷. Dále byla vytvořena amfifilní sonda **DSDMHDAB** pro vizualizaci extracelulárního uvolňování oxidu dusnatého na membráně pomocí lokalizované reakce BODIPY na bázi 3,4-diaminofenolu⁵⁸.

4. Závěr

Využití pokročilých technologií, jako jsou HTS a fenotypové testování, zásadně usnadnilo objevování cílů biologicky aktivních látek². Je však důležité si uvědomit, že proces identifikace cílů těchto látek zůstává komplexním a neustále se vyvíjejícím aspektem výzkumu a vývoje léčiv, zejména v kontextu nových terapeutických přístupů a personalizované medicíny. Jako každý technologický přístup, mikroskopické metody přinášejí řadu výhod, včetně přímé vizualizace buněčných struktur, sledování procesů v reálném čase a určení prostorové subcelulární lokalizace cílových míst působení testovaných látek. Pokročilé mikroskopické techniky s vysokým rozlišením nabízejí detailní snímky, které umožňují odhalit i velmi jemné nuance interakcí mezi látkami a jejich molekulárními cíli^{3,59}. Na druhou stranu, tyto metody mohou být technicky náročné^{3,59}, vyžadují specializované vybavení a odborné znalosti v oblasti přípravy vzorků a zejména analýzy dat. Mikroskopie může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům, zejména pokud procesy značení a barvení nejsou pečlivě optimalizovány a pokud použité barviva nejsou dostatečně selektivní a specifická. BODIPY barviva jsou ideální pro mikroskopii, nabízejí intenzivní barvy a různé spektrální charakteristiky. Možnost modifikace

struktury BODIPY umožňuje regulaci klíčových vlastností. Jejich využití v mikroskopických technikách super-rezoluce, jako je SMLM nebo PALM, umožňuje bioobrazování s vysokým prostorovým rozlišením. BODIPY sondy jsou významným nástrojem pro studium živých buněk s minimalizací poškození vzorku.

Poděkování

Tento výzkum byl podpořen infrastrukturním grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (EATRIS-CZ - LM2023053 a CZ-OPENSOURCE LM2023052), programem EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5102, státní podporou Technologické agentury ČR v rámci programu Národní centra kompetence (TN02000109) a interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2023_025).

Literatura

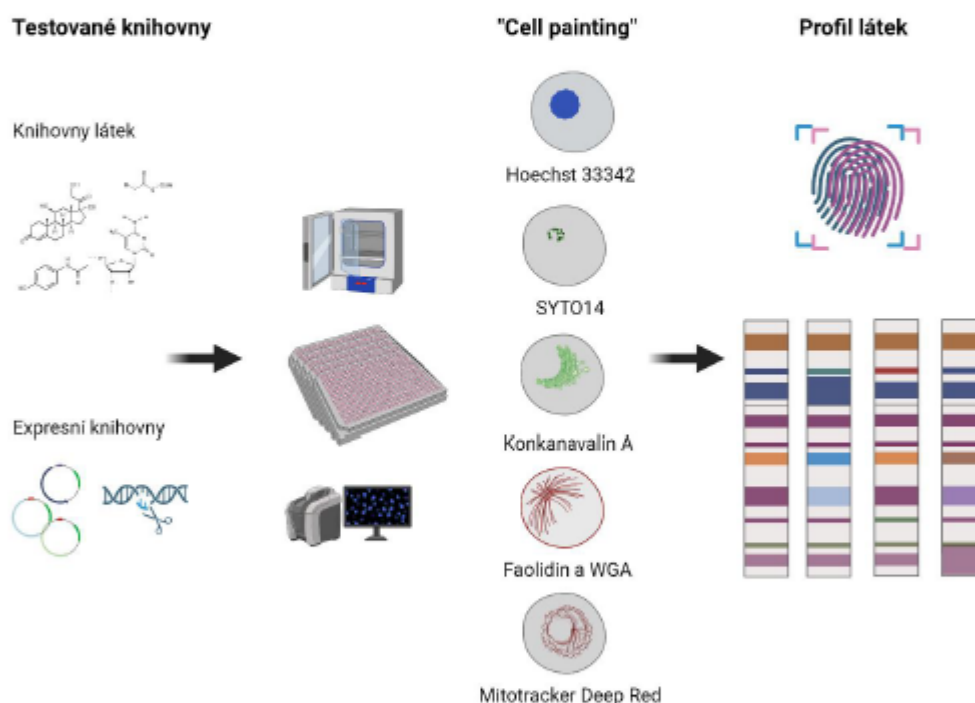
1. Davis R. L.: *iScience* 23, 101487 (2020).
2. Tautermann C. S. v knize: *Quantum Mechanics in Drug Discovery* (Heifetz A., ed.) kap. 1, str. 1. Humana New York, NY 2020.
3. Bullen A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 7, 54 (2008).
4. Wang Y., Zhao X. P., Gao X. M., Nie X. J., Yang Y. X., Fan X. H.: *Anal. Chim. Acta* 702, 87 (2011).
5. Stossi F., Singh P. K., Safari K., Marini M., Labate D., Mancini M. A.: *Biochem. Pharmacol.* 216, 115770 (2023).
6. Isgut M., Rao M., Yang C. H., Subrahmanyam V., Rida P. C. G., Aneja R.: *Med. Res. Rev.* 38, 504 (2018).
7. Menduti G., Boido M.: *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14689 (2023).
8. Abu-Abied M., Avisar D., Belausov E., Holdengreber V., Kam Z., Sadot E.: *Protoplasma* 236, 3 (2009).

9. Lang P., Yeow K., Nichols A., Scheer A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* **5**, 343 (2006).
10. Bray M. A., Singh S., Han H., Davis C. T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S. M., Gibson C. C., Carpenter A. E.: *Nat. Protoc.* **11**, 1757 (2016).
11. Baillache D. J., Valero T., Lorente-Macías Á., Bennett D. J., Elliott R. J. R., Carragher N. O., Unciti-Broceta A.: *RSC Med. Chem.* **14**, 2611 (2023).
12. Jiang X. a 10 spoluautorů: *J. Fluoresc.* (2023). doi: 10.1007/s10895-023-03344-7.
13. Hermanson G. T., v knize: *Bioconjugate Techniques (Third Edition)* (Hermanson G. T., ed.), str. 395. Academic Press, Boston 2013.
14. Gao P., Pan W., Li N., Tang B.: *Chem. Sci.* **10**, 6035 (2019).
15. Abdelfatah S., Berg A., Böckers M., Efferth T.: *J. Adv. Res.* **16**, 145 (2019).
16. Abu-Elheiga L., Brinkley W. R., Zhong L., Chirala S. S., Woldegiorgis G., Wakil S. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1444 (2000).
17. Sando S., Narita A., Aoyama Y.: *ChemBioChem* **8**, 1795 (2007).
18. Lin K. K., Goodell M. A., v knize: *Methods in Cell Biology* (Darzynkiewicz Z., Holden E., Orfao A., Telford W., Wlodkowic D., ed.), 103. díl, str. 21. Academic Press, 2011.
19. Pickup J. C., Hussain F., Evans N. D., Rolinski O. J., Birch D. J. S.: *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2555 (2005).
20. Hardman K. D., Ainsworth C. F.: *Biochemistry* **11**, 4910 (1972).
21. Gnerucci A., Faraoni P., Romano G., Fusi F.: *Acta Histochem.* **121**, 248 (2019).
22. Leipold M. D., Ornatsky O., Baranov V., Whitfield C., Nitz M.: *Anal. Biochem.* **419**, 1 (2011).
23. Gil J., Passalacqua G., Deloche A., Vidal F. X., Dugas V., Demesmay C.: *Separations* **10**, 437 (2023).
24. Ullal A. J., Pisetsky D. S., Reich C. F.: *Cytometry, Part A* **77**, 294 (2010).

25. Knowles R. B., Sabry J. H., Martone M. E., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Bassell G. J., Kosik K. S.: *J. Neurosci.* 16, 7812 (1996).
26. Poot M., Gibson L. L., Singer V. L.: *Cytometry* 27, 358 (1997).
27. Steinmetz M. O., Stoffler D., Hoenger A., Bremer A., Aebi U.: *J. Struct. Biol.* 119, 295 (1997).
28. Gilloteaux J., Jamison J. M., Arnold D., Neal D. R., Summers J. L.: *Anat. Rec.* 288A, 58 (2006).
29. Barak L. S., Yocum R. R., Webb W. W.: *J. Cell Biol.* 89, 368 (1981).
30. Miller Y. I., Chang M.-K., Funk C. D., Feramisco J. R., Witztum J. L.: *J. Biol. Chem.* 276, 19431 (2001).
31. Balciunaite-Murziene G., Dzikaras M.: *Appl. Sci.* 11, 884 (2021).
32. Kataoka H., Ushiyama A., Kawakami H., Akimoto Y., Matsubara S., Iijima T.: *Microsc. Res. Tech.* 79, 31 (2016).
33. Stern A. D., Rahman A. H., Birtwistle M. R.: *Cytometry, Part A* 91A, 14 (2017).
34. Cartellieri S., Hamer O., Helmholz H., Niemeyer B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 83 (2002).
35. Mellado M. C. M., Curbelo D., Nobrega R., Castilho L. R.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 636 (2007).
36. Ning P., Wang W. J., Chen M., Feng Y., Meng X. M.: *Chin. Chem. Lett.* 28, 1943 (2017).
37. Sim P. F., Wan Mohamad Noor W. N. I., Inaba T., Suetsugu S., v knize: *Plasma Membrane Shaping* (Suetsugu S., ed.), str. 7. Academic Press, 2023.
38. Buckman J. F., Hernández H., Kress G. J., Votyakova T. V., Pal S., Reynolds I. J.: *J. Neurosci. Methods* 104, 165 (2001).
39. Gao B. B., Gao L., Wang F.: *J. Innovative Opt. Health Sci.* 16, (2023).

40. Ropraz P., Imhof B. A., Matthes T., Wehrle-Haller B., Sidibé A.: *J. Visualized Exp.* e58509 (2018).
41. Dunn M. a 13 spoluautorů: *ACS Chem. Neurosci.* *9*, 673 (2018).
42. Hardebeck S., Schreiber S., Adick A., Langer K., Jose J.: *Int. J. Mol. Sci.* *24*, 11858 (2023).
43. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K.: *Chem. Soc. Rev.* *44*, 4953 (2015).
44. Loudet A., Burgess K.: *Chem. Rev.* *107*, 4891 (2007).
45. Treibs A., Kreuzer F. H.: *Liebigs Ann. Chem.* *718*, 208 (1968).
46. Kossatz S. a 22 spoluautorů: *Nat. Biomed. Eng.* *4*, 272 (2020).
47. Irwin C. P., Portorreal Y., Brand C., Zhang Y., Desai P., Salinas B., Weber W. A., Reiner T.: *Neoplasia* *16*, 432 (2014).
48. Shi Z., Han X., Hu W., Bai H., Peng B., Ji L., Fan Q., Li L., Huang W.: *Chem. Soc. Rev.* *49*, 7533 (2020).
49. Qi S., Kwon N., Yim Y., Nguyen V.-N., Yoon J.: *Chem. Sci.* *11*, 6479 (2020).
50. Dai M., Yang Y. J., Sarkar S., Ahn K. H.: *Chem. Soc. Rev.* *52*, 6344 (2023).
51. Adhikari S., Moscatelli J., Smith E. M., Banerjee C., Puchner E. M.: *Nat. Commun.* *10*, 3400 (2019).
52. Zhang Y., Zheng Y., Tomassini A., Singh A.K., Raymo F.M.: *Molecules* *28*, 2447 (2023).
53. Kobayashi T., Komatsu T., Kamiya M., Campos C., González-Gaitán M., Terai T., Hanaoka K., Nagano T., Urano Y.: *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 11153 (2012).
54. Loredó A., Tang J., Wang L., Wu K. L., Peng Z., Xiao H.: *Chem. Sci.* *11*, 4410 (2020).
55. Wijesooriya C. S., Peterson J. A., Shrestha P., Gehrmann E. J., Winter A. H., Smith E. A.: *Angew. Chem., Int. Ed.* *57*, 12685 (2018).

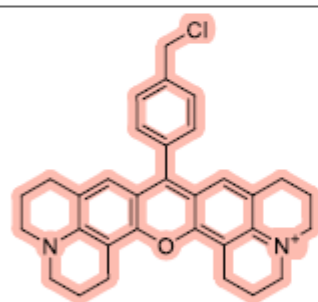
56. Collot M., Pfister S., Klymchenko A. S.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **69**, 102161 (2022).
57. Ashokkumar P., Ashoka A. H., Collot M., Das A., Klymchenko A. S.: *Chem. Commun.* **55**, 6902 (2019).
58. Yao H. W., Zhu X. Y., Guo X. F., Wang H.: *Anal. Chem.* **88**, 9014 (2016).
59. Razansky D., Deliolanis N. C., Vinegoni C., Ntziachristos V.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 504 (2012).



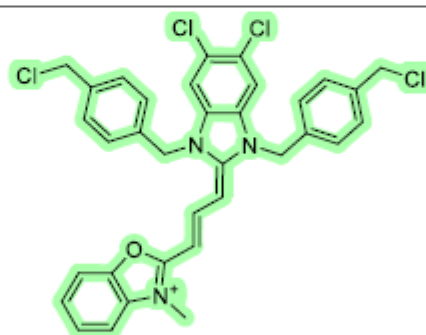
Obr. 1: Schéma fenotypového testování.

Tabulka I. Fluorescenční barviva používaná pro „cell painting assay“¹⁰.

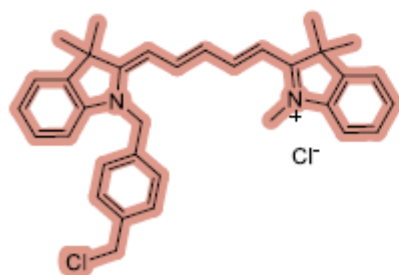
Barvivo	Filtr pro excitaci (nm)	BP Filtr pro emisi (nm)	Buněčná struktura
Hoechst 33342	405	447/60	DNA, značení buněčných jader
ConA	488	536/40	Endoplazmatické retikulum
Konjugát s AlexaFluor 488			
SYTO 14	488	593/40	Jádérka, cytoplazmatická RNA
Faloidin	561	624/40	F-aktin a cytoskelet
Konjugát s AlexaFluor 568			
WGA Konjugát s AlexaFluor 555	561	624/40	Golgiho aparát a cytoplazmatická membrána
Mitotracker Deep Red	640	692/40	Mitochondrie



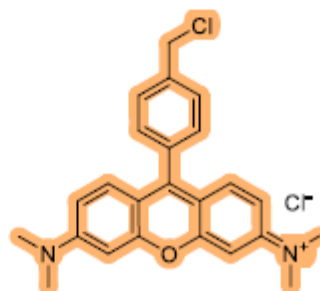
Mitotracker Red CMXRos



Mitotracker Green FM

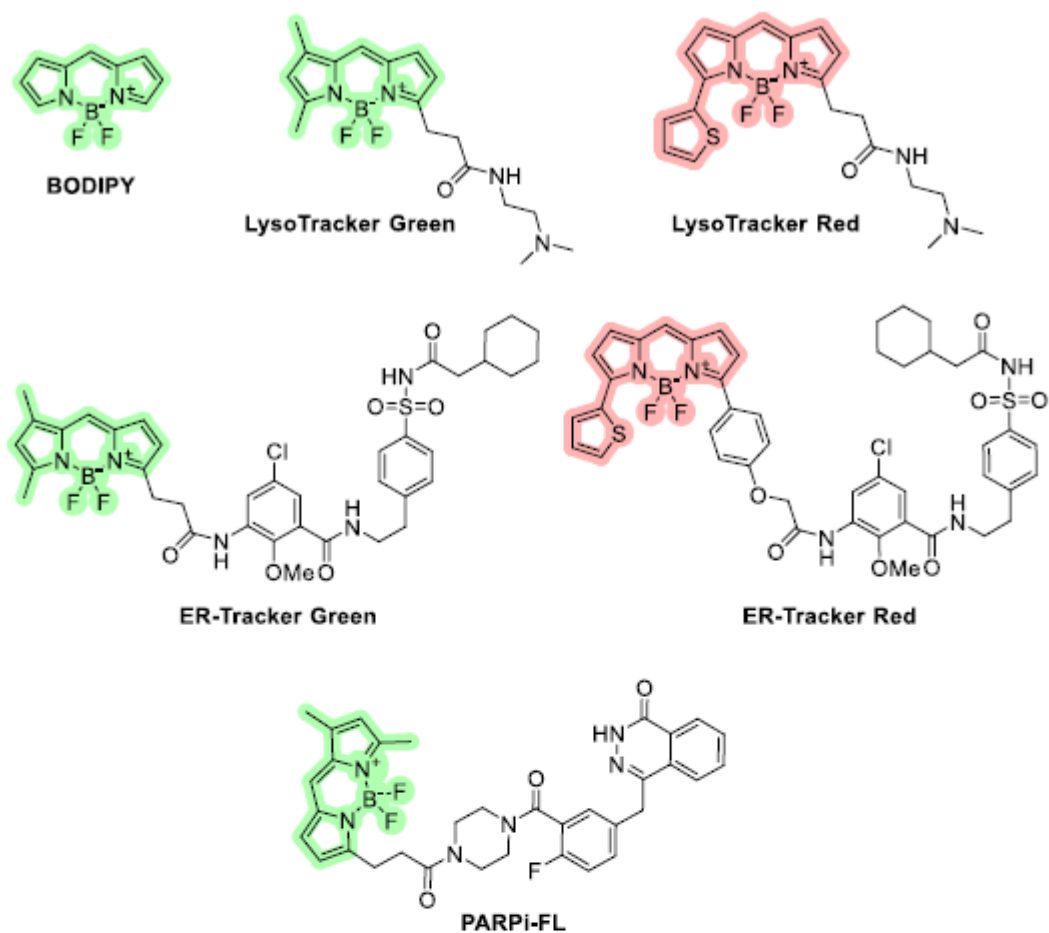


Mitotracker Deep Red FM

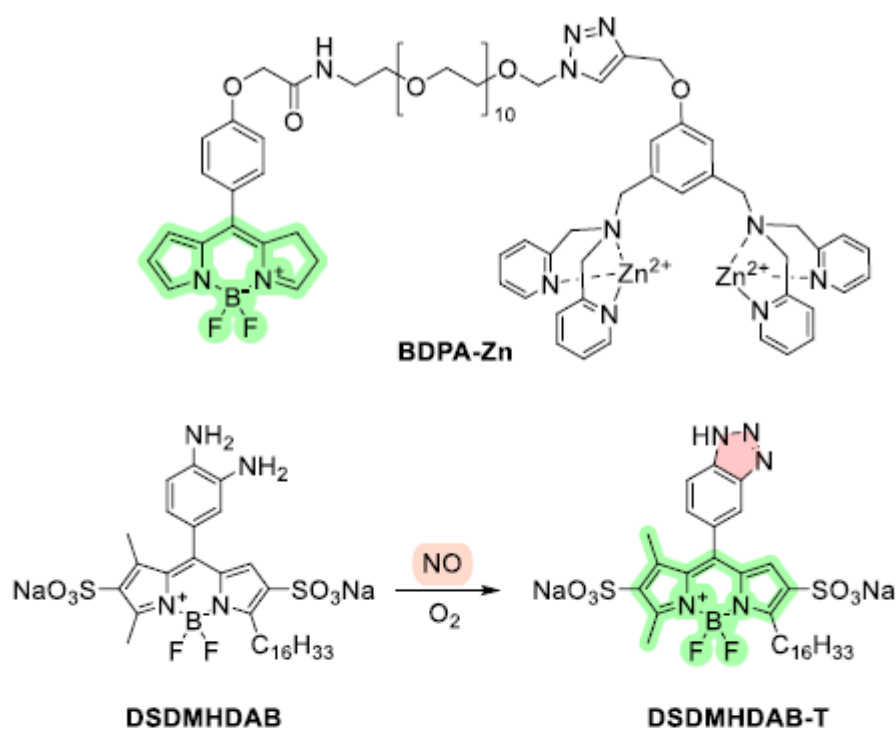


Mitotracker Orange CMXRos

Obr. 2: Molekulární struktury Mitotracker barviv.

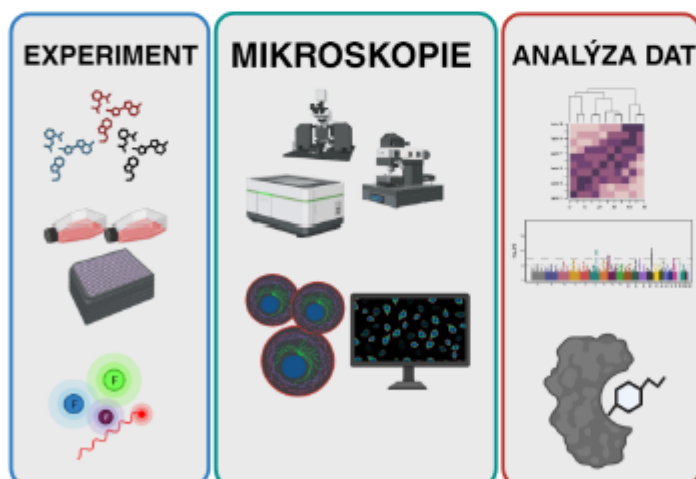


Obr. 3: Molekulární struktura 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu a komerčních sond LysoTracker, ER-Tracker a PARPi-FL.



Obr. 4: Molekulární struktury experimentálních sond BDPDA-Zn a DSDMHDAB.

Grafický abstrakt:





Article

Betulinic Acid Decorated with Polar Groups and Blue Emitting BODIPY Dye: Synthesis, Cytotoxicity, Cell-Cycle Analysis and Anti-HIV Profiling

David Kodr ^{1,*}, Jarmila Stanková ^{2,†}, Michaela Rumlová ³, Petr Džubák ², Jiří Řehulka ², Tomáš Zimmermann ¹, Ivana Křížová ³, Soňa Gurská ², Marián Hajdúch ², Pavel B. Drašar ¹ and Michal Jurásek ^{1,*}

¹ Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology Prague, 16628 Prague, Czech Republic; david.kodr@vscht.cz (D.K.); tomas.zimmermann@vscht.cz (T.Z.); pavel.drasar@vscht.cz (P.B.D.)

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, 77900 Olomouc, Czech Republic; jarmila.stankova@upol.cz (J.S.); petr.dzubak@upol.cz (P.D.); jiri.rehulka@upol.cz (J.R.); sona.gurska@upol.cz (S.G.); marian.hajduch@upol.cz (M.H.)

³ Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology Prague, 16628 Prague, Czech Republic; michaela.rumlova@vscht.cz (M.R.); ivana.krizova@vscht.cz (I.K.)

* Correspondence: michal.jurasek@vscht.cz

† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Kodr, D.; Stanková, J.; Rumlová, M.; Džubák, P.; Řehulka, J.; Zimmermann, T.; Křížová, I.; Gurská, S.; Hajdúch, M.; Drašar, P.B.; et al. Betulinic Acid Decorated with Polar Groups and Blue Emitting BODIPY Dye: Synthesis, Cytotoxicity, Cell-Cycle Analysis and Anti-HIV Profiling. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1104. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091104>

Academic Editor: Jun Lu

Received: 3 August 2021

Accepted: 21 August 2021

Published: 28 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Betulinic acid (BA) is a potent triterpene, which has shown promising potential in cancer and HIV-1 treatment. Here, we report a synthesis and biological evaluation of 17 new compounds, including BODIPY labelled analogues derived from BA. The analogues terminated by amino moiety showed increased cytotoxicity (e.g., BA had on CCRF-CEM $IC_{50} > 50 \mu M$, amine **3** IC_{50} 0.21 and amine **14** IC_{50} 0.29). The cell-cycle arrest was evaluated and did not show general features for all the tested compounds. A fluorescence microscopy study of six derivatives revealed that only **4** and **6** were detected in living cells. These compounds were colocalized with the endoplasmic reticulum and mitochondria, indicating possible targets in these organelles. The study of anti-HIV-1 activity showed that **8**, **10**, **16**, **17** and **18** have had $IC_{50} > 10 \mu M$. Only completely processed p24 CA was identified in the viruses formed in the presence of compounds **4** and **12**. In the cases of **2**, **8**, **9**, **10**, **16**, **17** and **18**, we identified not fully processed p24 CA and p25 CA-SP1 protein. This observation suggests a similar mechanism of inhibition as described for bevirimat.

Keywords: betulinic acid; BODIPY; bevirimat; cytotoxicity; cancer; cell-cycle; fluorescent microscopy; maturation inhibitor

1. Introduction

Betulinic acid (BA) is a natural pentacyclic triterpene of the lupane type (Figure 1). Despite its low solubility in aqueous solutions, this substance is gaining attention with its wide range of interesting biological activity. BA is often derivatized to increase solubility, enhance the therapeutic effect, and target the drug to the specific site of action [1]. BA shows a significant degree of selectivity for cytotoxicity against a variety of tumour cells mboxciteB2-biomedicines-1332342,B3-biomedicines-1332342,B4-biomedicines-1332342 and activity against HIV-1 [5]. There are several possible mechanisms of action of BA (reviewed in [6]), which provide an advantage in the development of resistance to one of the mechanisms and may thus find application in the treatment of tumours resistant to current chemotherapeutics [6]. One is the direct action of BA on the mitochondrial membrane, leading to an increase of outer membrane permeability, its depolarization and release of cytochrome c into the cytosol. It is then responsible for triggering apoptosis [7]. Among

other effects of BA, reactive oxygen species can be formed causing non-specific damage to mitochondria [8,9], followed by the induction of caspase activity [10]. BA exhibits topoisomerase I/II inhibitory activity, and through the proteasome-dependent independent regulatory pathway, is responsible for the function of the transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 inhibition [11]. It is also able to inhibit the activation of the stress transcription factor NF- κ B [12]. A slightly different way in which tumour growth is inhibited is a complete or partial slowing of angiogenesis [13]. Later studies have shown that the antiangiogenic effect is achieved via modulation of mitochondria [14].

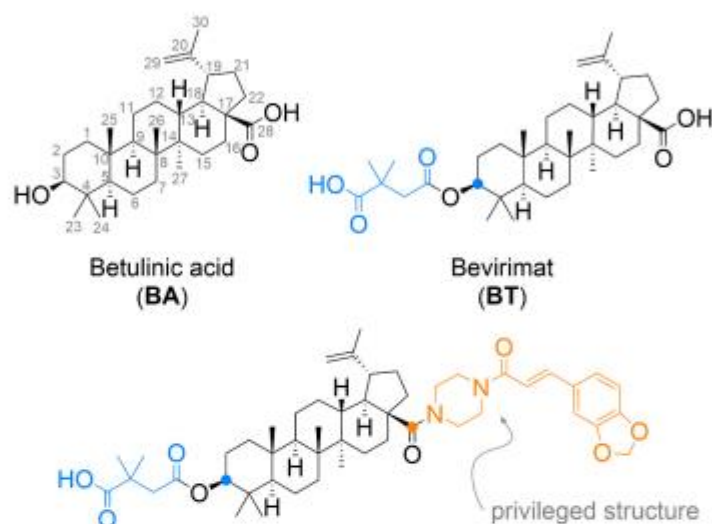


Figure 1. Chemical structure of betulinic acid and its derivatives.

BA has been shown to have anti-HIV-1 activity in the past. Although the test results were not groundbreaking, and the effect was observed only at relatively high concentrations [5] This discovery inevitably led to the synthesis of several other analogues. One of the derivatives with strong anti-HIV-1 activity was 3-O-(3,3-dimethylsuccinyl) betulinic acid, known as bevirimat (Figure 1, BT) [15]. BT acts as an inhibitor of HIV-1 particle maturation. Inhibition of viral particle maturation appears to be a critical point of therapeutic intervention. During the maturation phase, the viral protease cleaves the Gag polyprotein while releasing the individual structural proteins. The final step is the cleavage of p25 CA-SP1 to a functional p24 CA protein. Inhibition of the last step of maturation results in virus particles with aberrantly formed mature cores that are incapable of further infection [16]. BT advanced to the second phase of clinical testing [17–19], during which virus reduction was observed in only 40–50% of patients. The remainder of the patients developed resistance due to natural polymorphic variation in the Gag polyprotein [20]. With this result, the clinical studies were terminated.

Given the important features of BA mentioned above, it is no surprise that many research groups addressed it. Hundreds of derivatives have been prepared over the last few decades. However, with derivatization, for example, the expected effect disappeared, resistance developed rapidly, or toxicity to normal cells increased dramatically. For anti-HIV derivatives, several so-called “privileged structures” (Figure 1), structural motifs that can be the basis for the design of an effective drug, were found [21,22]. BA is most often chemically modified at C-3 and C-28 positions. Addition to the double bond between carbon atoms C-20 and C-30 usually does not significantly enhance activity, on the contrary, the activity often disappears. This finding generally applies to both anti-cancer and anti-HIV effects [23–25]. Recent works have confirmed that the presence of an extra amine

group introduced by conjugation into a BA molecule can significantly increase antitumour potency [26,27].

This work presents the preparation and biological evaluation of new analogues of BA and BT containing an amino group. In the past, fluorescent analogues of BA labelled with green-emitting BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) [28,29] and red-emitting Rhodamine B [30] were synthesized to study its localization and trafficking in living cells. In this work, we synthesized and studied new derivatives of BA and BT labelled at C-3 and C-28 positions using a small blue-emitting BODIPY dye.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical Synthesis

Aluminium silica gel sheets for detection in UV light (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Denmark) were used for thin-layer chromatography (TLC), subsequent visualization was proceeded by a diluted solution of sulfuric acid in methanol and plates were heated. Silica gel (30–60 µm, SilfTech, MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA) was used for column chromatography. NMR Spectra were recorded by Agilent-MR DDR2 (Santa Clara, CA, USA). HRMS were measured by LTQ ORBITRAP VELOS with HESI+/HESI-ionization (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For microwave synthesis, an Initiator Classic 355,301 (Biotage, Uppsala, Sweden) was used.

The following chemicals were purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium): *N,N,N*-triethylamine—Et₃N (>99%), 4-dimethylaminopyridine—4-DMAP (>99%), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride—EDCI (>98%), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide—DCC (>98%), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate—HOBt (>97%), triphenylphosphine—PPh₃ (>95%), *p*-toluenesulfonic acid monohydrate—*p*-TsOH (>98%), and palladium on carbon—Pd/C (10%). The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic): 3-azidopropylamine (>95%), 1-(2-*N*-*boc*-aminoethyl)piperazine (>95%), β-alanine (99%). Betulinic acid (BA) was purchased from Betulinines (Stříbrná skalice, Czech Republic).

The solvents for column chromatography and reactions were purchased from PENTA (Praha, Czech Republic) and were used without further distillation.

Compound Synthesis and Characterization

8-*N*-(3-Azidopropyl)amino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY-N₃)

To a solution of BODIPY-SMe (205 mg, 0.86 mmol) in DCM (10 mL), 3-azidopropylamine (95 mg, 0.95 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at RT. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was taken up with AcOEt and the product was precipitated by the addition of hexanes. BODIPY-N₃ (243 mg, 0.83 mmol) was obtained as a yellowish solid in 97% yield. *R*_F = 0.55 in hexanes-AcOEt 1:1. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 2.11 (quin, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 3.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 3.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 6.39 (br. s., 1 H), 6.55 (br. s., 1 H), 7.32 (br. s., 1 H), 7.36 (br. s., 2 H), 7.57 (s, 1 H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ ppm: 27.00, 44.08, 48.76, 112.67, 113.99, 115.78, 123.16, 130.78, 133.76, 148.87. HRMS-ESI: calculated 290.12628 Da, found *m/z* 291.13312 [M+H]⁺.

8-*N*-(3-Aminopropyl)amino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY-NH₂)

To a solution of BODIPY-N₃ (150 mg, 0.52 mmol) in AcOEt (8 mL), was added Pd/C (80 mg) and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 2 h. The catalyst was filtered off and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with AcOEt and the product was obtained after precipitation with hexane. BODIPY-NH₂ (96 mg, 0.36 mmol) was obtained as yellow solid in 70% yield. *R*_F = 0.15 in DCM-MeOH 20:1 (*v/v*). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 1.98 (quin, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 2.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 3.83 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 6.37 (br. s., 1 H), 6.52 (br. s., 1 H), 7.27 (br. s., 1 H), 7.30–7.36 (m, 2 H), 7.55 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ ppm: 29.67, 39.12, 45.50, 112.53, 113.78, 115.51, 123.15, 130.40, 133.46, 148.73. HRMS-ESI: calculated 264.13578 Da, found *m/z* 263.12810 [M+H]⁺.

8-*N*-(β-Alanyl)amino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY-CO₂H)

To a solution of **BODIPY-SMe** (220 mg, 0.92 mmol) in DMSO (5 mL), was added a solution of β -Ala (91 mg, 1.02 mmol) in H₂O (2 mL). The mixture was stirred at 30 °C for 16 h. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was diluted with CHCl₃ (100 mL). The product was precipitated by the addition of cyclohexane. **BODIPY-CO₂H** (175 mg, 0.63 mmol) was obtained as yellow solids in 68% yield. $R_F = 0.38$ in hexanes-AcOEt 1:1. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 2.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 4.00 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 6.35 (br. s., 1 H), 6.53 (br. s., 1 H), 7.27–7.31 (m, 1 H), 7.33 (br. s., 2 H), 7.55 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ ppm: 31.71, 42.48, 112.67, 114.02, 115.89, 123.26, 130.78, 133.83, 148.75, 173.03. HRMS-ESI: calculated 279.09906 Da, found m/z 278.09139 [M-H][−].

(3 β)-N-(3-Azidopropyl)-3-hydroxylup-20(29)-ene-28-amide (1)

To a solution of BA (200 mg, 0.44 mmol) and 4-DMAP (59 mg, 0.48 mmol) in DMF (3 mL), 3-azidopropylamine (53 mg, 0.53 mmol), HOBt (65 mg, 0.48 mmol) and EDCI (93 mg, 0.48 mmol) were sequentially added. The mixture was stirred at RT for 36 h. Solvents were removed under reduced pressure and the residue was chromatographed twice (i. DCM-MeOH 100:1, v/v ; ii. DCM→DCM-MeOH 70:1, v/v). Azide **1** (200 mg, 0.37 mmol) was obtained as white solids in 84% yield. $R_F = 0.48$ in DCM-MeOH 40:1 (v/v). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.63–0.70 (m, 1 H), 0.75 (s, 3 H), 0.81 (s, 3 H), 0.83–0.91 (m, 1 H), 0.93 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 0.97–1.05 (m, 1 H), 1.12–1.65 (m, 19 H), 1.67 (s, 3 H), 1.69–1.72 (m, 1 H), 1.75–1.82 (m, 2 H), 1.90–1.95 (m, 1 H), 2.38–2.48 (m, 1 H), 3.08–3.20 (m, 2 H), 3.32 (s, 4 H), 4.58 (s, 1 H), 4.73 (s, 1 H), 5.85 (t, $J = 5.9$ Hz, 1 H); Figure S1. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.29, 15.01, 15.79, 15.80, 17.93, 19.13, 20.57, 25.26, 27.05, 27.63, 28.68, 29.10, 30.51, 33.40, 34.04, 36.61, 36.84, 37.40, 38.05, 38.36, 38.49, 40.40, 42.11, 46.38, 49.31, 49.74, 50.27, 55.02, 55.30, 78.58, 109.01, 150.50, 175.96; Figure S3. HRMS-ESI: calculated 538.42468 Da, found m/z 561.41394 [M+Na]⁺; Figure S2.

4-[(3 β)-28-[(3-Azidopropyl)amino]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid (2)

To a solution of **1** (200 mg, 0.37 mmol) and 4-DMAP (73 mg, 0.59 mmol) in THF (2 mL), 2,2-dimethylsuccinic anhydride (238 mg, 1.86 mmol) and *p*-TsOH were added and the mixture was stirred for 2 h at 130 °C in microwave reactor (MW). The mixture was diluted with H₂O (20 mL) and extracted with DCM (4 × 15 mL). Combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed two times (i. DCM-MeOH 100:1, v/v ; ii. hexanes-AcOEt 3:1, v/v). Compound **2** (94 mg, 0.14 mmol) was obtained as white solids in 38% yield. $R_F = 0.60$ in hexanes-AcOEt, 1:1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.73–0.76 (m, 1 H), 0.79 (s, 3 H), 0.82 (s, 6 H), 0.92 (s, 3 H), 0.95 (s, 3 H), 0.97–1.01 (m, 1 H), 1.12–1.17 (m, 1 H), 1.27 (s, 3 H), 1.29 (s, 3 H), 1.30–1.67 (m, 17 H), 1.67 (s, 3 H), 1.71 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 1.75–1.81 (m, 2 H), 1.90–1.93 (m, 1 H), 2.39–2.46 (m, 1 H), 2.52–2.68 (m, 2 H), 3.08–3.14 (m, 1 H), 3.22–3.33 (m, 2 H), 3.33–3.43 (m, 4 H), 4.45–4.50 (m, 1 H), 4.58 (s, 1 H), 4.73 (s, 1 H), 5.86 (t, $J = 5.9$ Hz, 1 H); Figure S4. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.60, 16.14, 16.46, 18.13, 19.44, 20.92, 23.59, 24.99, 25.27, 25.55, 25.58, 27.88, 29.02, 29.42, 30.83, 33.73, 34.30, 36.97, 37.08, 37.70, 37.72, 38.40, 40.44, 40.76, 42.45, 44.69, 46.74, 49.65, 50.06, 50.50, 55.47, 55.65, 81.51, 109.42, 109.99, 150.81, 170.95, 176.38, 182.48; Figure S5. HRMS-ESI: calculated 666.47202 Da, found m/z 667.47921 [M+H]⁺, 689.46125 [M+Na]⁺ and 705.43463 [M+K]⁺; Figure S6.

(3 β)-N-(3-Aminopropyl)-3-hydroxylup-20(29)-ene-28-amide (3) [31]

A solution of **2** (339 mg, 0.63 mmol) and PPh₃ (248 mg, 0.95 mmol) in THF (10 mL) was stirred for 3 h at RT. Water (1 mL) was added and the mixture was stirred for additional 20 h at RT. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed (CHCl₃-MeOH 20:1, v/v + 0.5% Et₃N → 10:1, v/v + 0.5% Et₃N). Compound **3** (278 mg, 0.54 mmol) was obtained as white solids in 86% yield. $R_F = 0.15$ in DCM-MeOH 10:1 (v/v) + 0.5% Et₃N. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 0.70–0.75 (m, 1 H), 0.77 (s, 3 H), 0.88 (s, 3 H), 0.91–0.96 (m, 1 H), 0.97 (s, 3 H), 0.99 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H), 1.04–1.10 (m, 1 H), 1.15–1.69 (m, 20 H), 1.71 (s, 3 H), 1.80–1.95 (m, 2 H), 2.10–2.19 (m, 1 H), 2.55–2.64 (m, 1 H), 2.69 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 3.07–3.18 (m, 2 H), 3.20–3.32 (m, 2 H), 4.60 (s, 1 H), 4.72 (s, 1 H);

Figure S7. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ ppm: 13.80, 14.78, 15.46, 15.49, 18.07, 18.37, 20.78, 25.58, 26.64, 27.28, 29.22, 30.57, 32.01, 32.75, 34.24, 35.77, 36.95, 37.53, 38.11, 38.25, 38.57, 38.72, 40.61, 42.14, 46.67, 50.00, 50.68, 55.49, 55.57, 78.26, 108.63, 150.88, 177.88; Figure S8. HRMS-ESI: calculated 512.43418 Da, found m/z 513.44206 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Figure S9.

(3 β)-N-[N'-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)-3-aminopropyl]-3-hydroxylup-20(29)-ene-28-amide (4)

To a solution of BA (50 mg, 0.11 mmol) and BODIPY-NH₂ (32 mg, 0.12 mmol) in DMF (3 mL), 4-DMAP (15 mg, 0.12 mmol), HOBt (16 mg, 0.12 mmol) and EDCI (23 mg, 0.12 mmol) were added. The mixture was stirred for 20 h at RT. The solvents were evaporated under reduced pressure and residue was chromatographed (hexanes-AcOEt 1:1). Compound 4 (56 mg, 0.08 mmol) was obtained as yellow-green solid in 73% yield. R_f = 0.27 in hexanes-AcOEt 1:1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.66–0.70 (m, 1 H), 0.74 (s, 3 H), 0.80 (s, 3 H), 0.84–0.89 (m, 1 H), 0.90 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 1.00 (s, 3 H), 1.01–1.12 (m, 1 H), 1.17–1.71 (m, 20 H), 1.72 (s, 3 H), 1.73–1.80 (m, 2 H), 1.87–2.04 (m, 4 H), 2.48–2.55 (m, 1 H), 3.14–3.21 (m, 2 H), 3.28–3.36 (m, 2 H), 3.73 (q, J = 5.5 Hz, 2 H), 4.65 (s, 1 H), 4.77 (s, 1 H), 6.27 (t, J = 5.9 Hz, 1 H), 6.45 (br. s., 1 H), 6.50 (br. s., 1 H), 7.12 (br. s., 1 H), 7.51 (br. s., 1 H), 7.67 (br. s., 2 H), 9.73 (t, J = 5.3 Hz, 1 H); Figure S10. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.67, 15.35, 16.12, 16.15, 18.25, 19.46, 20.96, 25.61, 27.38, 27.96, 29.15, 29.53, 30.88, 33.53, 34.34, 36.75, 37.17, 37.94, 38.48, 38.72, 38.84, 40.81, 42.48, 44.48, 46.90, 50.10, 50.58, 55.35, 55.72, 78.95, 109.78, 113.37, 114.28, 116.74, 122.42, 125.66, 131.71, 134.28, 134.30, 149.07, 150.40, 179.08; Figure S11. HRMS-ESI: calculated 702.48556 Da, found m/z 725.47504 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and 741.44867 $[\text{M}+\text{K}]^+$; Figure S12.

(3 β)-N-(3-Azidopropyl)-3-[N'-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)- β -alanyl]-oxy-lup-20(29)-ene-28-amide (5)

To a solution of 1 (130 mg, 0.24 mmol) and 4-DMAP (59 mg, 0.48 mmol) in dry DCM (5 mL), BODIPY-CO₂H (101 mg, 0.36 mmol) and DCC (100 mg, 0.48 mmol) were added. The mixture was stirred at RT for 16 h. DCU was filtered off and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was chromatographed (DCM-MeOH 100:1, v/v), and the material thus obtained was dissolved in AcOEt and precipitated by the addition of hexanes and chromatographed once again (DCM-MeOH 100:1, v/v) to obtain pure 5 (160 mg, 0.20 mmol) as yellow solid in 83% yield. R_f = 0.62 in DCM-MeOH 40:1 (v/v). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.78–0.82 (m, 1 H), 0.85 (s, 3 H), 0.85 (s, 6 H), 0.94 (s, 3 H), 0.97 (s, 3 H), 0.99–1.05 (m, 2 H), 1.14–1.18 (m, 1 H), 1.22–1.66 (m, 17 H), 1.69 (s, 3 H), 1.72 (m, 1 H), 1.75–1.81 (m, 2 H), 1.89–1.97 (m, 1 H), 2.42–2.50 (m, 1 H), 2.80 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 3.09–3.16 (m, 1 H), 3.23–3.39 (m, 4 H), 3.94 (q, J = 6.1 Hz, 2 H), 4.56–4.60 (m, 1 H), 4.60 (s, 1 H), 4.74 (s, 1 H), 5.83 (t, J = 5.9 Hz, 1 H), 6.44 (br. s., 2 H), 7.01 (br. s., 2 H), 7.45–7.68 (m, 2 H), 7.73 (t, J = 5.3 Hz, 1 H); Figure S13. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.59, 16.17, 16.19, 16.54, 18.14, 19.47, 20.96, 23.73, 25.54, 28.06, 29.04, 29.43, 30.85, 32.63, 33.74, 34.27, 36.98, 37.11, 37.70, 37.87, 38.33, 38.39, 40.77, 42.48, 42.53, 46.74, 55.42, 55.65, 76.70, 77.02, 77.34, 82.86, 109.44, 114.00, 114.79, 115.12, 123.08, 132.60, 135.52, 147.98, 150.82, 171.54, 176.32; Figure S14. HRMS-ESI: calculated 799.51318 Da, found m/z 822.50287 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and 838.47620 $[\text{M}+\text{K}]^+$; Figure S15.

(3 β)-N-(3-Aminopropyl)-3-[N'-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)- β -alanyl]-oxy-lup-20(29)-ene-28-amide (6)

To a solution of 5 (60 mg, 0.08 mmol) in dry THF (3 mL), PPh₃ (26 mg, 0.10 mmol) was added. After stirring for 3 h, H₂O was added and the mixture was stirred for 20 h. Solvents were removed under reduced pressure and the product was chromatographed (DCM-MeOH 9:1, v/v $\rightarrow$ MeOH-H₂O 100:1, v/v) to obtain 6 (25 mg, 0.03 mmol) as yellow solids in 43% yield. R_f = 0.12 in DCM-MeOH 10:1 (v/v) + 0.5% Et₃N. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.79–0.82 (m, 1 H), 0.85 (s, 3 H), 0.85 (s, 6 H), 0.95 (s, 3 H), 0.97 (s, 3 H), 0.98–1.03 (m, 2 H), 1.12–1.16 (m, 1 H), 1.26–1.65 (m, 22 H), 1.69 (s, 3 H), 1.72–1.77 (m, 2 H), 1.92–1.98 (m, 1 H), 2.45–2.51 (m, 1 H), 2.77–2.85 (m, 4 H), 3.11–3.18 (m, 1 H), 3.30–3.40 (m, 2 H), 3.98 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 4.57–4.61 (m, 2 H), 4.74 (s, 1 H), 6.40 (t, J = 5.5 Hz, 1 H), 6.46 (br. s., 2 H), 6.99–7.09 (m, 2 H), 7.49–7.72 (m, 3 H); Figure S16. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)

δ ppm: 14.59, 16.17, 16.19, 16.54, 18.14, 19.48, 20.97, 23.74, 25.56, 28.07, 29.43, 30.89, 32.44, 32.67, 33.70, 34.28, 37.11, 37.52, 37.66, 37.87, 38.33, 38.49, 40.09, 40.76, 42.48, 42.52, 46.74, 50.07, 50.55, 55.42, 55.61, 82.90, 109.34, 114.15, 114.82, 115.40, 122.45, 132.64, 135.57, 148.06, 150.99, 171.58, 176.32; Figure S17. HRMS-ESI: monoisotopic mass 773.52268 Da, found m/z 774.53046 $[M+H]^+$ and 772.51587 $[M-H]^-$; Figure S18.

Tert-butyl-3-[(3 β)-3-hydroxy-28-oxolup-20(29)-ene-28-yl]amino]propyl]-carbamate (7) [23]

To a solution of BA (1.00 g, 2.19 mmol) and 4-DMAP (295 mg, 2.41 mmol) in DMF (12 mL), *N*-boc-1,3-diaminopropane (459 mg, 2.63 mmol), HOBt (326 mg, 2.41 mmol) and EDCI (462 mg, 2.41 mmol) were added. The mixture was stirred for 48 h at RT. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed (DCM-MeOH 100:1, *v/v*). Compound 7 (900 mg, 1.47 mmol) was obtained as white solid in 67% yield. R_F = 0.34 in DCM-MeOH 40:1 (*v/v*). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.65–0.70 (m, 1 H), 0.75 (s, 3 H), 0.81 (s, 3 H), 0.85–0.90 (m, 1 H), 0.93 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 0.97 (s, 3 H), 0.98–1.05 (m, 2 H), 1.13–1.20 (m, 1 H), 1.22–1.44 (m, 8 H), 1.45 (s, 9 H), 1.46–1.68 (m, 11 H), 1.69 (s, 3 H), 1.69–1.81 (m, 2 H), 1.88–2.00 (m, 1 H), 2.00–2.07 (m, 1 H), 2.42–2.50 (m, 1 H), 3.10–3.28 (m, 5 H), 3.30–3.39 (m, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 4.74 (s, 1 H), 4.91 (br. s., 1 H), 6.33 (br. s., 1 H); Figure S19. ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 14.64, 15.35, 16.12, 16.14, 18.28, 19.48, 20.94, 25.64, 27.41, 27.97, 28.40 (s, 3 C) 29.48, 30.54, 30.92, 33.65, 34.39, 35.28, 37.20, 37.75, 38.51, 38.72, 38.84, 40.76, 42.47, 46.66, 50.04, 50.64, 55.38, 55.76, 67.07, 78.96, 79.32, 109.27, 151.05, 156.65, 176.50; Figure S20. HRMS-ESI: calculated 612.48661 Da, found m/z 613.49394 $[M+H]^+$, 635.47609 $[M+Na]^+$ and 651.44943 $[M+K]^+$; Figure S21.

4-[(3 β)-28-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]propyl]amino]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid (8)

To a solution of 7 (400 mg, 0.65 mmol) and 4-DMAP (128 mg, 1.04 mmol) in THF (4 mL), 2,2-dimethylsuccinic anhydride (418 mg, 3.26 mmol) and *p*-TsOH were added. The mixture was stirred for 2 h at 130 °C in a microwave reactor. The mixture was poured into water and extracted with DCM (4 $\times$ 20 mL). Combined organic layers were washed with $KHSO_4$ (3 $\times$ 5 mL) and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed (DCM-MeOH 40:1, *v/v* + 1% Et_3N) to obtain 8 (260 mg, 0.35 mmol) as white solids in 54% yield. R_F = 0.18 in DCM-MeOH 40:1 (*v/v*) + 1% Et_3N . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.74–0.77 (m, 1 H), 0.80 (s, 3 H), 0.82 (s, 6 H), 0.92 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 0.97–1.02 (m, 1 H), 1.13–1.17 (m, 1 H), 1.25–1.27 (m, 2 H), 1.28 (s, 3 H), 1.30 (s, 3 H), 1.31–1.44 (m, 7 H), 1.45 (s, 9 H), 1.46–1.68 (m, 10 H), 1.69 (s, 3 H), 1.70–1.82 (m, 2 H), 1.90–1.97 (m, 1 H), 2.03–2.07 (m, 1 H), 2.41–2.48 (m, 1 H), 2.53–2.70 (m, 2 H), 3.10–3.40 (m, 7 H), 4.46–4.51 (m, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 4.74 (s, 1 H), 4.94 (br. s., 1 H), 6.43 (br. s., 1 H); Figure S22. ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 14.61, 16.09, 16.15, 16.47, 18.14, 19.45, 20.95, 23.60, 25.02, 25.58, 25.61, 27.90, 28.39, 29.46, 30.49, 30.88, 33.61, 34.30, 35.35, 37.08, 37.70, 37.92, 38.40, 38.52, 40.44, 40.72, 40.76, 42.46, 44.71, 46.64, 49.99, 50.52, 55.47, 55.80, 79.40, 81.55, 109.37, 150.97, 156.80, 171.00, 176.72, 182.24; Figure S23. HRMS-ESI: calculated 740.53395 Da, found m/z 741.54119 $[M+H]^+$ and 763.52302 $[M+Na]^+$; Figure S24.

4-[(3 β)-28-[(3-Aminopropyl)amino]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid hydrochloride (9)

Compound 6 (130 mg, 0.18 mmol) was dissolved in $CHCl_3$ (1.5 mL) and 2 M HCl solution in Et_2O (3 mL) was added slowly. The mixture was stirred for 1 h at RT under argon atmosphere. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was sonicated for 20 min in Et_2O (5 mL). The product was collected by filtration and dried in vacuo. Compound 9 (102 mg, 0.16 mmol) was obtained as white solids in 91% yield. R_F = 0.1 in DCM-MeOH 9:1 (*v/v*). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm: 0.81–0.83 (m, 1 H), 0.86 (s, 6 H), 0.88 (s, 1 H), 0.89 (s, 3 H), 0.98 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H), 1.03–1.11 (m, 1 H), 1.19 (m, 1 H), 1.25 (s, 3 H), 1.26 (s, 3 H), 1.27–1.32 (m, 1 H), 1.36–1.65 (m, 15 H), 1.69 (s, 3 H), 1.70–1.76 (m, 2 H), 1.80–1.90 (m, 5 H), 2.10–2.15 (m, 1 H), 2.52–2.65 (m, 3 H), 2.90–2.96 (m, 2 H), 3.06–3.13 (m, 1 H), 3.23–3.30 (m, 2 H), 4.43–4.48 (m, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 4.70 (s, 1 H), 7.89 (t, J = 5.9 Hz, 1 H); Figure S25. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ ppm: 13.64, 15.36, 15.43,

15.66, 17.85, 18.13, 20.76, 23.25, 24.43, 24.79, 25.49, 27.06, 27.71, 29.22, 30.51, 32.59, 34.06, 35.22, 36.85, 36.86, 37.42, 37.58, 38.02, 38.03, 38.18, 39.94, 40.60, 42.13, 44.23, 49.90, 50.50, 55.46, 55.65, 81.22, 108.66, 150.77, 171.53, 179.14, 179.17; Figure S26. HRMS-ESI: calculated 640.48152 Da, found m/z 641.48955 $[M+H]^+$; Figure S27.

4-[[[(3 β)-28-[[N-(4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)-3-aminopropyl]amino]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid (**10**)

Compound **9** (15 mg, 0.02 mmol) and **BODIPY-SMe** (6 mg, 0.03 mmol) were dissolved in the mixture of $CHCl_3$ (2 mL) and THF (1 mL). To this solution, one drop of Et_3N was added. The mixture was stirred 30 min at RT. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed (DCM-MeOH 19:1, v/v + 1% Et_3N). The mixture was dissolved in AcOEt and washed with $KHSO_4$ (10% solution, 3 $\times$ 5 mL) and brine (1 $\times$ 5 mL). Organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated. Compound **10** (14 mg, 0.02 mmol) as yellow-green solid in 74% yield. R_f = 0.73 in DCM-MeOH 9:1 (v/v). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.73–0.77 (m, 1 H), 0.78 (s, 3 H), 0.81 (s, 3 H), 0.82 (s, 3 H), 0.83–0.85 (m, 1 H), 0.89 (s, 3 H), 0.99 (s, 3 H), 1.00–1.10 (m, 1 H), 1.16–1.21 (m, 1 H), 1.29 (s, 3 H), 1.31 (s, 3 H), 1.34–1.67 (m, 15 H), 1.72 (s, 3 H), 1.74–1.79 (m, 2 H), 1.87–2.03 (m, 5 H), 2.49–2.71 (m, 3 H), 3.14–3.20 (m, 1 H), 3.33 (q, J = 5.4 Hz, 2 H), 3.74 (q, J = 5.5 Hz, 2 H), 4.46–4.51 (m, 1 H), 4.65 (s, 1 H), 4.77 (s, 1 H), 6.24 (t, J = 6.1 Hz, 1 H), 6.44 (br. s., 1 H), 6.51 (br. s., 1 H), 7.12 (br. s., 1 H), 7.51 (br. s., 1 H), 7.68 (br. s., 2 H), 9.71 (t, J = 5.5 Hz, 1 H); Figure S28. ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 14.63, 16.11, 16.15, 16.47, 18.09, 19.43, 20.99, 23.59, 24.97, 25.62, 27.88, 29.16, 29.51, 30.86, 33.56, 34.26, 36.73, 37.06, 37.70, 37.89, 38.40, 38.49, 40.45, 40.81, 42.47, 44.40, 44.70, 46.88, 50.08, 50.47, 55.46, 55.71, 81.51, 109.83, 113.40, 114.28, 116.67, 122.36, 125.65, 131.78, 134.36, 149.06, 150.35, 171.00, 179.13, 182.28; Figure S29. HRMS-APCI: calculated 830.53291 Da, found m/z 829.52699 $[M-H]^-$; Figure S30.

(3 β)-28-[4-[2-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]ethyl]piperazine-1-yl]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl acetate (**12**)

To a solution of compound **11** (1.27 g, 2.55 mmol) in DCM (20 mL), oxalyl chloride (1.2 mL) in DCM (10 mL) and 3 drops of DMF were added. After stirring for 2 h at RT, the solvents were co-evaporated with toluene (3 $\times$ 20 mL). Chloride thus obtained was dissolved in DCM (35 mL), and 1-(2-*N*-*boc*-aminoethyl)piperazine (876 mg, 3.82 mmol) followed by Et_3N (0.42 mL) were added. After stirring for 16 h at RT, the mixture was diluted with DCM (20 mL) and washed with brine (3 $\times$ 30 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed ($CHCl_3$ -MeOH 100:1 $\rightarrow$ 50:1, v/v) to obtain product **12** (720 mg, 1.01 mmol) as white solids in 40% yield. R_f = 0.16 in DCM-MeOH 100:1 (v/v). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.77–0.80 (m, 1 H), 0.83 (s, 3 H), 0.84 (s, 3 H), 0.85 (s, 3 H), 0.94 (s, 3 H), 0.95 (s, 3 H), 0.97–1.00 (m, 1 H), 1.12–1.17 (m, 1 H), 1.28–1.42 (m, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 1.48–1.66 (m, 7 H), 1.68 (s, 3 H), 1.70–1.74 (m, 1 H), 1.81–1.87 (m, 1 H), 1.93–1.98 (m, 1 H), 2.04 (s, 3 H), 2.07–2.11 (m, 1 H), 2.42 (br. s., 4 H), 2.49 (br. s., 2 H), 2.83–2.90 (m, 1 H), 2.94–3.01 (m, 1 H), 3.25 (br. s., 2 H), 3.61 (br. s., 4 H), 4.44–4.49 (m, 1 H), 4.58 (s, 1 H), 4.72 (s, 1 H), 4.98 (br. s., 1 H); Figure S31. ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 14.62, 16.11, 16.24, 16.46, 18.18, 19.63, 21.15, 21.30, 23.70, 25.61, 27.93, 28.41, 29.79, 31.30, 32.46, 32.49, 34.31, 35.91, 36.86, 36.95, 37.14, 37.80, 38.41, 40.68, 41.85, 45.65, 50.76, 52.65, 53.12, 54.52, 55.52, 57.15, 79.30, 80.97, 109.16, 151.30, 155.90, 170.99, 173.46; Figure S32. HRMS-ESI: calculated 709.53937 Da, found m/z 710.54562 $[M+H]^+$ and 732.52546 $[M+Na]^+$; Figure S33.

Tert-butyl-(2-[4-[(3 β)-3-hydroxy-28-oxolup-20(29)-ene-28-yl]piperazine-1-yl]ethyl)-carbamate (**13**)

To compound **12** (700 mg, 0.99 mmol) in MeOH (18 mL) and THF (9 mL), 4 M NaOH solution (9 mL) was added. The mixture was stirred for 2 h at RT. The mixture was neutralized by 1 M HCl solution and extracted with DCM (4 $\times$ 40 mL). Combined organic layers were washed with saturated brine (2 $\times$ 50 mL) and dried over Na_2SO_4 . Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed (DCM-MeOH 40:1, v/v) to obtain **13** (310 mg, 0.46 mmol) as white solids in 47% yield. R_f = 0.33 in

DCM-MeOH 20:1 (*v/v*). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.66–0.69 (m, 1 H), 0.75 (s, 3 H), 0.82 (s, 3 H), 0.86–0.90 (m, 1 H), 0.93 (s, 3 H), 0.96 (br. s, 6 H), 1.12–1.17 (m, 1 H), 1.23–1.29 (m, 2 H), 1.29–1.42 (m, 8 H), 1.45 (s, 9 H), 1.48–1.66 (m, 7 H), 1.68 (s, 3 H), 1.69–1.73 (m, 1 H), 1.81–1.87 (m, 1 H), 1.93–1.98 (m, 1 H), 2.06–2.11 (m, 1 H), 2.42 (br. s., 4 H), 2.48 (br. s., 2 H), 2.84–2.90 (m, 1 H), 2.94–3.00 (m, 1 H), 3.15–3.20 (m, 1 H), 3.25 (br. s, 2 H), 3.61 (br. s., 4 H), 4.57 (s, 1 H), 4.72 (s, 1 H), 4.99 (br. s., 1 H); Figure S34. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.67, 15.34, 16.11, 16.18, 18.30, 19.66, 21.14, 25.66, 27.43, 27.98, 28.41, 29.80, 31.32, 32.48, 32.50, 34.39, 35.91, 36.88, 36.97, 37.23, 38.74, 38.85, 40.67, 41.87, 45.62, 50.86, 52.67, 53.11, 54.53, 55.47, 57.15, 78.97, 79.28, 109.10, 151.33, 155.91, 173.45; Figure S35. HRMS-ESI: calculated 667.52881 Da, found m/z 668.53693 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Figure S36.

(3 β)-28-[4-(2-Aminoethyl)piperazine-1-yl]-3-hydroxylup-20(29)-ene-28-one hydrochloride (**14**)

To compound **13** (200 mg, 0.30 mmol) in CHCl_3 (2.8 mL), 2 M HCl solution in Et_2O (5.1 mL) was slowly added. The mixture was stirred for 16 h at RT under argon. Solvents were removed under reduced pressure and the crude was sonicated for 20 min in Et_2O (5 mL), collected by filtration and dried. Compound **14** (142 mg, 0.25 mmol) was isolated as white solid in 84% yield. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm: 0.69–0.73 (m, 1 H), 0.75 (s, 3 H), 0.86 (s, 3 H), 0.88–0.93 (m, 1 H), 0.95 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 1.01 (s, 3 H), 1.02–1.07 (m, 1 H), 1.22–1.67 (m, 18 H), 1.70 (s, 3 H), 1.73–1.77 (m, 1 H), 1.82–1.88 (m, 1 H), 1.97–2.02 (m, 1 H), 2.11–2.15 (m, 1 H), 2.79–2.86 (m, 1 H), 2.89–2.95 (m, 1 H), 3.11–3.15 (m, 1 H), 3.35–3.81 (m, 11 H), 4.59 (s, 1 H), 4.70 (s, 1 H); Figure S37. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ ppm: 13.65, 14.68, 15.27, 15.38, 18.04, 18.29, 20.86, 25.52, 26.63, 26.67, 27.18, 29.66, 30.92, 31.88, 33.62, 33.63, 34.19, 36.94, 36.96, 38.53, 38.68, 40.54, 41.64, 45.78, 50.78, 52.19, 52.37, 53.15, 54.58, 55.52, 78.24, 108.66, 150.85, 174.45; Figure S38. HRMS-ESI: calculated 567.47638 Da, found m/z 568.4832 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Figure S39.

(3 β)-28-[4-[N-(4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)-2-aminoethyl]piperazine-1-yl]-3-hydroxylup-20(29)-ene-28-one (**15**)

To compound **14** (45 mg, 0.08 mmol) and BODIPY-SMe (21 mg, 0.09 mmol) in the mixture of DCM (5 mL) and THF (2.5 mL), was added one drop of Et_3N and the mixture was stirred 30 min at RT. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed (DCM-MeOH 100:1, *v/v*) to obtain **15** (42 mg, 0.06 mmol) as yellow solids in 70% yield. R_F = 0.19 in DCM-MeOH 100:1 (*v/v*). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.67–0.71 (m, 1 H), 0.76 (s, 3 H), 0.83 (s, 3 H), 0.87–0.91 (m, 1 H), 0.95 (s, 3 H), 0.97 (s, 6 H), 1.16–1.21 (m, 1 H), 1.21–1.32 (m, 3 H), 1.38–1.66 (m, 15 H), 1.69 (s, 3 H), 1.72–1.76 (m, 1 H), 1.82–1.89 (m, 1 H), 1.93–1.98 (m, 1 H), 2.06–2.12 (m, 1 H), 2.55 (br. s., 4 H), 2.82–2.90 (m, 3 H), 2.95–3.01 (m, 1 H), 3.17–3.21 (m, 1 H), 3.70 (br. s., 4 H), 3.75 (br. s., 2 H), 4.60 (s, 1 H), 4.74 (s, 1 H), 6.41 (br. s., 1 H), 6.53 (br. s., 1 H), 6.91 (br. s., 1 H), 7.13 (br. s., 1 H), 7.51 (br. s., 1 H), 7.72 (br. s., 1 H), 7.92 (br. s., 1 H); Figure S40. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.68, 15.34, 16.18, 18.32, 19.64, 21.14, 25.45, 25.64, 27.43, 27.97, 29.86, 31.31, 32.52, 34.42, 35.93, 36.92, 37.24, 38.74, 38.86, 40.69, 41.80, 41.90, 45.62, 50.84, 52.53, 52.65, 54.26, 54.60, 55.46, 78.98, 109.29, 113.76, 114.93, 122.67, 123.28, 125.04, 132.47, 135.78, 147.77, 151.12, 173.64; Figure S41. HRMS-ESI: calculated 757.52776 Da, found m/z 780.5171 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and 796.4904 $[\text{M}+\text{K}]^+$; Figure S42.

4-[[[(3 β)-28-(4-[2-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]ethyl)piperazine-1-yl]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid (**16**)

To a solution of **13** (500 mg, 0.75 mmol) and 4-DMAP (146 mg, 1.20 mmol) in THF (5 mL), 2,2-dimethylsuccinic anhydride (480 mg, 3.74 mmol) and a catalytic amount of *p*-TsOH were added. The reaction was stirred for 2 h at 130 °C in a microwave reactor. The mixture was diluted with H_2O and extracted with DCM (4 $\times$ 20 mL). Combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was chromatographed twice (i. toluene-AcOEt 1:1 $\rightarrow$ AcOEt; ii. toluene-AcOEt 1:1 + 1% Et_3N $\rightarrow$ AcOEt $\rightarrow$ DCM-MeOH 9:1, *v/v*). Compound **16** (328 mg, 0.41 mmol) was obtained as white solids in 53% yield. R_F = 0.43 in DCM-MeOH 9:1 (*v/v*). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.74–0.77 (m, 1 H), 0.81 (s, 6 H), 0.83 (s, 3 H), 0.93 (s, 3 H), 0.95 (s,

3 H), 1.12–1.16 (m, 1 H), 1.27 (br. s., 6 H), 1.32–1.41 (m, 8 H), 1.44 (s, 9 H), 1.47–1.65 (m, 7 H), 1.68 (s, 3 H), 1.70–1.74 (m, 1 H), 1.80–1.86 (m, 1 H), 1.90–1.95 (m, 1 H), 2.05–2.09 (m, 1 H), 2.49–2.69 (m, 6 H), 2.82–2.89 (m, 1 H), 2.93–3.00 (m, 1 H), 3.29 (br. s., 2 H), 3.61 (br. s., 4 H), 3.71 (br. s., 2 H), 4.45–4.50 (m, 1 H), 4.58 (s, 1 H), 4.72 (s, 1 H), 5.15 (br. s., 1 H); Figure S43. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.67, 16.06, 16.21, 16.57, 18.23, 19.64, 21.14, 23.66, 23.68, 25.57, 25.58, 25.92, 25.94, 27.91, 28.40, 29.82, 31.30, 32.36, 32.39, 34.26, 35.96, 36.69, 36.82, 37.12, 37.76, 38.39, 38.41, 40.63, 41.87, 45.60, 50.72, 52.60, 52.94, 54.49, 55.53, 57.19, 57.20, 109.24, 128.19, 129.00, 151.20, 155.99, 173.43; Figure S44. HRMS-ESI: calculated 795.57615 Da, found m/z 796.58292 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Figure S45.

4-[(3 β)-28-[4-(2-Aminoethyl)piperazine-1-yl]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid hydrochloride (17)

To compound 16 (150 mg, 0.19 mmol) in CHCl_3 (2 mL), 2 M HCl solution in Et_2O (3.2 mL) was added. The mixture was stirred for 2 h at RT under argon atmosphere. Solvents were evaporated and the crude was sonicated for 20 min in Et_2O (5 mL). The precipitate was collected and dried in vacuo. Compound 17 (102 mg, 0.16 mmol) was obtained as white solids in 91% yield. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm: 0.82–0.85 (m, 1 H), 0.87 (br. s., 6 H), 0.91 (s, 3 H), 0.98 (s, 3 H), 0.99–1.02 (m, 1 H), 1.04 (s, 3 H), 1.05–1.10 (m, 1 H), 1.27 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.29–1.69 (m, 8 H), 1.71 (s, 3 H), 1.73–1.78 (m, 2 H), 1.83–1.89 (m, 1 H), 1.98–2.04 (m, 1 H), 2.13–2.18 (m, 1 H), 2.54–2.67 (m, 2 H), 2.81–2.87 (m, 1 H), 2.91–2.97 (m, 1 H), 3.05–3.77 (m, 11 H), 4.45–4.49 (m, 1 H), 4.61 (s, 1 H), 4.72 (s, 1 H); Figure S46. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ ppm: 13.72, 15.25, 15.40, 15.67, 17.87, 18.29, 20.87, 20.90, 23.27, 24.44, 24.79, 25.43, 25.45, 27.09, 29.66, 30.91, 31.85, 33.65, 34.06, 36.89, 36.92, 37.44, 38.21, 39.94, 40.54, 41.67, 44.24, 45.78, 50.65, 52.19, 52.32, 53.16, 54.56, 55.52, 81.25, 108.69, 150.83, 171.53, 174.40, 179.15; Figure S47. HRMS-ESI: calculated 695.52372 Da, found m/z 696.53153 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Figure S48.

4-[(3 β)-28-[4-[N-(4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)-2-aminoethyl]piperazine-1-yl]-28-oxolup-20(29)-ene-3-yl]oxy]-2,2-dimethyl-4-oxobutanoic acid (18)

To compound 17 (50 mg, 0.07 mmol) and BODIPY-SMe (19 mg, 0.08 mmol) in the mixture of CHCl_3 (5 mL) and THF (3 mL), a drop of Et_3N was added. The mixture was stirred 30 min at RT. Solvents were evaporated and the residuum was chromatographed (DCM-MeOH 20:1, $v/v + 0.5\%$ Et_3N). Compound 18 (39 mg, 0.04 mmol) was obtained as yellowish solid in 62% yield. $R_F = 0.22$ in DCM-MeOH 20:1 ($v/v + 0.5\%$ Et_3N). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.75–0.78 (m, 1 H), 0.81 (s, 3 H), 0.83 (s, 3 H), 0.84 (s, 3 H), 0.88–0.92 (m, 1 H), 0.94 (s, 3 H), 0.96 (s, 3 H), 1.15–1.19 (m, 1 H), 1.28 (s, 3 H), 1.30 (s, 3 H), 1.35–1.42 (m, 7 H), 1.45–1.51 (m, 2 H), 1.51–1.64 (m, 6 H), 1.69 (s, 3 H), 1.72–1.76 (m, 1 H), 1.83–1.89 (m, 1 H), 1.93–1.98 (m, 1 H), 2.06–2.12 (m, 1 H), 2.51–2.70 (m, 6 H), 2.82–2.89 (m, 3 H), 2.94–3.00 (m, 1 H), 3.68 (br. s., 4 H), 3.75 (br. s., 2 H), 4.46–4.51 (m, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 4.73 (s, 1 H), 6.39 (br. s., 1 H), 6.52 (br. s., 1 H), 6.91 (br. s., 1 H), 7.13 (br. s., 1 H), 7.50 (br. s., 1 H), 7.71 (br. s., 1 H), 7.96 (br. s., 1 H); Figure S49. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.67, 16.13, 16.21, 16.50, 18.18, 19.60, 21.17, 23.65, 25.05, 25.60, 27.92, 29.68, 29.84, 31.29, 32.49, 34.32, 35.94, 36.88, 37.12, 37.74, 38.42, 40.48, 40.68, 41.88, 41.96, 44.75, 45.65, 50.71, 52.57, 52.61, 54.28, 54.57, 55.55, 81.47, 109.33, 113.68, 114.87, 122.61, 123.38, 125.04, 132.41, 135.68, 147.79, 151.11, 171.11, 173.64, 182.29; Figure S50. HRMS-ESI: calculated 885.57511 Da, found m/z 884.56855 $[\text{M}-\text{H}]^-$; Figure S51.

2.2. Biochemistry

2.2.1. Cell Lines

All cells (if not indicated otherwise) were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). The highly chemosensitive CCRF-CEM line is derived from T lymphoblastic leukaemia, K562 represent cells of chronic myelogenous leukaemia. Colorectal adenocarcinoma HCT116 cell line and its p53 gene knockout counterpart (HCT116p53 $^-/-$, Horizon Discovery Ltd., Cambridge, UK) were used as models to assess the impact of p53 deficiency on cell line sensitivity. A549 cells are derived from lung adenocarcinoma and U2OS from human osteosarcoma. CEM-DNR and K562-Tax

are well-characterized daunorubicin and paclitaxel-resistant sublines of CCRF-CEM and K562. The CEM-DNR resistant cells overexpress the P-glycoprotein and LRP protein, the K562-Tax overexpress P-glycoprotein but is losing the expression of LRP, which is present at parental K562 cell line. P-glycoprotein belongs to the ABC transporters' family and is involved in the primary and acquired multidrug resistance phenomenon by the efflux of toxic compounds, LRP protein is involved in the lysosomal degradation. MRC-5 and BJ cell lines were used as a non-tumour control and represent human fibroblasts. The cells were maintained in Nunc/Corning 80 cm² plastic tissue culture flasks and cultured in cell culture medium according to ATCC or Horizon recommendations (DMEM/RPMI 1640 with 5 g/L-glucose, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 10% fetal calf serum, and NaHCO₃).

2.2.2. MTS Assay

To perform the cytotoxicity MTS assay, cell suspensions were prepared and diluted according to the cell type and the expected target cell density (25,000–35,000 cells/mL) based on cell growth characteristics. Cells were added by an automatic pipettor (30 µL) into 384 well microtiter plates. All tested compounds were dissolved in 100% DMSO and four-fold dilutions of the intended test concentration were added in 0.15 µL aliquots at time zero to the microtiter plate wells by the echo-acoustic liquid handler Echo550 (Labcyte, San Jose, CA, USA). The experiments were performed in technical duplicates and at least three biological replicates. The cells were incubated with the tested compounds for 72 h at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere at 99% humidity. At the end of the incubation period, the cells were assayed by using the MTS test. Aliquots (5 µL) of the MTS stock solution were pipetted into each well and incubated for an additional 1–4 h. After this incubation period, the optical density (OD) was measured at 490 nm with an Envision microplate reader (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Tumour cell survival (TCS) was calculated using the following equation: $TCS = (OD_{\text{drug-exposed well}} / \text{mean } OD_{\text{control wells}}) \times 100\%$. The IC₅₀ value, the drug concentration that is lethal to 50% of the tumour cells, was calculated from the appropriate dose-response curves in Dotmatics software (The Old Monastery, Windhill, Bishop's Stortford, Herts, UK).

2.2.3. Cell Cycle and Apoptosis Analysis

CCRF-CEM cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^6 /well. After 24 h, compounds at concentrations corresponding to $1 \times$ or $5 \times$ IC₅₀ were added to the wells and incubated for 24 h. Cells were then harvested, washed with cold $1 \times$ PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol. Fixed cells were incubated overnight at -20°C , washed in hypotonic citrate buffer, treated with RNase ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and incubated with propidium iodide for 15 min. DNA content was analysed using Becton Dickinson flow cytometer and cell cycle data were analysed in the program ModFitLT (Verity, Carrollton, TX, USA). Apoptosis was measured in a logarithmic model expressing the percentage of the particles with propidium content lower than cells in G0/G1 phase ($<G1$) of the cell cycle. The mitotic marker pH3Ser10 antibody (Sigma) and secondary anti-mouse-FITC antibody (Sigma) were used for labelling and subsequent flow cytometry analysis of ethanol-fixed CCRF-CEM cells.

2.2.4. BrdU Incorporation Analysis

Cells were cultivated as in the method above and pulse-labelled with $10 \mu\text{M}$ 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) for 30 min before collection to the test tubes. The cells were washed with cold $1 \times$ PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol. Before analysis, they were washed with $1 \times$ PBS and incubated in 2M HCl for 30 min at room temperature. Following neutralization with 0.1M Na₂B₄O₇ (borax), the cells were washed with 0.5% Tween-20 and 1% BSA in $1 \times$ PBS. The cell pellets were stained using a primary anti-BrdU antibody (Exbio, Vestec, Czech Republic) for 30 min at room temperature and a secondary anti-mouse-FITC antibody (Sigma). The samples were then incubated with propidium iodide (0.1 mg mL^{-1}),

treated with RNase A (0.5 mg mL^{-1}) for 1 h at room temperature in the dark and analysed as above.

2.2.5. BrU Incorporation Analysis

Cells were cultured, treated as above, pulse-labelled with 1 mM 5-bromouridine (BrU) for 30 min and fixed in 1% buffered paraformaldehyde with 0.05% NP-40 at room temperature for 15 min. Following overnight incubation at 4°C , they were washed with 1% glycine in $1 \times \text{PBS}$, washed with $1 \times \text{PBS}$ again and stained with primary anti-BrdU antibody cross-reacting to BrU (Exbio) for 30 min and secondary anti-mouse-FITC antibody (Sigma). The analysis was performed similarly to the BrdU analysis.

2.2.6. Fluorescent Microscopy

U2OS cell line (ATCC, USA) was transduced with premade lentiviral particles (Vectalis-TaKaRa, Japan) with sequences that express fluorescent protein tag mCherry targeted to specific subcellular locations. All cell lines were prepared according to the vendor's instructions. The U2OS-Nuc cell line was prepared by using rLV.EF1.mCherry-Nuc-9 (cat. n. 0023VCT), containing a NLS sequence that imports protein into the nucleus. The U2OS-ER cell line was transduced by rLV.EF1.mCherry-ER-9 (cat. n. 0025VCT), which contains a calreticulin signal sequence and a KDEL sequence that associates protein with the endoplasmic reticulum. The U2OS-GA cell line was transduced by rLV.EF1.mCherry-Golgi-9 (cat. n. 0022VCT), containing a human GT precursor, a protein localized in Golgi Apparatus. The U2OS-Mito cell line was prepared by using rLV.EF1.mCherry-Mito-9 (cat. n. 0024VCT), containing a mitochondrial targeting sequence.

U2OS cells with fluorescent fusion proteins (density 1.0×10^3 per well) were seeded into 384 CellCarrier plates (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and pre-incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . The attached cells were treated with tested compounds in concentration $10 \mu\text{M}$ for 1 h and subsequently rinsed with fresh media. The live-cell imaging was performed by Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Tokyo, Japan) spinning disc confocal microscopy system at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Live cells were monitored by a $60 \times$ water immersion objective. The fluorescent signal was excited by lasers (405 nm and 561 nm) and the emission was filtered by bandpass filters (BP 445/45 and BP 595/20). All images were post-processed, and Pearson's and Mander's coefficients were calculated using the JACoP plugin in Image-J software.

2.2.7. VSV-G Pseudotyped HIV-1 Particles Production

HIV-1 particles were obtained from HEK 293 cells, cotransfected by a combination of three vectors: packaging psPAX2 vector encoding HIV Gag, Pol, Tat and Rev, reporter/transfer pWPXLd-GFP vector encoding LTR, RRE and GFP as a reporter, and envelope pHEF-VSV-G vector, encoding vesicular stomatitis virus Env, VSV-G. The psPAX2 vector [32] was kindly provided by Dr. Luban, the pWPXLd-GFP and pHEF-VSV-G vectors were purchased from Addgene (Watertown, MA, USA).

HEK-293 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and 1% L-glutamine (Sigma) at 37°C under 5% CO_2 . A day before transfection, cells were plated at 3×10^5 cells per well. The following day, cells were transfected with the appropriate vectors using polyethylenimine (PEI, 1 mg/mL) at a 2:1 PEI:DNA ratio. Four hours post-transfection, the culture medium was replaced with fresh DMEM, containing various concentrations of tested compounds, solubilized in DMSO. At 48 h post-transfection, the culture media containing released virions were harvested, filtered through $0.45\text{-}\mu\text{m}$ pores membrane and used for immunochemical quantification and characterization by ELISA and Western blot using rabbit anti-HIV-1 CA antibody.

2.2.8. Single-Round Infectivity Assay

The infectivity was determined similarly as described earlier [33–35]. Briefly, 48 h post-transfection, the culture media from HEK 293 cells transfected with psPAX2, pWPXLd-GFP and pHEF-VSV-G vectors at a ratio 1:1:1 in the presence of tested compounds were collected and filtered through a 0.45- μ m filter. HIV-1 CA content was determined by ELISA [33]. The freshly seeded HEK 293 cells were infected with ELISA-normalized amounts of VSV-G pseudotyped HIV-1 particles and incubated for 48 h. The cells were fixed with 2% paraformaldehyde and transferred to a FACS tube. Quantification of GFP-positive cells was performed using a BD FACS Aria III flow cytometer (BD Life Sciences, San Jose, CA, USA).

2.2.9. Western Blot

At 48 h post-transfection, 100 μ L aliquots of virus-containing culture media were combined with 20 μ L of PLB (6 $\times$) and the samples were analysed by Western blot using rabbit anti-HIV-1 CA (in house production). Proteins were resolved by reducing SDS-PAGE (12%) and blotted onto a nitrocellulose membrane. The antigen-antibody complexes were detected by ClarityTM Western ECL Substrate (Biorad, Hercules, CA, USA) and visualized using the FUSION 7S system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

3. Results and Discussion

3.1. Chemistry

The synthesis of fluorescent labels was based on 8-thiomethyl BODIPY (**BODIPY-SMe**; Figure 2), which was prepared in our laboratory, according to the procedure previously described in the literature [36]. The thiomethyl group is reactive towards amines. After this reaction, secondary amines are formed with significant fluorescence characterized by emission in the blue region of the spectrum. For the preparation of betulinic acid conjugates, a carboxy-terminated derivative (**BODIPY-CO₂H**, Figure 2) was prepared by reaction of **BODIPY-SMe** and β -alanine [37] and an amino-terminated derivative by reaction with 3-azidopropan-1-amine [38] and reduction of azide (**BODIPY-NH₂**, Figure 2) to amine (**BODIPY-NH₂**, Figure 2) by catalytic hydrogenation.

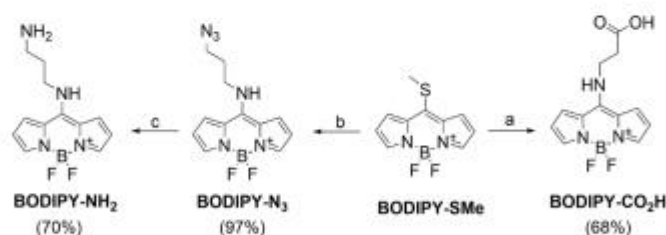


Figure 2. Synthesis of functionalized BODIPY dyes. Reagents and conditions: (a) β -Ala, DMSO-H₂O, 30 °C, 12 h; (b) 3-azidopropylamine, DCM, 30 min, RT; (c) H₂, Pd/C, AcOEt, 2h, RT.

Betulinoyl azidopropylamide (*N*-(3-azidopropyl)-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-amide) **1** was prepared by reacting BA with 3-azidopropan-1-amine using carbodiimide chemistry (Figure 3A). The reaction was catalysed by EDCI (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) in the presence of 4-DMAP (4-dimethylaminopyridine) and HOBT (1-hydroxybenzotriazole). The bevirimat derivative **2** was prepared from compound **1** by reaction with 2,2-dimethylsuccinic anhydride according to a protocol reported in the literature [39]. By Staudinger reduction [40] catalysed by triphenylphosphine in aqueous THF, the azido group of compound **1** was reduced to amino derivative **3**. In an effort to reduce derivative **2** by the same method, a non-separable mixture of products was obtained. By the reaction of BA with **BODIPY-NH₂** catalysed by DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) in the presence of 4-DMAP, derivative **4** was obtained. This reaction proceeded without difficulty in good

yield (Figure 3A). Azide 1 was further conjugated at the C-3 position with **BODIPY-CO₂H** by Steglich esterification [41] to produce derivative 5. The azide group of derivative 5 was reduced by Staudinger reduction to amine 6. When attempting to modify compound 4 with dimethylsuccinic anhydride under the conditions used to prepare derivative 2, degradation of the fluorescent label occurred, probably due to too high a temperature. Therefore, another synthetic procedure using a *tert*-butoxycarbonyl protecting group (Boc) on the terminal amino group was chosen for the synthesis of other “aminopropyl” derivatives (Figure 3B). The *N*-Boc-1,3-diaminopropane linker was conjugated to BA to give compound 7, which could already be used to prepare the bevirimat derivative 8. The protecting group was removed in an acidic environment to give amine 9. From compound 9, a fluorescently labelled derivative of bevirimat was prepared by the reaction with **BODIPY-SMe**.

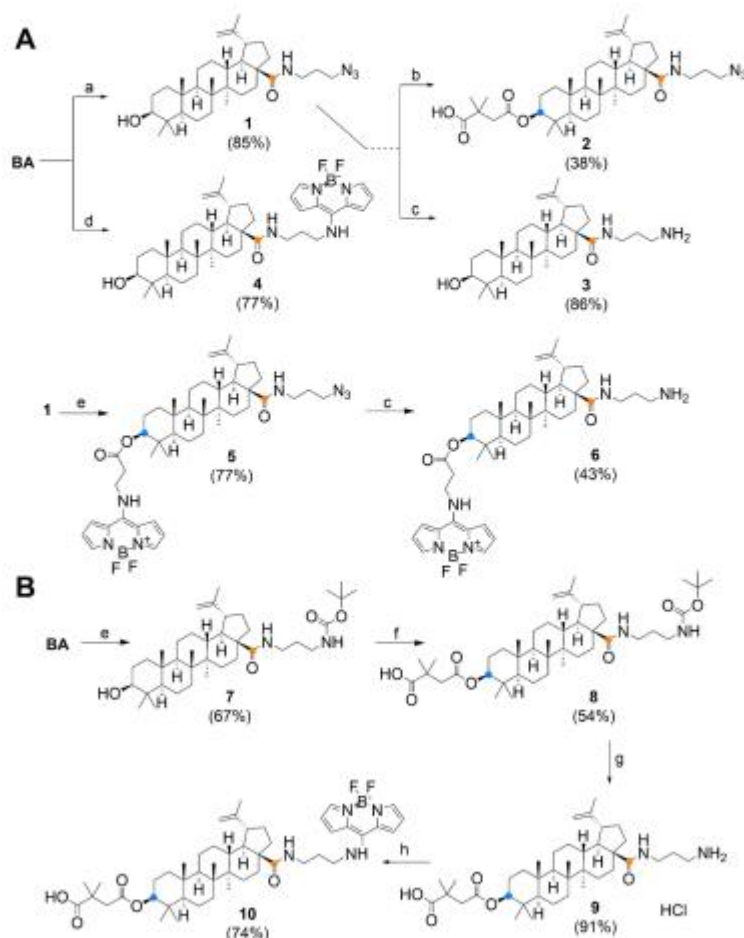


Figure 3. Synthesis of “aminopropyl” derivatives by azide reduction (panel A) and Boc chemistry (panel B). Reagents and conditions: (a) 3-azidopropylamine, 4-DMAP, HOBT, EDC, DMF, 36 h, RT; (b) 2,2-dimethylsuccinic anhydride, 4-DMAP, *p*-TsOH, THF, 2 h, MW-130 °C; (c) PPh₃, THF/H₂O, 23 h; (d) BODIPY-NH₂, 4-DMAP, DCC, DCM, 12 h, RT; (e) BODIPY-CO₂H, DCC, 4-DMAP, DCM, 12 h, RT; (f) *N*-Boc-1,3-diaminopropane, EDC, HOBT, 4-DMAP, DMF, 48 h, RT; (g) 2M HCl/Et₂O, 12 h, RT (under argon); (h) BODIPY-SMe, CHCl₃-THF, Et₃N, 30 min, RT.

Analogous to the synthetic procedure shown in Figure 3B, a series of substances with a piperazine linker at position C-28 was prepared (Figure 4). The introduction of the piperazine motif was chosen on the basis of promising results for the so-called privileged structures published previously [21]. The exception was that the C-3 hydroxyl was first acetylated to produce compound **11**, and in the next step, the carboxyl group was activated to reactive chloride. After condensation with 1-(2-*N*-Boc-aminoethyl) piperazine, tertiary amide **12** was obtained. Deacetylation of **12** occurred in a relatively low yield; however, part of the starting material was recovered during the separation of the reaction mixture.

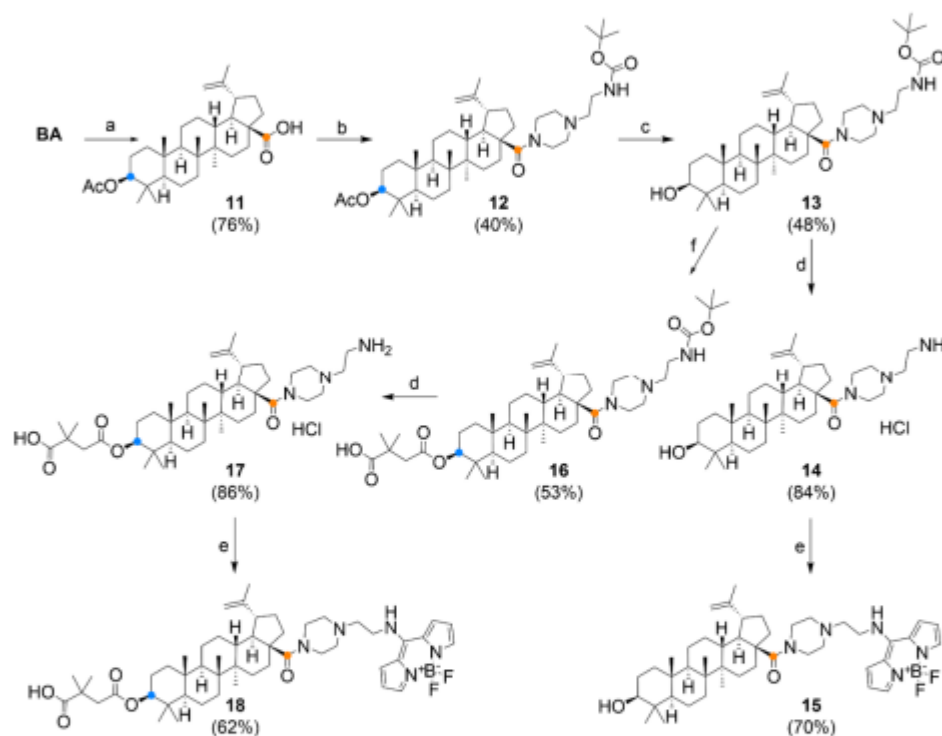


Figure 4. Synthesis of “piperazinyl” derivatives. Reagents and conditions: (a) Ac_2O , pyridine, 12 h, RT; (b) i. $(\text{COCl})_2$, DCM, DMF, 2 h, RT, ii. 1-(2-*N*-boc-aminoethyl)piperazine, Et_3N , DCM, 12 h, RT; (c) 4M NaOH, THF-MeOH, 3 h, RT; (d) 2M HCl/ Et_2O , 12 h, RT (under argon); (e) BODIPY-SMe, CHCl_3 -THF, Et_3N , 30 min, RT; (f) 2,2-dimethyl succinic anhydride, 4-DMAP, *p*-TsOH, THF, 2 h, MW-130 °C.

Experimental details of the preparation of substances are described in Section 2.1. and the NMR, HRMS spectra (Figures S1–S51) and photochemical properties (Figure S52 and Table S1) of the substances are shown in the Supplementary Material.

3.2. Cytotoxicity on a Panel of Cell Lines

The *in vitro* cytotoxicity of derivatives was assessed using MTS assay on the normal human foreskin and lung fibroblasts BJ and MRC-5 and cancer cell lines of a different histogenetic type (Table 1). Under the experimental conditions, BA and BT showed a weak or medium cytotoxic effect directed against cancer cell lines. Structures **5**, **15** and **16** did not induce any cytotoxic effect in the entire cell line panel at the maximal tested concentration. Derivatives **4**, **9**, **12**, **17** and **18** were inactive against the entire cell line panel except for the CCRF-CEM lymphoblastic leukaemia cell line. IC_{50} values obtained for these compounds in

the sensitive cell line CCRF-CEM were between 5.76 and 23.65 μM . Derivatives **3**, **6**, **13** and **14** exerted high cytotoxicity against the entire cell line panel, including normal fibroblasts. The most potent compounds in the study were structures **3** and **14** with IC_{50} values 0.21 and 0.29 μM in CCRF-CEM. Derivatives **2**, **8** and **10** displayed medium cytotoxicity across the cell line panel. Derivatives **1** and **7** showed activity only against selected cell lines in the panel. Betulinic acid intermediate **11** was not tested. The MTS assay did not reveal any effect directed specifically against cancer cell lines, IC_{50} values calculated for normal fibroblast and cancer cell lines were highly comparable. Resistant sublines CEM-DNR and K562-Tax displayed for some compounds different sensitivity compared to their parental cell lines. As expected, a lower sensitivity was observed in the CEM-DNR resistant subline. The biggest difference in favour of CEM-DNR was observed for derivatives **6** and **3**. **BA** and **13** showed an opposite profile in CEM-DNR and **1**, **2**, **3**, **8** and **10** in the K562-Tax resistant subline, proposing better activity in resistant cell lines. Based on this data, we can speculate that there is a different mechanism in the elimination of cytotoxic derivatives. Several tested compounds are probably substrates of the P-glycoprotein as **4**, **6**, **13**, **16**, **17** and **18**. However, not all data are in conclusion with P-glycoprotein transport, and we think that several tested derivatives could be substrates for LRP protein. Higher LRP expression in CEM-DNR and lower in K562-Tax correlates with cytotoxicity of the derivatives **1**, **2**, **3**, **8**, **10**. Derivative **13** is not active in the highly chemosensitive CCRF-CEM cell line, but comparable activity was observed in all tested cell lines, including non-tumour lines.

3.3. Cell Cycle, Apoptosis and DNA/RNA Synthesis

To reveal cytostatic effects, we examined proliferation markers and cell cycle profile of the sensitive CCRF-CEM cell line following a 24 h incubation with the derivatives (Table 2).

Exposure to $1 \times \text{IC}_{50}$ and $5 \times \text{IC}_{50}$ concentrations of derivatives did not induce DNA fragmentation with the exception of high doses of **2** and **8**. Treatment with $1 \times \text{IC}_{50}$ concentrations did not modulate cell cycle profile while $5 \times \text{IC}_{50}$ concentration led in all samples to a more pronounced effect. The treatment with $5 \times \text{IC}_{50}$ derivatives **2**, **12** and **14** increased the percentage of cells in the S-phase by about 50% compared to untreated control. Nevertheless, there was not any other prominent effect on the cell cycle profile or cell cycle arrest. To assess the impact of structures on CCRF-CEM proliferation potential, we monitored mitotic marker pH3Ser10 and proliferation marker BrdU after 24 h incubation with the compounds. Analysis of mitotic marker showed a low rate of cell division in cells treated with $5 \times \text{IC}_{50}$ concentration of derivatives **2**, **3**, **6**, **12** and **14**. Derivatives **3**, **6**, **8**, **10**, and **14** reduced the fraction of proliferating BrdU positive CCRF-CEM cells. In contrast, structures **2**, **12** and **18** increased the percentage of cells incorporating BrdU into the DNA during pulse labelling. The complementary BrU based method of monitoring newly synthesized RNA in cells pre-incubated for 24 with the selected derivatives revealed stalled RNA synthesis induced by $5 \times \text{IC}_{50}$ concentration of derivatives **2**, **3**, **8**, **10**, **14** and **17**. Compound **18** at a high concentration increased the percentage of BrU positive cells. Such an increase indicates the high transcription activity as a mark of replication stress leading to DNA damage and cell death [42]. Although there was observed a slight modulation of cell cycle profile induced by compound derivatives **2**, **12** and **14**, the overall cell cycle data indicates that there is no general cytostatic effect of tested betulinic acid derivatives.

Table 1. Summary of cytotoxic activities (IC_{50} , μM).

Compound Cell Line ^a	BA	BT	1	2	3	4	6	7	8	9	10	12	13	14	16	17	18
CCRF-CEM	>50	12.82	8.98	8.14	0.21	23.65	1.55	>50	8.18	22.48	2.92	9.62	>50	0.29	>50	5.76	8.61
CEM-DNR	23.05	22.17	16.84	10.23	1.22	>50	11.53	>50	9.24	>50	7.00	>50	4.76	0.35	>50	>50	>50
K562	>50	23.60	>50	25.99	0.90	>50	5.25	>50	19.18	>50	23.19	>50	5.09	0.40	47.90	>50	>50
K562-Tax	>50	22.03	10.58	15.94	0.37	>50	31.80	>50	13.30	>50	12.21	>50	8.77	0.52	>50	>50	>50
A549	22.68	23.06	>50	22.87	1.80	>50	6.65	21.29	18.84	>50	13.55	>50	5.15	1.26	44.93	>50	47.80
HCT116	>50	14.17	>50	19.40	0.82	>50	3.85	>50	13.21	>50	7.92	>50	6.02	0.39	46.63	>50	30.84
HCT116p53 ^{-/-}	>50	18.20	>50	29.24	0.44	>50	3.39	>50	21.56	>50	8.80	>50	4.99	0.44	44.76	>50	45.50
U2OS	29.69	27.63	29.04	22.22	0.89	>50	5.00	18.39	17.16	>50	12.38	>50	4.16	0.42	44.62	44.58	>50
MRC-5	>50	>50	>50	24.19	2.59	>50	8.07	17.58	23.14	>50	14.12	>50	5.18	1.58	44.61	>50	>50
BJ	>50	>50	>50	25.33	1.91	>50	8.37	20.69	21.54	>50	15.49	>50	5.36	1.59	47.63	>50	>50

^a Cytotoxic activity was determined by MTS assay following 3-day incubation. Values represent means of IC_{50} from three independent experiments with SD ranging from 10–25% of the average values. Tested cell lines: CCRF-CEM (childhood T acute lymphoblastic leukaemia), CEM-DNR (CCRF-CEM daunorubicin resistant), K562 (chronic myelogenous leukaemia), K562-Tax (K562 paclitaxel-resistant), A549 (lung adenocarcinoma), HCT116 (colorectal cancer), HCT116p53^{-/-} (null p53 gene), and U2OS (osteosarcoma). Normal human cell lines: MRC-5 and BJ (normal cycling fibroblasts). BA, betulinic acid; BT, bevirimat.

Table 2. Effect of cytotoxic compounds on cell cycle, apoptosis and DNA/RNA synthesis in CCRF-CEM lymphoblasts (% of positive cells).

Compound	<G1	G0/G1	S	G2/M	pH3 ^{Ser10} ^a	BrDU ^b	BrU ^c
control	2.20	40.77	37.64	21.60	1.77	37.22	40.77
1 ●	1.36	37.03	44.13	18.84	1.53	36.54	52.69
1 ●	1.93	42.33	35.87	21.80	1.71	37.99	44.47
2 ●	4.33	39.88	46.65	13.47	1.33	52.07	28.60
2 ●	41.17	23.94	56.21	19.85	0.58	22.75	4.05
3 ●	1.30	35.07	36.54	28.40	2.04	41.88	50.56
3 ●	3.53	31.73	41.18	27.09	0.16	2.06	0.40
6 ●	2.23	33.39	49.74	16.87	1.50	44.97	42.25
6 ●	5.24	37.16	39.52	23.32	0.50	7.10	26.05
8 ●	2.64	31.93	47.72	20.35	1.70	46.44	33.61
8 ●	39.65	40.78	37.66	21.56	1.25	8.51	1.85
10 ●	3.80	37.98	44.59	17.43	1.44	42.25	35.04
10 ●	10.69	44.58	42.32	13.10	1.25	10.18	13.02
12 ●	2.45	33.64	43.16	23.20	1.40	59.73	41.98
12 ●	3.01	29.75	56.69	13.55	0.68	64.07	34.00
14 ●	8.63	21.46	56.29	22.25	0.15	24.55	1.56
14 ●	8.16	27.28	51.82	20.90	0.18	0.52	1.53
17 ●	2.89	34.83	46.96	18.21	1.56	48.07	26.70
17 ●	4.04	43.42	38.47	18.10	1.49	29.41	3.39
18 ●	2.06	36.06	44.31	19.63	1.25	55.81	46.98
18 ●	2.97	38.01	44.12	17.87	1.55	49.64	70.23

Flow cytometry analysis was used for quantification of cell cycle distribution and apoptotic cells with a concentration of compounds equal to $1 \times \text{IC}_{50}$ (●) and $5 \times \text{IC}_{50}$ (●) values. ^a phospho-Histone (Ser10); ^b 5-bromo-2-deoxyuridine; ^c BrU, 5-bromouridine.

3.4. Live Cells Imaging

The group of six derivatives of BA and BODIPY was studied on the U2OS-Nuc cell line with the nucleus labelled by fluorescent protein mCherry. The functionalized BODIPY dyes (BODIPY-CO₂H and BODIPY-NH₂), as well as precursor BODIPY-SMe, were used as a control. All fluorescent microscopic images of this pilot experiment are shown in Figure S53. To achieve a better specificity of the staining, we have focused on the short incubation with the fluorescent conjugates. After short incubation (1 h), conjugates 4 and 6 out of this group of derivatives were localized in living cells, but only with the weak signal in the nucleus of the studied cell line (Figure 5B—Pearson's and Mander's coefficients). The functionalized BODIPY dyes were not detected in the U2OS-Nuc cell line and thus it is highly possible that cellular uptake of conjugates 4 and 6 is due to their groups on BA residue. Other studied derivatives of BA and BODIPY were not detected in living cells under our experimental conditions; however, it is possible that the signal can be observed at later intervals. BODIPY-SMe is reactive due to the 8-thiomethyl group and it was predicted to penetrate cell compartments; this was confirmed by fluorescent microscopy.

To further study the cellular localization of conjugates 4 and 6, we decided to continue with fluorescent microscopy on cell lines with fluorescently labelled structures of mitochondria, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus, which are the most published targets of BA [29,30]. The results of these colocalization experiments are shown in Figure 5. Both conjugates demonstrated presence in multiple cellular structures. Pearson's coefficient (Figure 5B) showed the highest correlation of signal in U2OS-ER cell line, and then in U2OS-Mito cell line and the lowest correlation was measured in U2OS-GA cell line. When we expressed colocalization by Mander's coefficient (overlap of red channel compared to the blue channel), which is more specific for colocalization calculation of signal presented in multiple cellular structures, the obtained data showed both conjugates 4 and 6 almost perfectly label mitochondria and endoplasmic reticulum. The lowest colocalization signal was again detected in the U2OS-GA cell line. BODIPY-SMe was used based on the data

from the pilot experiment as a positive control with perfect colocalization in all studied cell lines. Images with entire microscopic fields are shown in Figures S54–S56.

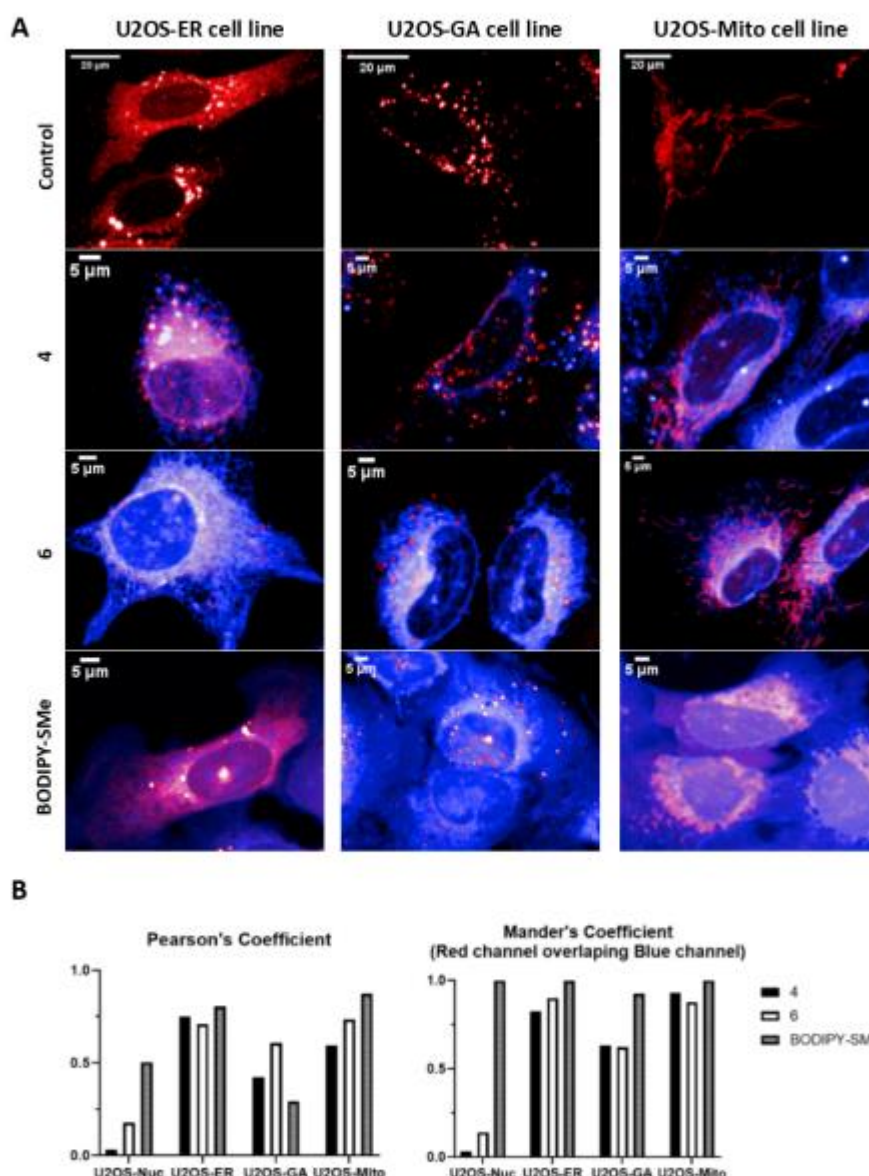


Figure 5. Live cell imaging and colocalization experiments of active compounds (**4**, **6**) and BODIPY-SMe (panel A) and visualization of Pearson's and Mander's coefficient (panel B).

To conclude our results from fluorescent microscopy study of six derivatives of BA and BODIPY, only conjugates **4** and **6** are detected in living cells under our experimental conditions (1 h following the treatment). Furthermore, we were able to almost perfectly

colocalize both conjugates with cellular structures as endoplasmic reticulum and mitochondria, which is in agreement with data published in the past [21]. Compound **4** has, in its structure, fluorophore attached to the carboxyl group at the C-28 position, thus it is more similar to the pristine structure of BA and has low cytotoxicity (close to free BA). Conversely, compound **6** contains a conjugated amine at the C-28 position and the fluorophore is attached to the hydroxyl group at the C-3 position of BA. Its cytotoxicity is markedly more pronounced than in the case of substance **4**. It is clear that the “polar head” of the molecule is responsible for cytotoxicity. Moreover, this moiety can be used for the intracellular targeted delivery, or organelle/mitochondrion targeting, as is described by the previous research works [43,44]. As the localization of both compounds is similar, it is likely that the direct target remained unchanged, but the effect of compound **6** was potentiated by the presence of free amine moiety in the molecule. The localization of the compounds in lipid rich compartments (mitochondria, endoplasmic reticulum) can also be explained by the lipid character of the BA and its analogues. The calculated values of lipophilicity (logP) of the substances are close to BA (Table S2). The acidity constants (pKa) are indicative and their reproducibility is difficult because, in comparison with BA, the compounds described here are mostly in the form of amide or ester derivatives.

3.5. Anti-HIV Activity

Bevirimat (3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid) and its derivatives were shown to be maturation inhibitors of HIV-1 [45–47]. By binding to the CA-SP1 region of HIV-1 Gag polyprotein, bevirimat prevents HIV-1 protease-mediated release of C-terminal part of CA from a spacer peptide 1 (SP1) [48]. This results in a block of the final step of virus maturation and subsequently abolishes HIV-1 infectivity. An atomic model of HIV-1 CA-SP1 suggested that this inhibitor stabilizes the CA-SP1 structure, thus preventing the proteolytic cleavage [49]. Although bevirimat is a potent inhibitor of HIV-1 maturation, its clinical development was discontinued in 2010 due to the bevirimat resistance caused by Gag SP1 natural polymorphism (Q6, V7 and T8) [50–52]. However, bevirimat derivatives with modification at the C-28 position seem to overcome the problem with HIV-1 resistance [53,54]. Here, using VSV-G pseudotyped HIV-1 particles, we tested the effect of 17 BA derivatives on HIV-1 maturation and infectivity. The 50% cytotoxic concentration (IC₅₀) of the compounds was first evaluated by Resazurin assay. Two of the tested compounds, **3** and **14**, were highly toxic to HEK 293 cells at a concentration lower than 5 µM and significant cytotoxicity was also found for compound **6** (IC₅₀ 12 µM) (Table 3).

Table 3. Cytotoxicity and anti-HIV-1 activity of the tested compounds ^a.

Compd.	1	2	4	5	6	7	8	9	10	12	13	15	16	17	18
● IC ₅₀ [µM]	>40	36.4	>40	>40	12.0	>40	37.8	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
● IC ₅₀ [µM]	>50	11.7	44.1	>50	n.d.	>50	1.4	14.0	8.4	31.9	>50	>50	9.1	7.6	7.1

^a HEK 293 cells were grown in the presence or absence of tested compounds at a concentration ranging from 5 to 40 µM. The viability of the cells was determined by Resazurin assay 48 h later (●). To determine the effect of the compounds on HIV-1 infectivity (●), HEK 293 cells were transfected with the lentiviral vectors and treated with the tested compounds. The cells producing HIV-1 particles in the presence or absence of DMSO (at a final concentration of 1%) were used as controls. At 48 h post-transfection, the content of HIV-1 capsid (CA) protein from the culture media was quantified by ELISA and normalized amounts of VSV-G pseudotyped HIV-1 viruses were used to infect fresh HEK 293 cells. HIV-1 infectivity was determined 48 h later by quantification of GFP-producing cells by flow cytometry. The 50% infection inhibition (IC₅₀) was defined as the concentration of the compound that reduced the HIV-1 infectivity by 50% compared to the untreated controls.

Apart from these three cytotoxic compounds, 14 fewer toxic compounds were used in the HIV-1 single-round infectivity assay. HIV-1 particles pseudotyped with VSV glycoproteins were produced in HEK 293 cells in the presence of tested compounds. At 48 h post-transfection, the content of HIV-1 capsid (CA) protein from the culture media was quantified by ELISA and normalized amounts of VSV-G pseudotyped HIV-1 viruses were used to infect fresh HEK 293 cells. At 48 h post-infection, the HIV-1 infectivity was determined by quantification of GFP-producing cells by flow cytometry. The 50% infection

inhibition (IC_{50}) was defined as the concentration of the compound that reduced the HIV-1 infectivity by 50% compared to the untreated controls (Table 3). The compounds 1, 7, 13, 15 and 5 did not exhibit any potent anti-HIV-1 activity (data not shown). Conversely, compounds 2, 4, 9 and 12 inhibited anti-HIV-1 activity with IC_{50} from 11.7 to 44.1 μ M. The compounds 8, 10, 16, 17 and 18 inhibited HIV-1 with IC_{50} below 10 μ M (Table 3). To analyse whether these bevirimat derivatives also act as maturation inhibitors of CA-SP1 cleavage, the HIV-1 virions released from the HEK 293 cells treated with the selected compounds (2, 4, 8, 9, 10, 12, 16, 17 and 18) were analysed by Western blot using anti-HIV-1 CA antibody (Figure 6).

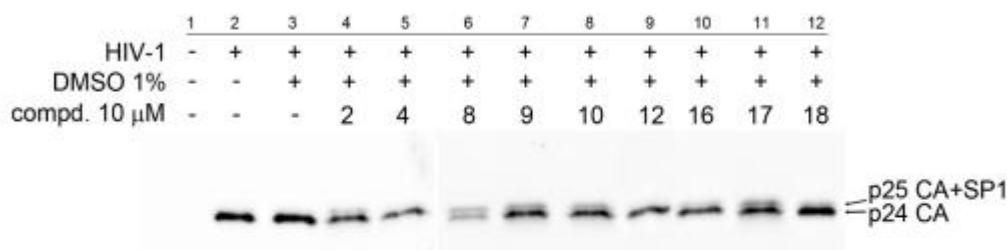


Figure 6. Effect of selected tested compounds on CA-SP1 processing of HIV-1 Gag polyprotein. HEK 293 cells produced HIV-1 particles pseudotyped with VSV-glycoproteins in the absence (lanes 2 and 3) or presence of selected tested compounds (lanes 4–12). At 48 h post-transfection, VSV-G pseudotyped HIV-1 viruses released from the HEK 293 cells were analysed by Western blot using an anti-HIV-1 CA antibody (duplicate of blot shown in Figure S57).

Only completely processed p24 CA of molecular weight of 24 kDa was identified in the viruses formed in the presence of compounds 4 and 12. However, in the samples treated with compounds 2, 8, 9, 10, 16, 17 and 18, we identified not only fully processed p24 CA, but also p25 CA-SP1 protein. This observation suggests a similar mechanism of inhibition as described for bevirimat, i.e., the block of the final step of HIV-1 maturation.

4. Conclusions

This study describes the synthesis and biological evaluation of 17 betulinic acid derivatives. The biological profiling revealed that BA derivatives 3 and 14 with modification at C-28 show increased cytotoxicity. However, the cytotoxicity was not specifically directed against cancer cell lines and was not associated with cell cycle arrest. The most effective compounds with sub-micromolar IC_{50} values 3 and 14 possess a hydroxyl group at C-3, whereas structures with a succinyl hemiester group displayed medium cytotoxicity or were inactive. The study introduced six original structures with BODIPY moiety linked to the lupane skeleton. BODIPY conjugates 4, 5, 15 and 18 showed low or no cytotoxic activity. In contrast, BODIPY derivative 6 induced strong and derivative 10 medium cytotoxicity in the entire cell line panel, although they do not share any similar substituents at positions C-3 and C-28. The cellular localization of BODIPY conjugates was further studied in U2OS cells using fluorescent microscopy. Fluorescent derivatives 4 and 6 colocalized with endoplasmic reticulum and mitochondria, which is in agreement with previous studies showing interaction with the processes and proteins localized in these organelles [55,56]. Uncoupling of the mitochondrial respiration, followed by radical burst and mitochondrial membrane disruption, is one of the well-described effects of betulin and betulinic acid [57–60]. Thus, we believe that reliable tools to study the derivatives of BA on living cells were established. The anti-HIV-1 activity showed that compounds 2, 8, 9, 10, 16 and 18 with IC_{50} lower than 10 μ M did not fully process the p24 CA and p25 CA-SP1 proteins, suggesting a similar mechanism of inhibition as described for bevirimat.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9091104/s1>. Supplementary Figures S1–S52 and Table S1 document the analytical identification (NMR, HRMS, UV-Vis and fluorescence). Table S2: Calculated physical properties (pKa and logP) of the derivatives. Figures S53–S56 show supplementary pictures from fluorescent microscopy. Figure S57: Effect of selected tested compounds on CA-SP1 processing of HIV-1 Gag polyprotein (a duplicate of western blot showed in Figure 5. in the article).

Author Contributions: M.J., P.D., P.B.D., M.R. and M.H. conceived and designed the experiments; D.K., T.Z., M.J., P.D., I.K., J.S., S.G., J.R. and P.D. performed the experiments; M.J., P.D. and M.R. analysed the data; M.J., P.D. and M.R. prepared the manuscript; P.B.D. and M.H. edited the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by GA CR (CZ) GA20-19906S, by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (CZ-OPENSCHEN-2018130, and EATRIS-CZ-LM2018133, Czech-Biolmaging-LM2018129) and internal grant of Palacky University (IGA_LF_2021_038).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Sousa, J.L.C.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Silva, A.M.S. Recent developments in the functionalization of betulinic acid and its natural analogues: A route to new bioactive compounds. *Molecules* **2019**, *24*, 355. [CrossRef]
- Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S.C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17–25. [CrossRef]
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M.; et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046–1051. [CrossRef] [PubMed]
- Noda, Y.; Kaiya, T.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: Possibility of a New Mode of Cell Killing. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1665–1670. [CrossRef] [PubMed]
- Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R.E.; Cosentino, L.M.; Ballas, L.M.; Jiang, J.B.; Janzen, W.P.; Chen, I.-S.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243–247. [CrossRef]
- Kodr, D.; Rumlová, M.; Zimmermann, T.; Džubák, P.; Drašar, P.; Jurásek, M. Antitumor and anti-HIV derivatives of betulinic acid. *Chem. Listy* **2020**, *114*, 658–667.
- Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, M.; Nunez, G.; Krammer, P.H.; Peter, M.E.; Debatin, K.M. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4956–4964. [PubMed]
- Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S.A.; Krammer, P.H.; Kroemer, G.; Peter, M.E.; Debatin, K.M. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33942–33948. [CrossRef]
- Liu, W.K.; Ho, J.C.K.; Cheung, F.W.K.; Liu, B.P.L.; Ye, W.C.; Che, C.T. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *498*, 71–78. [CrossRef]
- Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H.H.; Pietsch, T.; Debatin, K.M. Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 435–441. [CrossRef]
- Mullauer, F.B.; van Bloois, L.; Daalhuisen, J.B.; Ten Brink, M.S.; Storm, G.; Medema, J.P.; Schiffelers, R.M.; Kessler, J.H. Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity. *Anti-Cancer Drug* **2011**, *22*, 223–233. [CrossRef]
- Takada, Y.; Aggarwal, B.B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: Abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 3278–3286. [CrossRef]
- Melzig, M.F.; Bormann, H. Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. *Planta Med.* **1998**, *64*, 655–657. [CrossRef]
- Kwon, H.J.; Shim, J.S.; Kim, J.H.; Cho, H.Y.; Yum, Y.N.; Kim, S.H.; Yu, J. Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 417–425. [CrossRef]
- Kashiwada, Y.; Nagao, T.; Hashimoto, A.; Ikeshiro, Y.; Okabe, H.; Cosentino, L.M.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1619–1622. [CrossRef] [PubMed]
- Sundquist, W.L.; Krausslich, H.G. HIV-1 Assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006924. [CrossRef] [PubMed]
- Smith, P.F.; Ogundele, A.; Forrest, A.; Wilton, J.; Salzwedel, K.; Doto, J.; Allaway, G.P.; Martin, D.E. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3574–3581. [CrossRef] [PubMed]

18. Martin, D.E.; Blum, R.; Wilton, J.; Doto, J.; Galbraith, H.; Burgess, G.L.; Smith, P.C.; Ballou, C. Safety and pharmacokinetics of bevirimat (PA-457), a novel inhibitor of human immunodeficiency virus maturation, in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3063. [\[CrossRef\]](#)
19. Martin, D.E.; Blum, R.; Doto, J.; Galbraith, H.; Ballou, C. Multiple-Dose Pharmacokinetics and safety of bevirimat, a novel inhibitor of HIV maturation, in healthy volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* **2007**, *46*, 589–598. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Margot, N.A.; Gibbs, C.S.; Miller, M.D. Phenotypic susceptibility to bevirimat in isolates from HIV-1-infected patients without prior exposure to bevirimat. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2345–2353. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Zhao, Y.; Gu, Q.; Morris-Natschke, S.L.; Chen, C.-H.; Lee, K.-H. Incorporation of privileged structures into bevirimat can improve activity against wild-type and bevirimat-resistant HIV-1. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9262–9268. [\[CrossRef\]](#)
22. Zhao, Y.; Chen, C.-H.; Morris-Natschke, S.L.; Lee, K.-H. Design, synthesis, and structure activity relationship analysis of new betulinic acid derivatives as potent HIV inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *215*, 113287. [\[CrossRef\]](#)
23. Mukherjee, R.; Jaggi, M.; Rajendran, P.; Siddiqui, M.J.A.; Srivastava, S.K.; Vardhan, A.; Burman, A.C. Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2181–2184. [\[CrossRef\]](#)
24. Kim, J.Y.; Koo, H.M.; Kim, D.S.H.L. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2405–2408. [\[CrossRef\]](#)
25. Chowdhury, A.R.; Mandal, S.; Mitra, B.; Sharma, S.; Mukhopadhyay, S.; Majumder, H.K. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: Identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med. Sci. Monit.* **2002**, *8*, BR254–BR265. [\[PubMed\]](#)
26. Bildziukevich, U.; Rarova, L.; Janovska, L.; Saman, D.; Wimmer, Z. Enhancing effect of cystamine in its amides with betulinic acid as antimicrobial and antitumor agent in vitro. *Steroids* **2019**, *148*, 91–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Bildziukevich, U.; Vida, N.; Rarová, L.; Kolář, M.; Šaman, D.; Havlíček, L.; Drašar, P.; Wimmer, Z. Polyamine derivatives of betulinic acid and beta-sitosterol: A comparative investigation. *Steroids* **2015**, *100*, 27–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Brandes, B.; Hoenke, S.; Fischer, L.; Csuk, R. Design, synthesis and cytotoxicity of BODIPY-FL labelled triterpenoids. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Krajčovičová, S.; Staňková, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Soural, M.; Urban, M. A synthetic approach for the rapid preparation of BODIPY conjugates and their use in imaging of cellular drug uptake and distribution. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 4957–4966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell, A.E.; Csuk, R. Rhodamine B conjugates of triterpenic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
31. Pal, A.; Ganguly, A.; Chowdhuri, S.; Yousuf, M.; Ghosh, A.; Barui, A.K.; Kotcherlakota, R.; Adhikari, S.; Banerjee, R. Bis-arylidene oxindole-betulinic acid conjugate: A fluorescent cancer cell detector with potent anticancer activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 612–616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Rumlová, M.; Křížová, I.; Keprová, A.; Hadravová, R.; Doležal, M.; Strohalmová, K.; Pichová, I.; Hájek, M.; Ruml, T. HIV-1 protease-induced apoptosis. *Retrovirology* **2014**, *11*, 37. [\[CrossRef\]](#)
33. Dostálková, A.; Kaufman, F.; Křížová, I.; Kultová, A.; Strohalmová, K.; Hadravová, R.; Ruml, T.; Rumlová, M. Mutations in the basic region of the Mason-Pfizer monkey virus nucleocapsid protein affect reverse transcription, genomic RNA packaging, and the virus assembly site. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00106–18. [\[CrossRef\]](#)
34. Křížová, I.; Hadravová, R.; Štokrová, J.; Günterová, J.; Doležal, M.; Ruml, T.; Rumlová, M.; Pichová, I. The G-patch domain of Mason-Pfizer monkey virus is a part of reverse transcriptase. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1988. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Strohalmová-Bohmová, K.; Spiwok, V.; Lepšík, M.; Hadravová, R.; Křížová, I.; Ulbrich, P.; Pichová, I.; Bednářová, L.; Ruml, T.; Rumlová, M. Role of Mason-Pfizer monkey virus CA-NC spacer peptide-like domain in assembly of immature particles. *J. Virol.* **2014**, *88*, 14148. [\[CrossRef\]](#)
36. Goud, T.V.; Tutar, A.; Biellmann, J.-F. Synthesis of 8-heteroatom-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes (BODIPY). *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5084–5091. [\[CrossRef\]](#)
37. Kim, D.; Ma, D.; Kim, M.; Jung, Y.; Kim, N.H.; Lee, C.; Cho, S.W.; Park, S.; Huh, Y.; Jung, J.; et al. Fluorescent labeling of protein using blue-emitting 8-amino-BODIPY derivatives. *J. Fluoresc.* **2017**, *27*, 2231–2238. [\[CrossRef\]](#)
38. Chang, Y.-T.; Alamudi, S.H.; Satapathy, R.; Su, D. Background-free fluorescent probes for live cell imaging. US Patent WO2017078623A1, 2017.
39. Qian, K.; Bori, I.D.; Chen, C.-H.; Huang, L.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 90. Novel C-28 modified bevirimat analogues as potent HIV maturation inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8128–8136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Staudinger, H.; Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646. [\[CrossRef\]](#)
41. Neises, B.; Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522–524. [\[CrossRef\]](#)
42. Kotsantis, P.; Silva, L.M.; Irmscher, S.; Jones, R.M.; Folkes, L.; Gromak, N.; Petermann, E. Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Fantin, V.R.; St-Pierre, J.; Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 425–434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

44. Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: Syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10043–10120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelievre, Y.; Gueguen, J.C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; et al. Betulinic acid derivatives: A new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056–1068. [\[CrossRef\]](#)
46. Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L.M.; Chen, C.H.; Garrett, P.E.; Lee, K.H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016–1017. [\[CrossRef\]](#)
47. Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J.C.; Henin, Y.; Bousseau, A.; Huet, T.; Pauwels, R.; DeClercq, E.; Mayaux, J.F.; et al. Betulinic acid derivatives: A new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1069–1083. [\[CrossRef\]](#)
48. Li, F.; Goila-Gaur, R.; Salzwedel, K.; Kilgore, N.R.; Reddick, M.; Matallana, C.; Castillo, A.; Zoumplis, D.; Martin, D.E.; Orenstein, J.M.; et al. PA-457: A potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13555–13560. [\[CrossRef\]](#)
49. Schur, F.K.M.; Obr, M.; Hagen, W.J.H.; Wan, W.; Jakobi, A.J.; Kirkpatrick, J.M.; Sachse, C.; Krausslich, H.G.; Briggs, J.A.G. An atomic model of HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation. *Science* **2016**, *353*, 506–508. [\[CrossRef\]](#)
50. Adamson, C.S.; Sakalian, M.; Salzwedel, K.; Freed, E.O. Polymorphisms in Gag spacer peptide 1 confer varying levels of resistance to the HIV-1 maturation inhibitor bevirimat. *Retrovirology* **2010**, *7*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
51. Lu, W.X.; Salzwedel, K.; Wang, D.; Chakravarty, S.; Freed, E.O.; Wild, C.T.; Li, F. A single polymorphism in HIV-1 subtype C SP1 is sufficient to confer natural resistance to the maturation inhibitor bevirimat. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3324–3329. [\[CrossRef\]](#)
52. Van Baelen, K.; Salzwedel, K.; Rondelez, E.; Van Eygen, V.; De Vos, S.; Verheyen, A.; Steegen, K.; Verlinden, Y.; Allaway, G.P.; Stuyver, L.J. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to the maturation inhibitor bevirimat is modulated by baseline polymorphisms in Gag spacer peptide 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2185–2188. [\[CrossRef\]](#)
53. Coric, P.; Turcaud, S.; Souquet, F.; Briant, L.; Gay, B.; Royer, J.; Chazal, N.; Bouaziz, S. Synthesis and biological evaluation of a new derivative of bevirimat that targets the Gag CA-SP1 cleavage site. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 453–465. [\[CrossRef\]](#)
54. Wang, D.; Lu, W.X.; Li, F. Pharmacological intervention of HIV-1 maturation. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 493–499. [\[CrossRef\]](#)
55. Gu, M.; Zhao, P.; Zhang, S.Y.; Fan, S.J.; Yang, L.; Tong, Q.C.; Ji, G.; Huan, C. Betulinic acid alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated nonalcoholic fatty liver disease through activation of farnesoid X receptors in mice. *Brit. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 847–863. [\[CrossRef\]](#)
56. Ye, Y.Q.; Zhang, T.; Yuan, H.Q.; Li, D.F.; Lou, H.X.; Fan, P.H. Mitochondria-targeted lupane triterpenoid derivatives and their selective apoptosis-inducing anticancer mechanisms. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6353–6363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Dubinin, M.V.; Semenova, A.A.; Ilzorkina, A.I.; Mikhcheva, I.B.; Yashin, V.A.; Penkov, N.V.; Vydrina, V.A.; Ishmuratov, G.Y.; Sharapov, V.A.; Khoroshavina, E.I.; et al. Effect of betulin and betulinic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2020**, *1862*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Dubinin, M.V.; Semenova, A.A.; Nedopekina, D.A.; Davletshin, E.V.; Spivak, A.Y.; Belosludtsev, K.N. Effect of F16-betulin conjugate on mitochondrial membranes and its role in cell death initiation. *Membranes* **2021**, *11*, 352. [\[CrossRef\]](#)
59. Dubinin, M.V.; Semenova, A.A.; Ilzorkina, A.I.; Penkov, N.V.; Nedopekina, D.A.; Sharapov, V.A.; Khoroshavina, E.I.; Davletshin, E.V.; Belosludtseva, N.V.; Spivak, A.Y.; et al. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16. *Free Radic. Bio. Med.* **2021**, *168*, 55–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Wang, X.; Lu, X.C.; Zhu, R.L.; Zhang, K.X.; Li, S.; Chen, Z.J.; Li, L.X. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells via ROS-mediated mitochondrial pathway. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 1130–1140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Cancer Cell Staining

A Synthetic Approach for the Rapid Preparation of BODIPY Conjugates and their use in Imaging of Cellular Drug Uptake and Distribution

Sona Krajčovicová,^[a] Jarmila Stanková,^[a] Petr Dzubač,^[a] Marian Hajdúch,^[a] Miroslav Soral,^{*,[b]} and Milan Urban^{*,[a]}

Abstract: A solid-phase synthetic (SPS) method was developed for the preparation of BODIPY-labeled bioactive compounds that allows for fast and simple synthesis of conju-

gates for use in fluorescent microscopy. The approach was used to visualize cellular uptake and distribution of cytotoxic triterpenes in cancer cells.

Introduction

The visualization of small molecules in cells has become an essential tool in drug discovery. The most commonly used method is fluorescent microscopy, in which the studied molecule is equipped with a fluorescent label that allows direct visualization of the cellular uptake and distribution of the drug within the cell. A number of various conjugates of small molecules with a variety of fluorescent tags have been reported to date, with application as probes,^[1] photosensitizers,^[2] and luminescence switches and sensors.^[3] Among them, BODIPY dyes^[3,4] are commonly used fluorophores because of their superior physicochemical properties such as high photostability, high quantum yield of fluorescence, total neutral charge, and low polarity.^[4] In contrast to other dyes, the wavelengths of absorption and emission can be tuned easily by various substitutions on the BODIPY core.^[4] The simplest BODIPY derivatives show fluorescein-like parameters; however, unlike fluoresceins or rhodamines, they are prone to cellular permeability and lack nonspecific binding to proteins or lipids.^[5] In this work, we designed a versatile solid-phase synthetic (SPS) method for the synthesis of fluorescent conjugates of biologically active molecules. The solid-phase synthesis allows for fast and simple production of libraries of desired compounds with only minimum effort and hands-on-time because it saves many isolation and purification steps of the intermediates. Surprisingly, to our knowledge, there is only one report^[6] that describes the use of

SPS for adding substituents to the BODIPY core. However, there is no precedent for using SPS in the synthesis of conjugates of BODIPY and other molecules. In agreement with this, there are a number of articles stating that BODIPY is incompatible with the SPS concept because of the lack of stability under the standard SPS reaction conditions.^[3,4,7] Regardless of this potential issue, we have been able to develop a versatile procedure for the preparation of such conjugates by using a common backbone amide linker and standard coupling reagents and careful optimization of the reaction time and concentration of harsh reagents such as piperidine and trifluoroacetic acid. BODIPY-FL propanoic acid was selected as the most appropriate fluorescent label in this project. To prove the concept, we have synthesized a small set of BODIPY-labeled cytotoxic triterpenes in which we expected different mechanisms of action and differences in cellular uptake and distribution. The selected compounds (Figure 1) have low micromolar cytotoxicity on various cancer cell lines, whereas some were supposed to have a unique mechanism of action: aldehyde **2**,^[8] monoketone **3**,^[9] diketone **4**,^[9] and pyrazine **5**^[10] (Figure 1). Betulinic acid **1** was used as a standard because it is the most commonly studied cytotoxic triterpene and its mechanism of action has been well-studied.^[11,12]

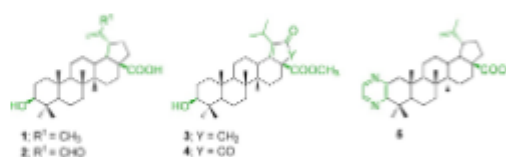


Figure 1. The selected triterpenoid structures.

[a] J. Stanková, Dr. P. Dzubač, Prof. M. Hajdúch, Prof. M. Urban
 Institute of Molecular and Translational Medicine
 Palacký University in Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry
 Hněvotínská 5, 77900, Olomouc (Czech Republic)
 E-mail: milan.urban@upol.cz

[b] S. Krajčovicová, Prof. M. Soral
 Department of Organic Chemistry
 Palacký University in Olomouc, Faculty of Science
 17. Listopadu 12, 77100, Olomouc (Czech Republic)
 E-mail: miroslav.soral@upol.cz

Results and Discussion

Given that the pharmacophores of the selected triterpenes are suggested but yet unproven, chemical modification of some parts of the molecule may negatively influence their biological behavior. Therefore, we decided to attach the fluorescent dye at three different sites and to compare the results. Triterpenes 1–5 were modified in positions C³, C²⁸, or C³⁰ (Figure 2).

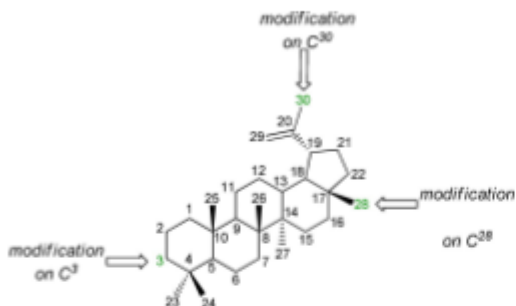
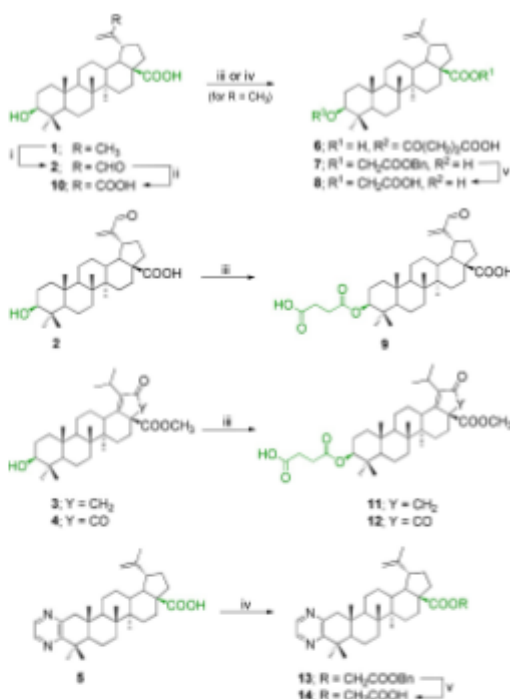


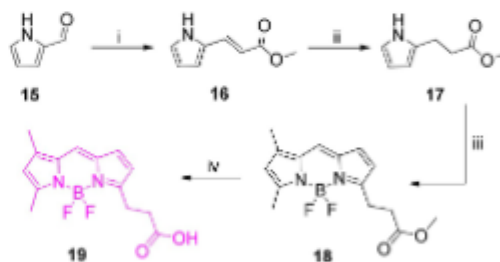
Figure 2. Three sites to attach the fluorescent dye.

The steric hindrance at some of the selected positions required that the original triterpenes had to be premodified by hemisuccinate at C²-OH, glycolate at C²⁸OOH, or oxidized to carboxylate at C³⁰ (Scheme 1, see the experimental part [EP] and the Supporting Information). Briefly, the C³ modified hemisuccinates 6, 11, and 12 were obtained after the reaction of betulinic acid 1, monoketone 3, or diketone 4, with succinic anhydride in the presence of a base. C³ modified hemisuccinic aldehyde 9 was obtained after two-stage oxidation of betulinic acid 1 with selenium dioxide, followed by reaction of aldehyde 2 with succinic anhydride as noted above. C²⁸ modification of compounds 1 and 5 yielded protected glyoxalates 7 and 13, which, upon catalytic hydrogenation in the presence of Pd/C, afforded the desired modified triterpenes 8 and 14, respectively. Finally, compound 10 was obtained after facile and chemoselective Pinnick oxidation of aldehyde 2, which generated the carboxyl at the C³⁰ position.

The synthesis of BODIPY-FL propanoic acid had to be optimized (Scheme 2, see the EP and the Supporting Information) to obtain better yields than those previously reported.^[13,14] Although BODIPY-FL propanoic acid 19 (Scheme 2) is commercially available, its extremely high price led us to synthesize the dye by ourselves. The reported syntheses^[13,14] had to be slightly modified and optimized to increase the overall yield. It started from commercially available pyrrole-2-carbaldehyde 15, which was first converted into α,β -unsaturated ester 16 through Horner–Wadsworth–Emmons reaction with excellent selectivity, yielding only (*E*)-alkene. Such high selectivity was achieved because of the formation of a stabilized ylide. The following reduction provided intermediate 17, which was then subjected to POCl₃-promoted coupling with commercially available 3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde. Final treat-

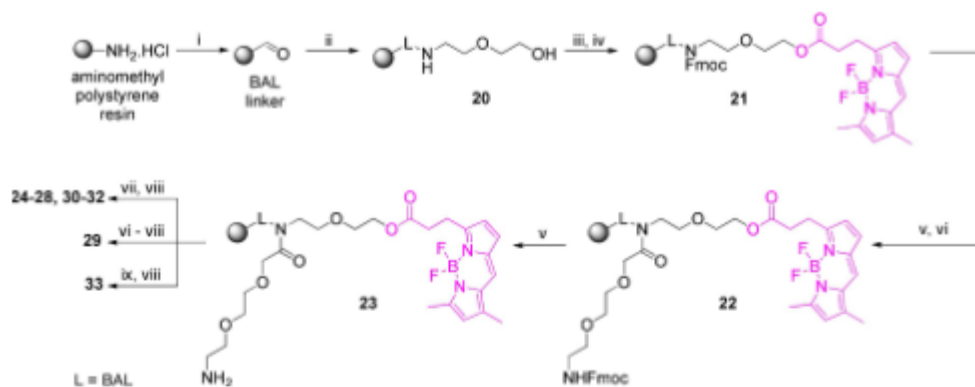


Scheme 1. Synthesis of premodified triterpenes. Reagents and conditions: i) SeO₂, diglyme, 140 °C; ii) KH₂PO₄, NaClO₂, tBuOH/2-methyl-2-butene (1:1), RT (10; 90%); iii) succinic anhydride, DMAP, THF/DMF (2:1), 80 °C (6; 80%, 9; 73%, 11; 73%); iv) benzylbromoacetate, K₂CO₃, THF, 50 °C (7; 98%, 13; 91%); v) Pd/C, H₂, CH₃OH, RT (8; 84%, 14; 49%).



Scheme 2. The synthetic route for the preparation of BODIPY-FL propanoic acid 19. Reagents and conditions: i) methyl(triphenylphosphoranylidene)acetate, CH₂Cl₂, RT, 84%; ii) Pd/C, H₂, CH₃OH, RT, 90%; iii) a) 3,5-dimethylpyrrole-2-carbaldehyde, POCl₃, CH₂Cl₂, 0 °C to RT, b) BF₃·OEt₂, DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C to RT, 63%; iv) THF/H₂O/conc. HCl (3:2:1), 0 °C to RT, 85%.

ment with BF₃·OEt₂ yielded BODIPY-FL propanoate 18 in a one-pot reaction sequence (Scheme 2). Subsequent acidic hydrolysis of the ester yielded the final BODIPY-FL propanoic acid 19 in excellent overall yield of 40% (Scheme 2), indicating an unusually long kinetic stability of BODIPY dye in acidic media.^[15] Importantly, the improved synthesis of BODIPY-FL propanoic



Scheme 3. Synthesis of BODIPY-preloaded resin and its use for conjugation with triterpenes. Reagents and conditions: i) BAL, HOBT, DIC, DMF/ CH_2Cl_2 (1:1), RT; ii) 2-(2-aminoethoxy)ethanol, $\text{NaBH}(\text{OAc})_2$, DMF/ AcOH (10:1), RT; iii) Fmoc-Osu, CH_2Cl_2 , RT; iv) 19, HOBT, DIC, DMF/ CH_2Cl_2 (1:1); v) DMF/piperidine (20:1), RT; vi) FAEAA, DIC, HOBT, DMF/ CH_2Cl_2 (1:1), RT; vii) 6, 8, 12, 14, DIC, DMF/ CH_2Cl_2 (1:1), RT; viii) CH_2Cl_2 /TFA (10:1), RT; ix) Ac_2O , DMAP, CH_2Cl_2 , RT

acid is scalable up to gram-scale quantities, which addresses the most common problem in the synthesis of BODIPY dyes.

In contrast to the synthesis of biotin-preloaded resins,^{116,171} the procedure for the preparation of BODIPY-preloaded resin 23 had to be carefully optimized because of the limited chemical stability of BODIPY-FL. The aminomethyl resin was equipped with a backbone amide linker (BAL) and subjected to reductive amination with 2-(2-aminoethoxy)ethanol to obtain immobilized secondary amine 20 (Scheme 3). Chemoselective protection of the secondary amine with Fmoc was followed by acylation of the hydroxy group with prepared BODIPY-FL propanoic acid 19 to afford resin 21. Cleavage of the Fmoc-protective group and acylation with [2-(2-(Fmoc-amino)ethoxy)ethoxy]acetic (FAEEAA) acid by using the standard DIC/HOBT (1,3-diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole) technique yielded Fmoc-protected resin 22, which, upon deprotection with low concentration of piperidine in DMF, yielded the desired preloaded resin 23 in very good crude purity (82%; calculated from UHPLC-MS traces). Subsequent acylation with the premodified triterpenes 6, 8–12, and 14 afforded the final conjugates 24–28, 30, and 31 (Scheme 3).

Compound 29, containing an extended linker, was prepared to investigate the influence of the length of the linker on the cellular uptake and distribution, and compound 33 was designed to show the properties of the BODIPY-FL connected to linker without a triterpene. In contrast to the construction of intermediate 23, omitting HOBT in the final acylation with triterpenes (Scheme 3, step vii) increased the final crude purities of all conjugates significantly. Additionally, TFA-mediated cleavage of conjugate 24 from the resin led to the formation of by-product 32 in equimolar ratio (calculated from UHPLC-MS traces) as a result of Wagner–Meerwein rearrangement.¹⁷² It is important to mention that the concentration of both piperidine and TFA had to be considerably lowered compared with standard cleavage conditions (20–50% piperidine in DMF; 25–50% TFA in CH_2Cl_2) to maintain good crude purities of all inter-

mediates as well as final conjugates and to prevent decomposition of the BODIPY scaffold (see the Supporting Information for details).

The excitation and emission spectra of BODIPY-FL propanoic acid 19 were measured and compared to BODIPY conjugates 24–33 (Figure 3). All of the conjugates 24–33 had the same absorption/emission wavelengths and Stokes shifts as the parent BODIPY-FL propanoic acid (see the Supporting Information for details). The quantum yields of fluorescence of the conjugates are lower than those of BODIPY-FL propanoic acid ($\Phi = 98$ for 19 vs. $\Phi = 0.14$ – 0.30 for compounds 24–32). The diminished fluorescence is probably caused by the static quenching between BODIPY dye and triterpenes, which is consistent with recently published data.^{119,201}

The cytotoxic activity of the parent compounds and fluorescent conjugates was investigated *in vitro* against eight human cancer cell lines and two non-tumor fibroblasts by using the standard MTS test (Table 1). The cancer cell lines were derived from T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM, leukemia K562 and their multiresistant counterparts (CEM-DNR, K562-TAX), solid tumors including lung (A549) and colon (HCT116, HCT116p53^{-/-}) carcinomas, osteosarcoma cell line (U2OS), and, for comparison, on two human non-cancer fibroblast lines (BJ, MRC-5). In general, the CCRF-CEM cell line was the most sensitive cancer cell line to the prepared compounds, with only a few exceptions. Therefore, SARs assumptions were mostly based on the activities in CCRF-CEM cells.

Among the unmodified studied molecules 1–5, aldehyde 2 and pyrazine 5 were cytotoxic against the CCRF-CEM line in the low micromolar range of 1.53 and 0.53 μM , respectively. The therapeutic index is rather low for aldehyde 2 (4.7) but surprisingly high in the case of pyrazine (more than 94). The synthesized fluorescent conjugate of aldehyde 2 remained highly but unselectively cytotoxic, probably due to the presence of the reactive acrolein moiety. On the other hand, fluorescent conjugates of pyrazine (28 and 29) had slightly de-

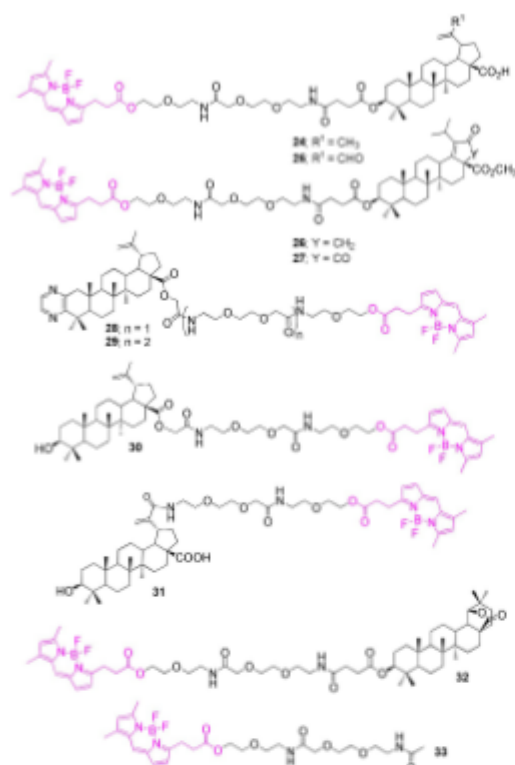


Figure 3. Structures of prepared conjugates 24–33. Compound 32 formed as a byproduct and was not further studied because it lacked cytotoxic activity.

creased activity and selectivity in comparison with the parent compound **5**, which indicates an important role of the free carboxyl group as a pharmacophore. Interestingly, the length of the linker also affects the activity of the conjugates. This may be indicated by the comparison of conjugates **28** and **29** from which the longer derivative (**29**) was more active than the shorter one (**28**). Lastly, the conjugate of diketone **27** was cytotoxic only on CCRF-CEM cell line, whereas the monoketone conjugate **26** completely lost both its cytotoxic activity and selectivity. The conjugate of betulinic acid **24** at the position C³ remained active, although its conjugates at positions C²⁸ and C³⁰ (compounds **30** and **31**) were almost inactive.

In fluorescent microscopy experiments (which were performed in early intervals before the cytotoxic effect took place), we observed that all the tested fluorescent conjugates of triterpenes stain living cells and pass through the cellular membrane into the cytoplasmic compartment (Figure 4, full resolution image is in the Supporting Information). In addition, we used BODIPY conjugate **33** (which has the active triterpenic scaffold replaced by acetate) as a negative control. According to the results, this compound does not penetrate the cellular membrane, indicating that it is the triterpenoid part that is responsible for the cellular uptake. This is likely because of the high lipophilicity of triterpenes. Conjugate **25**, containing a Michael acceptor (acrolein moiety in this case), resulted in a different staining pattern—labeling cellular cytoplasm homogeneously, which is presumably caused by nonspecific covalent interaction with multiple intracellular proteins. Staining is distinct when compared to other tested compounds (**24**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**), which labeled more subtle cytoplasmic and membrane structures, likely mitochondria, endoplasmic reticulum (ER), and the nuclear membrane. Co-staining experiments are being performed to confirm this unambiguously. Such results are in agreement with precedent studies on another lupane triterpenes that were found to interact with mitochondrion and ER.^[21,22]

Table 1. Cytotoxic activity of the prepared compounds.

Comp.	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116p53 ^{-/-}	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) ^[a]		AS49	U2OS	BJ	MRC-5	TI ^[b]
					KS62	KS62-TAX					
1 ^[c]	8.09	14.04	4.29	14.09	9.43	15.78	15.96	20.75	24.23	28.18	3.24
2 ^[c]	1.53	7.66	8.83	12.43	9.68	7.73	7.23	7.51	11.99	2.39	4.70
3 ^[c]	15.16	20.16	27.25	34.67	21.01	24.25	27.12	40.06	44.28	42.67	2.87
4 ^[c]	35.58	35.98	> 50	43.11	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 1.41
5 ^[c]	0.53	0.63	11.54	11.6	31.84	34.41	47.3	32.43	> 50	> 50	> 94.34
24	6.62	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	33.75	43.61	43.6	6.59
25	0.76	6.06	1.65	10.52	1.96	1.6	1.45	1.46	1.87	1.62	2.30
26	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	N.A.
27	3.4	> 50	45.7	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	45.84	44.26	13.25
28	18.09	20.28	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 2.76
29	6.13	9.27	18.92	12.07	29.02	35.05	29.14	26.34	39.74	38.23	6.36
30	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	N.A.
31	41.17	40.68	41.96	> 50	49.02	40.6	41.43	45.02	48.81	40.75	1.09
32	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	N.A.
33	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	N.A.

[a] The lowest concentration that kills 50% of the cells. The standard deviation in cytotoxicity assays is typically up to 15% of the average value. [b] Therapeutic index is calculated for IC₅₀ of CCRF-CEM line vs. an average of both fibroblasts (BJ and MRC-5). [c] Parent compounds used as a standard. Compounds with IC₅₀ > 50 μM are considered inactive.

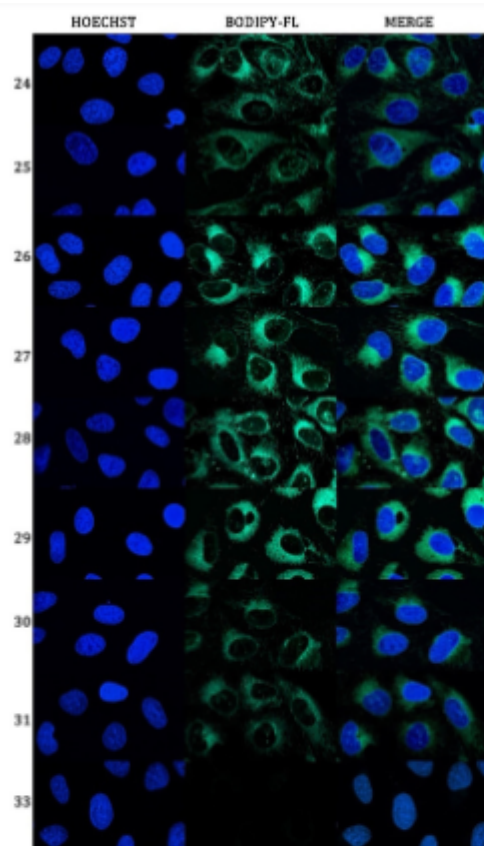


Figure 4. Fluorescence imaging of U2OS cells stained by BODIPY triterpene conjugates (for full resolution see the Supporting Information).

Conclusion

We optimized the synthesis of BODIPY-FL propanoic acid **19** to give better yields than procedures reported by other authors, and the synthesis is suitable for multigram scale quantities. We prepared BODIPY-preloaded resin and applied it to attach the fluorescent dye to cytotoxic triterpene derivatives. Despite previous reports on the limited applicability of BODIPYs in solid-phase synthesis, because of their low stability under both basic and acidic conditions,^[14,7] we developed and optimized synthetic protocols to overcome these problems. The reported preloaded resin allows for routine and simple connection of various compounds to BODIPY label through a linker of choice using simple laboratory equipment, common coupling reagents and conditions, and minimum hands-on-time, and it can even be commercialized similar to biotin-preloaded resin (Biotin NovaTag™, Novabiochem). Nine conjugates of BODIPY with cytotoxic triterpenes were synthesized using resin **23** and their spectroscopic and biological properties were evaluated.

To prove that BODIPY with the linker do not interfere with the biological study, we prepared a conjugate in which the triterpene part was replaced with acetate. Live cell studies focused on fluorescence conjugate uptake demonstrated nonspecific labeling in aldehyde **25** and a more specific labeling pattern in the case of conjugates **24** and **26–31**. Ongoing research is now focused on a more specific determination of which organelles, proteins or protein complexes are targeted by our conjugates, and this will be the aim of further proteomic and molecular biology studies, for example, co-localization experiments.

Experimental Section

General technical information is available in the Supporting Information and is analogous to our previous publications.^[23,24] Note that the yields of the final conjugates (**24–33**, usually between 10–30%) are calculated as overall yields of the entire synthetic procedure between compound **20** and the final product in Scheme 3.

General procedure for the preparation of benzyl glyoxalates: To a stirred solution of starting material in THF were added benzyl bromoacetate (3 equiv) and K_2CO_3 (3 equiv). The reaction mixture was stirred at 50 °C and the progress of the reaction was monitored by TLC (hexane/EtOAc = 3:1, v/v) which indicated its completion after overnight stirring. The reaction mixture was concentrated, diluted with water (100 mL/1.32 mmol) and extracted with EtOAc (5 × 100 mL/1.32 mmol). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified by flash chromatography (hexane/EtOAc = 3:1 to 1:1, v/v) to give the desired compounds.

2-(Benzyloxy)-2-oxoethyl betulinate (7): Compound **7** was prepared by following General Procedure A with **1** (600 mg, 1.32 mmol), benzyl bromoacetate (633 μ L, 4 mmol), and K_2CO_3 (552 mg, 4 mmol) in THF (20 mL); Yield: 783 mg (98%); white solid; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.38–7.35 (m, 5H; Ph), 5.22 (d, J = 6.5 Hz, 1H; OCH_2Ph), 5.18 (d, J = 12.3 Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.73 (d, J = 2.0 Hz, 1H; H^{20}_{pro-C}), 4.65 (d, J = 2.3 Hz, 2H; OCH_2CO_2), 4.61–4.60 (m, 1H; H^{20}_{pro-C}), 3.21–3.17 (dd, J = 11.0, 4.8 Hz, 1H; H^{18}), 2.97 (td, J = 11.3, 10.9, 4.7 Hz, 1H; H^{18}), 2.30 (dt, J = 12.6, 2.7 Hz, 1H), 2.27 (td, J = 13.5, 13.4, 3.6 Hz, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.96–1.86 (m, 1H), 1.72–1.13 (m, 24H; overlap with solvent), 0.97 (s, 6H; $2 \times CH_3$), 0.92 (s, 3H; CH_3), 0.83 (s, 3H; CH_3), 0.77 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.6, 168.1, 150.7, 135.4, 128.8, 128.6, 109.8, 79.2, 67.2, 60.4, 56.7, 55.6, 50.8, 49.6, 47.0, 42.6, 40.9, 39.0, 38.9, 38.3, 37.4, 37.1, 34.5, 32.1, 30.6, 29.8, 28.2, 27.6, 25.8, 21.1, 19.6, 18.5, 16.3, 16.1, 15.5, 14.9 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{39}H_{56}O_5$, 605.4201 [$M+H$]⁺; found: 605.4207.

Benzyl glyoxalate of betulinic acid pyrazine (13): Compound **13** was prepared by following General Procedure A with **5** (100 mg, 0.2 mmol), benzyl bromoacetate (96 μ L, 0.61 mmol), and K_2CO_3 (84 mg, 0.61 mmol) in THF (8 mL). Yield: 116 mg (91%); yellowish oil; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.30 (d, J = 2.1 Hz, 1H; pyrazine), 8.17 (d, J = 2.4 Hz, 1H; pyrazine), 7.33–7.24 (m, 5H; Ph, overlap with solvent), 5.14–5.06 (m, 2H; OCH_2Ph), 4.66–4.54 (m, 4H), 2.96–2.86 (m, 3H), 2.37–2.21 (m, 4H), 1.96–1.91 (m, 1H), 1.86–1.80 (m, 1H), 1.70–1.22 (m, 17H; overlap with solvent), 1.20 (s, 3H; CH_3), 1.18 (s, 3H; CH_3), 0.92–0.90 (m, 6H; $2 \times CH_3$), 0.70 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.5, 168.1, 159.8, 151.0, 150.5, 142.4, 141.6, 135.3, 128.8, 128.7, 128.6, 109.9, 67.2, 60.4, 56.7, 53.2, 49.5, 49.0, 48.9, 46.9, 42.6, 40.7, 39.6, 38.3, 37.1, 36.9, 33.4, 32.0, 31.7, 30.6, 29.7, 25.7, 24.2, 21.6, 20.2, 19.6, 16.3, 15.7, 14.8 ppm;

HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{41}H_{34}N_2O_4$: 639.4156 $[M+H]^+$; found: 639.4155.

3 β -Hydroxyup-20(29)-ene-28,30-dioic acid (10): To a stirred solution of aldehyde **2** (100 mg, 0.21 mmol) in *t*BuOH/2-methyl-2-butene (1:1, 10 mL, v/v) was added NaClO₂ (96 mg, 1.06 mmol) and a solution of KH₂PO₄ (550 mg, 4.04 mmol) in H₂O (5 mL). The reaction mixture was stirred vigorously at ambient temperature and the progress of the reaction was monitored by TLC (CH₂Cl₂/CH₃OH = 10:1, v/v), which indicated its completion after 5 h. The reaction mixture was concentrated, diluted with NH₄Cl (50 mL), and extracted with EtOAc (5 $\times$ 50 mL). Organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/CH₃OH = 5:1, v/v) to afford compound **10**. Yield: 90 mg (90%); white crystalline solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.17 (br s, 2H; 2 $\times$ COOH), 5.96 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 5.60 (s, 1H; H²⁹ μ -²),

4.25 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.08–4.07 (m, 1H), 2.98–2.94 (m, 1H), 2.22–2.07 (m, 3H), 1.99–1.91 (m, 1H), 1.82–1.75 (m, 2H), 1.62–1.52 (m, 2H), 1.43–1.24 (m, 16H), 0.90 (s, 3H; CH₃), 0.87 (s, 3H; CH₃), 0.86 (s, 3H; CH₃), 0.76 (s, 3H; CH₃), 0.65 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 177.2, 168.4, 147.7, 122.5, 76.7, 55.5, 54.8, 51.05, 49.8, 48.6, 41.9, 38.5, 38.2, 37.3, 36.7, 36.0, 33.9, 32.7, 31.6, 29.2, 28.1, 27.1, 26.8, 20.5, 17.9, 15.9, 15.8, 15.7, 14.3 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{30}H_{40}O_5$: 485.3262 $[M-H]^-$; found: 485.3252.

General procedure B for preparation of hemisuccinates: To a stirred solution of starting material in THF/DMF (2:1) was added succinic anhydride (6 equiv) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 6 equiv). The reaction mixture was stirred at 80 °C and the progress of the reaction was monitored by TLC (CH₂Cl₂/CH₃OH = 10:1, v/v), which indicated its completion after 36 to 48 h. The reaction mixture was concentrated, diluted with NH₄Cl (150 mL/2.2 mmol) and extracted with EtOAc (5 $\times$ 100 mL/2.2 mmol). Organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/CH₃OH = 10:1, v/v) to afford the desired compounds.

Betulinic acid 3-hemisuccinate (6): Compound **6** was prepared by following General Procedure B with **1** (1 g, 2.2 mmol), succinic anhydride (1.32 g, 13.1 mmol), and DMAP (1.6 g, 13.1 mmol) in THF/DMF (2:1, 60 mL) for 36 h. Yield: 980 mg (80%); white solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.14 (br s, 2H; 2 $\times$ COOH), 4.69 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 4.56 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 4.37 (dd, J = 11.7, 4.6 Hz, 1H; H¹⁴), 2.97–2.92 (m, 1H; H¹⁶), 2.54–2.46 (m, 4H; overlap with solvent), 2.25–2.18 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.64 (s, 3H; CH₃), 1.62–1.07 (m, 12H), 0.94 (s, 3H; CH₃), 0.87 (s, 3H; CH₃), 0.80 (s, 3H; CH₃), 0.78 ppm (s, 6H; 2 $\times$ CH₃). All other data were consistent with published results.¹⁰

30-Aldehyde 3-hemisuccinate of betulinic acid (9): Compound **9** was prepared by following General Procedure B with **2** (1.5 g, 3.13 mmol), succinic anhydride (1.88 g, 18.78 mmol), and DMAP (2.3 g, 18.78 mmol) in THF/DMF (2:1, 30 mL) for 48 h. Yield: 1.3 g (73%); white solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.14 (br s, 2H; 2 $\times$ COOH), 9.49 (s, 1H; CHO), 6.47 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 6.09 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 4.37 (dd, J = 11.3, 4.6 Hz, 1H; H¹⁴), 3.25 (dd, J = 11.1, 4.8 Hz, 1H), 3.19 (d, J = 21.6 Hz, 2H), 2.52–2.46 (m, 4H), 2.20–2.12 (m, 2H), 1.97–1.89 (m, 1H), 1.81–1.77 (m, 2H), 1.58–1.11 (m, 17H), 0.91 (d, J = 7.2 Hz, 3H; CH₃), 0.86 (s, 3H; CH₃), 0.78 ppm (d, J = 3.6 Hz, 9H; 3 $\times$ CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 195.6, 177.1, 175.0, 173.4, 171.6, 170.3, 156.3, 134.8, 79.9, 55.5, 54.6, 49.4, 41.9, 37.7, 37.4, 36.6, 36.1, 33.7, 31.6, 31.4, 29.2, 28.8, 27.6, 26.8, 23.3, 20.7, 20.5, 17.7, 16.4, 15.8, 15.6, 14.3, 14.1 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{34}H_{42}O_5$: 569.3473 $[M-H]^-$; found: 569.3456.

Hemisuccinate of 21-oxoacid (11): Compound **11** was prepared by following General Procedure B with **3** (700 mg, 1.45 mmol), succinic anhydride (867 mg, 8.68 mmol), and DMAP (1.05 g, 8.68 mmol) in THF/DMF (2:1, 15 mL) for 40 h. Yield: 1.3 g (73%); white solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 4.51 (dd, J = 11.0, 5.5 Hz, 1H; H¹⁴), 3.69 (s, 3H; COOCH₃), 3.22–3.16 (m, 1H), 2.70–2.60 (m, 4H), 2.49–2.43 (m, 2H), 2.13 (d, J = 18.6 Hz, 1H), 2.00 (dd, J = 12.5, 3.0 Hz, 1H), 1.92–1.23 (m, 9H; overlap with solvent), 1.21 (app s, 3H; CH₃), 1.20 (app s, 3H; CH₃), 1.02 (s, 3H; CH₃), 0.93 (s, 3H; CH₃), 0.90 (s, 3H; CH₃), 0.84 (s, 3H; CH₃), 0.83 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 207.5, 177.7, 175.1, 172.1, 172.0, 145.9, 81.5, 55.6, 53.3, 52.7, 51.2, 47.8, 45.4, 41.5, 38.7, 38.0, 37.3, 35.0, 33.9, 29.5, 29.3, 29.2, 28.1, 27.8, 25.3, 23.7, 21.4, 20.3, 20.2, 18.3, 17.0, 16.8, 16.7, 16.1 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd $C_{26}H_{32}O_7$: 585.3786 $[M+H]^+$; found: 585.3796.

Hemisuccinate of 21,22-dioxoacid (12): Compound **12** was prepared by following a previously published procedure.²¹ ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.20 (br s, 1H; COOH), 4.40 (dd, J = 11.6, 4.7 Hz, 1H; H¹⁴), 3.66 (s, 3H; COOCH₃), 3.37–3.30 (m, 1H; overlap with solvent), 2.72–2.69 (m, 1H), 2.52–2.44 (m, 4H; overlap with solvent), 2.25–2.22 (m, 1H), 1.97–1.87 (m, 3H), 1.74–1.31 (m, 14H), 1.19 (d, J = 3.5 Hz, 3H; CH₃), 1.18 (d, J = 3.5 Hz, 3H; CH₃), 1.00 (s, 3H; CH₃), 0.95 (s, 3H; CH₃), 0.86 (s, 3H; CH₃), 0.80 (s, 3H; CH₃), 0.79 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 194.4, 189.0, 173.4, 171.6, 170.5, 168.0, 149.2, 79.9, 58.1, 54.5, 53.5, 49.8, 45.6, 45.3, 41.0, 37.7, 37.4, 36.6, 33.9, 29.1, 28.7, 27.8, 27.5, 27.3, 26.4, 25.2, 23.3, 20.5, 19.9, 19.4, 17.7, 16.5, 16.4, 16.3, 15.6 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{26}H_{30}O_8$: 597.3422 $[M-H]^-$; found: 597.3408.

General procedure C for preparation of glyoxalates: To a freshly degassed solution of starting material in CH₂Cl₂/CH₃OH (2:1) was added Pd/C (10%, 3.5 mol %) and H₂ was bubbled through the resulting reaction mixture for 20 min. The reaction was monitored by TLC (CH₂Cl₂/CH₃OH/AcOH = 10:1:0.1, v/v), which indicated its completion after 1 h. The reaction mixture was diluted with CH₃OH (20 mL/0.83 mmol) and filtered through a bed of Celite. The residual solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/CH₃OH/AcOH 10:1:0.1, v/v).

Betulinic acid glyoxalate (8): Compound **8** was prepared by following General Procedure C with **7** (500 mg, 0.83 mmol), Pd/C (30 mg) in CH₂Cl₂/CH₃OH (2:1, 7.5 mL). Yield: 357 mg (84%); white solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.91 (br s, 1H; COOH), 4.65 (d, J = 2.0 Hz, 1H; H²⁹ μ -²), 4.53 (s, 1H; H²⁹ μ -²), 4.50 (app s, 2H, OCH₂CO), 4.21 (br s, 1H; H¹⁴), 2.94 (m, 1H), 2.90–2.84 (m, 1H), 2.18–2.13 (m, 2H), 1.92–1.86 (m, 1H), 1.83–1.75 (m, 1H), 1.62 (s, 3H; CH₃), 1.58–1.01 (m, 20H), 0.90 (s, 3H; CH₃), 0.84 (s, 3H; CH₃), 0.82 (s, 3H; CH₃), 0.72 (s, 3H; CH₃), 0.62 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, [D₆]DMSO): δ = 174.6, 169.3, 150.1, 109.7, 76.7, 60.3, 55.7, 54.8, 49.9, 48.6, 46.5, 42.0, 38.5, 38.2, 37.4, 36.7, 36.2, 33.9, 31.3, 29.8, 28.9, 28.1, 27.1, 25.0, 20.4, 18.9, 17.9, 15.9, 15.8, 15.7, 14.3 ppm; HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{32}H_{42}O_5$: 513.3575 $[M-H]^-$; found: 513.3567.

Glyoxalate of pyrazine of betulinic acid (14): Compound **14** was prepared by following General Procedure C with **13** (500 mg, 0.78 mmol) and Pd/C (27 mg) in CH₂Cl₂/CH₃OH (2:1, 7.5 mL). Yield: 210 mg (49%); white solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.45 (d, J = 2.3 Hz, 1H; pyrazine), 8.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H; pyrazine), 4.71 (d, J = 1.9 Hz, 1H; H²⁹ μ -²), 4.59 (app s, 1H; H²⁹ μ -²), 4.55 (app s, 2H; OCH₂CO), 2.92 (td, J = 11.2, 10.9, 4.7 Hz, 1H; H¹⁴), 2.88 (d, J = 16.6 Hz, 1H; H¹⁴), 2.46 (d, J = 16.6 Hz, 1H; H¹⁶), 2.28–2.20 (m, 2H), 1.93 (dd, J = 11.9, 8.1 Hz, 1H), 1.87–1.79 (m, 1H), 1.67 (s, 3H; CH₃), 1.67–1.28 (m, 15H), 1.24 (s, 3H; CH₃), 1.20 (s, 3H; CH₃), 1.17–1.05

(m, 2H), 1.00 (s, 3H; CH₃), 0.93 (s, 3H; CH₃), 0.72 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 174.7, 169.3, 158.5, 150.2, 150.1, 142.3, 141.7, 109.8, 60.2, 55.8, 52.0, 48.1, 47.8, 46.5, 42.1, 37.5, 36.2, 32.8, 31.3, 29.8, 29.0, 25.1, 24.0, 21.0, 19.5, 18.9, 15.8, 15.2, 14.4 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₄H₄₆N₂O₄: 547.3530 [M-H]⁺; found: 547.3527.

Methyl (E)-3-(1H-pyrrol-2-yl)acrylate (16): To a stirred solution of pyrrole-2-carbaldehyde **15** (1.5 g, 15.78 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) was added methyl (triphenylphosphoranylidene)acetate (10.5 g, 31.57 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The residual solvent was evaporated and the crude oily product was purified by flash chromatography (hexane/EtOAc = 2:1, v/v) to afford compound **16**. Yield: 2 g (84%); pale-pink solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.65 (br s, 1H), 7.56 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.94–6.93 (m, 1H), 6.58–6.57 (m, 1H), 6.31–6.28 (m, 1H), 6.00 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.78 ppm (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 168.2, 134.5, 128.5, 122.6, 114.7, 111.2, 111.0, 51.8 ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₉H₁₁NO₂: 152.0706 [M+H]⁺; found: 152.0705.

Methyl 3-(1H-pyrrol-2-yl)propanoate (17): To a freshly degassed solution of **16** (2 g, 13.25 mmol) in CH₃OH (20 mL) was added Pd/C (10% loading, 3.5 mol%, 500 mg) and H₂ was bubbled through the resulting reaction mixture for 20 min. The reaction was monitored with UHPLC-MS, which indicated its completion after 1 h. The reaction mixture was diluted with CH₃OH (20 mL) and filtered through a bed of Celite. The residual solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (hexane/EtOAc = 2:1, v/v) to afford **17**. Yield: 1.67 g (90%); pale-yellow oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.51 (br s, 1H), 6.69–6.67 (m, 1H), 6.11 (dd, *J* = 5.7, 2.8 Hz, 1H), 5.92–5.91 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.92 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.65 ppm (t, *J* = 6.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 174.7, 131.1, 117.0, 108.2, 105.7, 52.0, 34.5, 22.7 ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₉H₁₁NO₂: 154.0863 [M+H]⁺; found: 154.0863.

BODIPY-FL-methyl propanoate (18): To a stirred solution of **17** (1.67 g, 10.92 mmol) and 3,5-dimethylpyrrole-2-carboxaldehyde (1.54 g, 12.01 mmol) in CH₂Cl₂ (80 mL) was added dropwise POCl₃ (1.12 mL, 12.01 mmol) at 0 °C and the reaction mixture was allowed to warm to ambient temperature. The reaction was monitored with UHPLC-MS, which indicated formation of dipyrromethane intermediate after 3 h. The reaction mixture was then cooled to 0 °C and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 8.1 mL, 49.14 mmol) was added dropwise, followed by stirring for 20 min at 0 °C. BF₃·OEt₂ (5.4 mL, 43.68 mmol) was added subsequently and the reaction was stirred overnight at ambient temperature. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and brine (100 mL), filtered through a bed of Celite, again diluted with brine (100 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (5 × 200 mL). Organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (100% CH₂Cl₂) to give **18**. Yield: 2.13 g (63%); dark-green crystalline solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.09 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.26 ppm (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 173.2, 160.8, 144.1, 135.5, 133.5, 128.3, 124.1, 120.7, 116.9, 52.0, 33.5, 30.0, 24.3, 15.2, 11.5 ppm; ¹⁹F {¹H} NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = −145.23 (d, *J* = 31.4 Hz), −145.37 ppm (d, *J* = 31.4 Hz); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₉H₁₇BF₂N₃O₂: 305.1267 [M-H]⁺; found: 305.1266. Other spectral data were consistent with literature precedences.^[8]

BODIPY-FL-propanoic acid (19): To a stirred solution of **18** (1.43 g, 4.67 mmol) in THF (30 mL) was added water (20 mL) and conc. HCl (10 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at ambient temperature and monitored by UHPLC-MS, which indicated its comple-

tion after 52 h. The reaction mixture was diluted with water (100 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 150 mL). Organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification of the crude product by flash chromatography (CH₂Cl₂/AcOH 100:1, v/v) afforded **19**. Yield: 1.15 g (85%); dark-red crystalline solid; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.30 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.10–3.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.26 ppm (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 173.4, 159.5, 156.9, 144.3, 134.5, 133.0, 128.8, 125.4, 120.4, 116.5, 32.3, 23.5, 14.5, 11.0 ppm; ¹⁹F {¹H} NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = −145.21 (d, *J* = 31.8 Hz), −145.36 ppm (d, *J* = 31.8 Hz); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₄H₁₃BF₂N₃O₂: 291.1111 [M-H]⁺; found: 291.1105. Other spectral data were consistent with published results.^[8]

Preparation of BAL resin: Aminomethyl polystyrene resin (1 g, loading 0.98 mmol/g) was swollen in CH₂Cl₂ (10 mL) for 30 min, washed with DMF (3 × 10 mL), neutralized in DMF/piperidine (5:1, 10 mL) for additional 30 min and again washed with DMF (5 × 10 mL). Backbone amide linker (700 mg, 2.94 mmol) and HOBt (450 mg, 2.9 mmol) were dissolved in DMF/CH₂Cl₂ (1:1, 10 mL, v/v) and DIC (460 Hz, 2.94 mmol) was added. The resulting solution was added to a polypropylene syringe with aminomethyl resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with DMF (3 × 10 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). Bromphenol blue test confirmed quantitative acylation of the amino groups.

Procedure for reductive amination: BAL resin (1 g, loading 0.98 mmol/g) was swollen in CH₂Cl₂ (10 mL) for 30 min, then washed with anhydrous THF (3 × 10 mL) and anhydrous DMF (3 × 10 mL). The solution of 2-(2-aminoethoxy)ethanol (490 μL, 4.9 mmol) in DMF/ACOH (10:1, 10 mL, v/v) was added to a polypropylene fritted syringe with BAL resin and it was shaken overnight at ambient temperature. NaBH(OAc)₃ (210 mg, 2.94 mmol) in DMF/ACOH (20:1, 5 mL, v/v) was then added portionwise to the reaction mixture during period of 4 h, followed by washing with DMF (5 × 10 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) and neutralization with DMF/TEA (10:1, 10 mL, v/v) for an additional 30 min to obtain resin **20**. The loading was determined according to a published procedure^[9] (0.4–0.6 mmol/g).

Procedure for protection with Fmoc: Resin **20** (250 mg) was swollen in CH₂Cl₂ (3 mL) for 30 min and then washed with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). Fmoc-OSu (505 mg, 1.5 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (3 mL) and added to a polypropylene fritted syringe with the resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with CH₂Cl₂ (5 × 5 mL). An analytical sample was cleaved from the resin and UHPLC-MS analysis confirmed the presence of desired product. MS (ESI): *m/z* 328 [M+H]⁺.

Procedure for acylation with BODIPY-FL propanoic acid: Resin **20** equipped with Fmoc (250 mg) was swollen in CH₂Cl₂ (3 mL) for 30 min and then washed with DMF (3 × 3 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 3 mL). BODIPY-FL propanoic acid **19** (220 mg, 0.75 mmol), HOBt (115 mg, 0.75 mmol) and DMAP (92 mg, 0.75 mmol) were dissolved in DMF/CH₂Cl₂ (1:1, 2.5 mL, v/v) and DIC (117 μL, 0.75 mmol) was added. The resulting solution was added to a polypropylene fritted syringe with the resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with DMF (10 × 3 mL) and CH₂Cl₂ (10 × 3 mL) to give resin **21**. An analytical sample was cleaved from the resin and UHPLC-MS analysis confirmed the presence of desired product. MS (ESI): *m/z* 600 [M-H]⁺.

General procedure D for deprotection of Fmoc: Resin **21** (250 mg) was swollen in CH₂Cl₂ (3 mL) for 30 min and then washed with DMF (3 × 3 mL). The freshly prepared solution of DMF/piperi-

dine (20:1, 2.5 mL, v/v) was added to polypropylene fritted syringe with the resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature for 30 min, followed by washing with CH_2Cl_2 (3 $\times$ 3 mL), THF (3 $\times$ 3 mL), DMF (3 $\times$ 3 mL), THF (3 $\times$ 3 mL), and CH_2Cl_2 (3 $\times$ 3 mL).

Procedure for acylation with FAEAA: Fmoc deprotected resin **21** (250 mg) was swollen in CH_2Cl_2 (3 mL) for 30 min and then washed with DMF (3 $\times$ 3 mL) and CH_2Cl_2 (3 $\times$ 3 mL). [2-[2-(Fmoc-amino)-ethoxy]ethoxy]acetic acid (334 mg, 0.9 mmol) and HOBt (137 mg, 0.9 mmol) were dissolved in DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, 3 mL, v/v) and DIC (140 μL , 0.9 mmol) was added. The resulting solution was added to polypropylene fritted syringe with the resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with DMF (10 $\times$ 3 mL) and CH_2Cl_2 (10 $\times$ 3 mL), which gave resin **22**. An analytical sample was cleaved from the resin and UHPLC-MS analysis confirmed the presence of desired product. MS (ESI): m/z 745 [M-H]⁺. The Fmoc was deprotected from resin **22** by the general procedure to give resin **23**.

Procedure for acylation with acetic anhydride: Resin **23** (200 mg) was swollen in CH_2Cl_2 (2 mL) for 30 min and then washed with DMF (3 $\times$ 2 mL) and CH_2Cl_2 (3 $\times$ 2 mL). DMAP (92 mg, 0.75 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.5 mL) and acetic anhydride (71 μL , 0.75 mmol) was added. The resulting solution was added to polypropylene fritted syringe with the resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with CH_2Cl_2 (5 $\times$ 3 mL). Subsequent cleavage from the resin and UHPLC-MS analysis confirmed the presence of the desired product **33**.

General procedure E for acylation with triterpene derivatives: Resin **23** (250 mg) was swollen in CH_2Cl_2 (3 mL) for 30 min and then washed with DMF (3 $\times$ 3 mL) and CH_2Cl_2 (3 $\times$ 3 mL). To each solution of premodified triterpenes **6**, **8–12**, **14** (0.9 mmol) in DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, 3 mL, v/v) was added DIC (70 μL , 0.45 mmol) and the resulting mixture was added to a polypropylene fritted syringe with starting material. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight, followed by washing with CH_2Cl_2 (10 $\times$ 3 mL). The final compounds were cleaved according to General Procedure F.

General procedure F for cleavage from the resin: Cleavage of intermediates **24–31** and **33** in analytical scale (ca. 5 mg) prior to analysis was carried out in CH_2Cl_2 /TFA (10:1, 1 mL, v/v) for 30 min according to the General Information.

Cleavage of intermediates 24–31 and 33 in preparative scale (ca. 250 mg): The corresponding resin was swollen in CH_2Cl_2 (3 mL) for 30 min and then washed with CH_2Cl_2 (5 $\times$ 3 mL). A solution of CH_2Cl_2 /TFA (10:1, 3 mL, v/v) was added to each polypropylene fritted syringe with resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature for 90 min (**28–30**) or 2 h (**24–27**, **31**, **33**) and then washed with CH_2Cl_2 /TFA (10:1, 3 $\times$ 3 mL, v/v) and CH_2Cl_2 (3 $\times$ 3 mL). The cleavage cocktail with combined washes was evaporated under a stream of nitrogen, the crude products were dissolved in CH_3CN (3 mL) and purified by RP-HPLC to afford final compounds **24–33**.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 24: Yield: 11.4 mg (14% overall yield); dark-red crystalline solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.19 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.87 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.37 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.73 (d, J = 1.5 Hz, 1H; $^2J_{\text{H}^{\text{H}}}$ = 2.2), 4.60 (s, 1H; $^2J_{\text{H}^{\text{H}}}$ = 2.2), 4.48–4.44 (m, 1H), 4.26–4.24 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.69–3.65 (m, 5H), 3.60–3.56 (m, 5H), 3.52–3.47 (m, 5H), 3.43 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.02–2.97 (m, 1H; $^2J_{\text{H}^{\text{H}}}$ = 2.2), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.48 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.68 (s, 3H; CH_3), 1.64–1.15 (m, 23H; overlap with solvent), 0.96 (s, 3H; CH_3), 0.92 (s, 3H; CH_3), 0.83 (s, 3H; CH_3), 0.82

(s, 3H; CH_3), 0.81 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 181.0, 172.9, 172.7, 171.9, 170.5, 160.8, 156.9, 150.6, 144.2, 135.5, 133.4, 128.2, 124.1, 120.8, 116.8, 109.9, 81.4, 71.1, 70.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.1, 63.7, 56.5, 55.6, 49.4, 47.1, 42.6, 41.0, 40.9, 39.5, 38.8, 38.5, 38.0, 37.3, 34.4, 33.4, 32.3, 31.1, 30.7, 30.0, 29.9, 28.2, 25.6, 24.1, 23.9, 21.1, 19.6, 18.4, 16.7, 16.4, 16.2, 15.2, 14.9, 11.5 ppm; ^{19}F { ^1H } NMR (471 MHz, CDCl_3): δ = −145.82 (d, J = 31.5 Hz), −145.96 ppm (d, J = 31.5 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{105}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$: 1061.6276 [M-H]⁺; found: 1061.6275; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.20.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 25: Yield: 10.0 mg (10% overall yield); dark-red oil; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 9.52 (s, 1H; CHO), 7.17 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.36 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 6.29–6.26 (m, 2H), 6.12 (s, 1H; $^2J_{\text{H}^{\text{H}}}$ = 2.2), 5.91 (s, 1H; $^2J_{\text{H}^{\text{H}}}$ = 2.2), 4.47–4.43 (m, 1H), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.69–3.64 (m, 5H), 3.61–3.55 (m, 5H), 3.52–3.47 (m, 5H), 3.45–3.43 (m, 2H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.48 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.21–2.09 (m, 2H), 2.00–1.95 (m, 2H), 1.73–1.16 (m, 19H; overlap with solvent), 0.93 (s, 3H; CH_3), 0.91 (s, 3H; CH_3), 0.82 (s, 6H, 2 $\times$ CH_3), 0.81 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 195.2, 180.7, 172.9, 172.7, 171.9, 170.5, 160.8, 156.9, 144.3, 135.5, 133.4, 128.2, 124.1, 120.8, 116.8, 81.4, 71.1, 70.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.1, 63.7, 56.6, 55.6, 50.4, 42.5, 40.8, 39.5, 38.9, 38.4, 38.0, 37.3, 37.1, 34.4, 33.5, 32.1, 31.1, 30.1, 29.8, 28.2, 27.4, 24.1, 23.8, 21.0, 18.3, 16.7, 16.3, 16.2, 15.2, 14.8, 11.5 ppm; ^{19}F { ^1H } NMR (471 MHz, CDCl_3): δ = −145.85 (d, J = 31.8 Hz), −145.99 ppm (d, J = 31.8 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{105}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$: 1075.6069 [M-H]⁺; found: 1075.5985; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.14.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 26: Yield: 10.7 mg (15% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.15 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.32 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.50–4.47 (m, 1H), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.70–3.65 (m, 5H), 3.69 (s, 3H, COOCH_3), 3.61–3.56 (m, 5H), 3.52–3.48 (m, 5H), 3.45–3.42 (m, 2H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.21–3.17 (m, 1H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.67–2.62 (m, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.51–2.46 (m, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.14–1.23 (m, 15H; overlap with solvent), 1.21 (d, J = 1.2 Hz, 3H; CH_3), 1.20 (d, J = 1.3 Hz, 3H; CH_3), 1.02 (s, 3H; CH_3), 0.93 (s, 3H; CH_3), 0.89 (s, 3H; CH_3), 0.83 (s, 3H; CH_3), 0.82 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 207.4, 175.1, 172.9, 172.7, 171.9, 171.8, 170.4, 160.8, 156.9, 145.9, 144.2, 135.5, 133.4, 128.2, 124.1, 120.8, 116.8, 81.2, 71.1, 70.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.1, 63.7, 55.6, 53.2, 52.7, 51.2, 47.8, 45.4, 41.5, 39.5, 38.8, 38.7, 38.0, 37.3, 35.0, 33.9, 33.5, 31.0, 29.9, 29.6, 28.1, 27.8, 25.3, 24.1, 23.8, 21.4, 20.3, 20.2, 18.3, 17.0, 16.8, 16.7, 16.1, 15.2, 14.3, 11.5 ppm; ^{19}F { ^1H } NMR (471 MHz, CDCl_3): δ = −145.71 (d, J = 34.5 Hz), −145.85 ppm (d, J = 34.5 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{105}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$: 1089.6225 [M-H]⁺; found: 1089.6141; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.25.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 27: Yield: 10.0 mg (15% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.17 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.34 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.50–4.47 (m, 1H), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.72 (s, 3H, COOCH_3), 3.69–3.65 (m, 4H), 3.61–3.56 (m, 4H), 3.53–3.48 (m, 4H), 3.46–3.42 (m, 2H), 3.39–3.33 (m, 1H), 3.31–3.28 (m, 2H), 2.81–2.76 (m, 2H), 2.67–2.64 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.51–2.48 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.11–1.91 (m, 6H), 1.76–1.32 (m, 14H; overlap with solvent), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 3H; CH_3), 1.25 (d, J = 6.9 Hz, 3H; CH_3), 1.06 (s, 3H; CH_3), 0.97 (s, 3H; CH_3), 0.91 (s, 3H; CH_3), 0.84 (s, 3H; CH_3), 0.83 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 194.5, 189.5, 176.3, 172.9, 172.1, 171.9, 171.2, 170.6, 168.3, 160.8, 156.8, 150.8, 144.3, 135.5, 133.4, 128.1, 124.1, 120.7, 116.7, 81.3, 81.1, 71.1, 70.8, 70.4, 70.2, 70.0,

69.1, 63.7, 58.6, 55.6, 53.6, 51.0, 46.3, 45.7, 41.7, 39.5, 38.7, 38.0, 37.3, 34.7, 33.4, 31.0, 29.9, 29.5, 29.0, 28.6, 28.1, 27.6, 26.1, 24.0, 23.7, 21.2, 20.0, 18.2, 17.0, 16.9, 16.7, 16.3, 15.1, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.04 (d, J = 34.4 Hz), –145.18 ppm (d, J = 34.4 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 1103.6018 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 1103.5925; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.26.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 28: Yield: 21.7 mg (30% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –8.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H; pyrazine), 8.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H; pyrazine), 7.08 (s, 1H), 7.07–7.04 (m, 1H), 6.87 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.52–6.51 (m, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.75 (d, J = 1.6 Hz, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}2}$), 4.64 (d, J = 1.3 Hz, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}4}$), 4.59 (d, J = 15.1 Hz, 1H; OCH_2CO), 4.53 (d, J = 15.1 Hz, 1H; OCH_2CO), 4.26–4.24 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.68–3.64 (m, 4H), 3.62–3.61 (m, 2H), 3.58–3.54 (m, 4H), 3.52–3.47 (m, 4H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.09 (d, J = 16.6 Hz, 1H; H^{10}), 2.97 (dd, J = 11.0, 4.7 Hz, 1H), 2.79 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.44 (d, J = 16.6 Hz, 1H; H^{10}), 2.31–2.26 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.00–1.96 (m, 1H), 1.93–1.89 (m, 1H), 1.79–1.74 (m, 1H), 1.70 (s, 3H; CH_3), 1.68–1.32 (m, 13H; overlap with solvent), 1.29 (s, 3H; CH_3), 1.27 (s, 3H; CH_3), 1.01 (s, 3H; CH_3), 0.98 (s, 3H; CH_3), 0.79 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ –174.8, 172.6, 170.1, 167.7, 160.8, 159.9, 156.9, 150.9, 150.7, 150.2, 144.2, 142.5, 141.5, 135.5, 133.4, 128.1, 124.0, 120.7, 116.7, 110.2, 71.1, 70.9, 70.4, 70.0, 69.9, 69.1, 63.7, 62.6, 56.8, 53.2, 49.5, 49.0, 48.8, 46.9, 42.7, 40.7, 39.7, 39.0, 38.8, 38.3, 37.1, 37.0, 33.5, 32.1, 31.7, 30.6, 29.9, 25.6, 24.2, 24.1, 21.6, 20.2, 19.6, 16.3, 15.8, 15.1, 14.8, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.04 (d, J = 31.8 Hz), –145.18 ppm (d, J = 31.8 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 1053.6126 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 1053.6134; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.21.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 29: Yield: 16.7 mg (20% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –8.46 (app s, 1H; pyrazine), 8.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H; pyrazine), 7.08 (s, 1H), 7.07–7.06 (m, 1H), 6.87 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.57 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.75 (app s, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}2}$), 4.64 (app s, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}4}$), 4.60 (d, J = 15.1 Hz, 1H; OCH_2CO), 4.53 (d, J = 15.1 Hz, 1H; OCH_2CO), 4.26–4.23 (m, 2H), 4.00 (s, 4H), 3.68–3.46 (m, 24H), 3.28 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.09 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.01–2.96 (m, 1H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.46 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 2.30–2.27 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.00–1.93 (m, 2H), 1.77 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H; CH_3), 1.68–1.34 (m, 14H; overlap with solvent), 1.30 (s, 3H; CH_3), 1.28 (s, 3H; CH_3), 1.01 (s, 3H; CH_3), 0.98 (s, 3H; CH_3), 0.80 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ –174.8, 172.6, 170.1, 167.7, 160.8, 160.4, 157.1, 156.9, 151.0, 150.2, 144.2, 142.7, 135.5, 133.4, 128.2, 124.1, 120.7, 116.8, 110.2, 71.0, 70.9, 70.4, 70.1, 70.0, 69.0, 63.7, 62.6, 56.8, 53.1, 49.5, 48.9, 48.4, 46.9, 42.7, 40.7, 39.7, 39.0, 38.8, 38.3, 37.1, 37.0, 33.5, 32.2, 31.7, 30.6, 29.9, 25.6, 24.2, 24.1, 22.9, 21.6, 20.2, 19.6, 16.3, 15.8, 15.2, 14.8, 14.3, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.85 (d, J = 34.2 Hz), –145.99 ppm (d, J = 34.2 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 1200.6865 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 1200.6848; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.30.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 30: Yield: 8.5 mg (12% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –7.09 (s, 1H), 7.07–7.06 (m, 1H), 6.88 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.50–6.48 (m, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.73 (app s, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}2}$), 4.60 (d, J = 2.0 Hz, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}4}$), 4.59 (d, J = 15.5 Hz; OCH_2CO), 4.52 (d, J = 15.1 Hz, 1H; OCH_2CO), 4.27–4.24 (m, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.68–3.63 (m, 4H), 3.62–3.60 (m, 2H), 3.58–3.53 (m, 4H), 3.52–3.47 (m, 4H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.18 (dd, J = 11.4, 4.8 Hz, 1H), 2.99–2.94 (m, 1H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.25–2.20 (m, 2H), 1.98–1.86 (m, 3H), 1.68 (s, 3H; CH_3), 1.65–1.15 (m, 19H; overlap with solvent), 0.96 (s, 3H; CH_3), 0.96 (s, 3H; CH_3), 0.90 (s, 3H;

CH_3), 0.81 (s, 3H; CH_3), 0.75 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ –174.8, 172.6, 170.1, 167.7, 156.9, 150.3, 144.3, 128.1, 124.1, 120.8, 116.8, 110.1, 79.2, 71.1, 70.9, 70.4, 69.9, 69.1, 63.7, 62.6, 56.8, 55.5, 50.7, 49.6, 47.0, 42.6, 40.9, 39.0, 38.9, 38.8, 38.3, 37.4, 37.1, 34.5, 33.5, 32.2, 30.6, 29.9, 28.2, 27.6, 25.7, 24.1, 21.0, 19.5, 18.5, 16.3, 16.2, 15.5, 15.2, 14.9, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.76 (d, J = 30.5 Hz), –145.90 ppm (d, J = 30.5 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 1019.6170 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 1019.6171; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.17.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 31: Yield: 15.2 mg (21% overall yield); dark-red solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –7.19 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.40 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.67 (app s, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}2}$), 5.29 (app s, 1H; $\text{H}^{29\text{pro}4}$), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.71–3.66 (m, 4H), 3.64–3.50 (m, 10H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.17 (dd, J = 11.0, 5.1 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.22–2.13 (m, 2H), 1.96–1.84 (m, 3H), 1.67–1.34 (m, 15H), 1.25–1.16 (m, 4H), 0.95 (s, 6H; $2\times\text{CH}_3$), 0.91 (s, 3H; CH_3), 0.80 (s, 3H; CH_3), 0.74 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ –179.8, 172.6, 170.7, 169.1, 160.8, 156.9, 150.7, 144.3, 135.5, 133.4, 128.2, 127.9, 127.2, 125.1, 124.1, 120.8, 116.8, 79.1, 71.3, 70.8, 70.7, 70.3, 70.0, 69.1, 63.6, 56.5, 55.5, 50.9, 50.6, 42.6, 40.9, 39.4, 39.0, 38.9, 38.4, 37.4, 36.8, 34.5, 33.5, 32.9, 32.0, 29.8, 28.2, 27.5, 24.1, 21.1, 18.4, 16.3, 16.2, 15.6, 15.2, 14.9, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.75 (d, J = 35.6 Hz), –145.97 ppm (d, J = 35.6 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 991.5857 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 991.5852; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.17.

BODIPY-FL-triterpene conjugate 32: Yield: 4.5 mg (7% overall yield); dark-red oil; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –7.17 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.33 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.49–4.45 (m, 1H), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.93 (s, 1H), 3.67 (dd, J = 9.2, 5.3 Hz, 4H), 3.61–3.56 (m, 4H), 3.53–3.48 (m, 4H), 3.46–3.42 (m, 2H), 3.29 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.66–2.62 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.50–2.47 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.85 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 1.79 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 1.72–1.18 (m, 24H; overlap with solvent), 1.02 (s, 3H; CH_3), 0.95 (s, 3H; CH_3), 0.90 (s, 3H; CH_3), 0.86 (s, 3H; CH_3), 0.85 (s, 3H; CH_3), 0.83 (s, 3H; CH_3), 0.82 ppm (s, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ –180.1, 172.9, 172.6, 171.8, 170.4, 160.8, 156.9, 144.2, 135.5, 133.5, 128.2, 124.1, 120.8, 116.8, 109.9, 86.2, 81.3, 71.1, 70.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.1, 63.7, 55.8, 51.4, 46.9, 46.3, 40.8, 40.1, 39.5, 38.9, 38.8, 38.1, 37.4, 36.2, 33.9, 33.8, 33.5, 32.5, 32.1, 31.1, 30.1, 28.9, 28.1, 26.7, 24.2, 24.1, 23.8, 21.1, 18.2, 16.8, 16.7, 15.7, 15.2, 13.8, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.31 (d, J = 31.8 Hz), –145.45 ppm (d, J = 31.8 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 1061.6276 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 1061.6278; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.20.

BODIPY-FL–2,11-dioxo-6,9,15-trioxo-3,12-diazaheptadecan-17-yl propionate 33: Yield: 2.49 mg (11% overall yield); dark-red crystalline solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ –7.18 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.88 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.29–6.27 (m, 2H), 6.12 (s, 1H), 4.27–4.24 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.69–3.66 (m, 4H), 3.61–3.57 (m, 4H), 3.53–3.47 (m, 4H), 3.45–3.41 (m, 2H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.98 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ –172.7, 170.6, 170.5, 160.9, 156.9, 144.3, 135.5, 133.5, 128.2, 124.1, 120.1, 116.8, 71.2, 70.9, 70.5, 70.3, 70.1, 69.1, 63.7, 39.5, 38.8, 33.5, 24.1, 23.3, 15.2, 11.5 ppm; ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR (471 MHz, CDCl_3): δ –145.64 (d, J = 35.6 Hz), –145.79 ppm (d, J = 35.6 Hz); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$: 565.2723 $[\text{M}-\text{H}]^+$; found: 565.2736; UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} = 507 nm; λ_{min} = 513 nm; Φ = 0.71.

Acknowledgements

This work was mainly supported by the Czech Science Foundation (15-05620S), microscopy and part of the salaries were paid from the Technology Agency of the Czech Republic (TE01020028), the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Grant Numbers: LO1304, LM2015063) and internal grant of Palacký University IGA_PrF_2017_009, IGA_LF_2017_026, IGA_LF_2017_028.

Keywords: cytotoxicity · dyes/pigments · fluorescence microscopy · solid-phase synthesis · terpenoids

- [1] T. Ueno, T. Nagano, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 642–645.
- [2] J. Bañuelos, *Chem. Rev.* **2016**, *16*, 335–348.
- [3] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [4] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [5] T. Kowada, H. Maeda, K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953–4972.
- [6] M. Vendrell, G. G. Krishna, K. K. Ghosh, D. Zhai, J.-S. Lee, Q. Zhu, Y. H. Yau, S. G. Shochat, H. Kim, J. Chung, Y.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 8424–8426.
- [7] M. Lumbierres, J. M. Palomo, G. Kragol, S. Roehrs, O. Müller, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7405–7415.
- [8] J. Šarek, J. Klinot, P. Džubák, E. Klinotová, V. Nosková, V. Kreček, G. Kořínková, J. O. Thomson, A. Janoščíková, S. Wang, S. Parsons, P. M. Fischer, N. Z. Zhelev, M. Hajdúch, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5402–5415.
- [9] J. Šarek, M. Kvasnica, M. Urban, J. Klinot, M. Hajdúch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4196–4200.
- [10] M. Urban, J. Šarek, M. Kvasnica, I. Tislerová, M. Hajdúch, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 526–532.
- [11] L. Huo, X. Bai, Y. Wang, M. Wang, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *92*, 347–355.
- [12] R. Biswas, J. Chanda, A. Kar, P. K. Mukherjee, *Food Chem.* **2017**, *232*, 689–696.
- [13] A. M. Hansen, A. L. Sewell, R. H. Pedersen, D.-L. Long, N. Gadegaard, R. Marquez, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8527–8533.
- [14] K. Giesler, H. Griesser, D. Göhringer, T. Sabirov, C. Richert, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3611–3620.
- [15] E. V. Rumyantsev, S. N. Alyoshin, Y. S. Marfin, *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *408*, 181–185.
- [16] M. Soural, J. Hodon, N. J. Dickinson, V. Sidova, S. Gurska, P. Dzubak, M. Hajdúch, J. Šarek, M. Urban, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2563–2570.
- [17] N. Cankarova, P. Funk, J. Hlavac, M. Soural, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5782–5788.
- [18] W. Dehaen, A. A. Mashentseva, T. S. Seitembetov, *Molecules* **2011**, *16*, 2443–2466.
- [19] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1535–1550.
- [20] W. Peng, F. Ding, Y.-T. Jiang, Y.-K. Peng, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2271–2283.
- [21] Y. Ye, T. Zhang, H. Yuan, D. Li, H. Lou, P. Fan, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6353–6363.
- [22] S. Mitsuda, T. Yokomichi, J. Yokogawa, T. Kataoka, *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 229–2239.
- [23] L. Borkova, R. Adamek, P. Kalina, P. Drasar, P. Dzubak, S. Gurska, J. Rehulka, M. Hajdúch, M. Urban, J. Šarek, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 390–398.
- [24] B. Elgnerova, M. Tichý, J. Krasulova, M. Kvasnica, L. Rarova, R. Christova, M. Urban, B. Bednarczyk-Cwynar, M. Hajdúch, J. Šarek, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 403–420.

Manuscript received: December 22, 2017

Accepted manuscript online: February 7, 2018

Version of record online: March 12, 2018

Cite this: *RSC Adv.*, 2019, 9, 25075

Amino-BODIPY as the ratiometric fluorescent sensor for monitoring drug release or “power supply” selector for molecular electronics†

Martin Porubský,^a Soňa Gurská,^b Jarmila Stanková,^b Marián Hajdúch,^b Petr Džubák^b and Jan Hlaváč^b ^{*a}

The glutathione cleavable conjugates of amino-BODIPY dye with model drugs have been tested for monitoring the drug release via ratiometric fluorescence based on two excitation and one emission wavelength. As a self-immolative linker was used for the construction of conjugates, free amino-BODIPY was released with the drug. Different excitation profiles of the dye before and after conjugate cleavage and similar emission wavelengths that enabled monitoring the release of the drug via the OFF–ON effect were successfully tested inside the cancer cells. UV/Vis spectrometry could be used in the quantification of the conjugate/drug in an analyte irrespective of the cleavage grade. As the system functionality was based only on the altered acylamino-BODIPY present in the conjugate to amino-BODIPY released during the cleavage, the method could be applied as a ratiometric fluorescence theranostic system to other non-fluorescent drugs. Moreover, the present conjugates demonstrated their potential application in molecular electronics as a “power supply” selector enabling the application of two power sources for one “bulb” to maintain its light intensity.

Received 8th May 2019
Accepted 28th July 2019

DOI: 10.1039/c9ra03472b

rsc.li/rsc-advances

Introduction

The ability to monitor a drug's fate, including its conjugate penetration and the subsequent drug release is one of the key features in the development of new drug delivery systems (DDS) in cancer therapy.¹ The detection of relevant markers along with monitoring the drug release with time ranks these systems among the most intensively studied theranostics.²

The most frequently used visualization method for drug release is optical fluorescent spectroscopy, using various dyes such as cyanines, xanthene dyes, coumarines, *etc.* The frequently-used BODIPY dyes with total neutral charge, hydrophobic nature, and adjustable photochemical properties seem to be the first candidates of choice for penetration-visualization studies. In addition, BODIPYs are highly photostable and possess high quantum yields, high extinction coefficients, and sharp excitation/emission spectra.³

Optical imaging often utilizes activatable probes that effectuate amplified signal in the presence of selective or overexpressed biomarker or due to specific molecular events. This

phenomenon is fundamental for the OFF–ON or ON–OFF systems used in several diagnostic applications.^{4–10} The greatest advantage of the fluorescent systems applied in chemical biology is the ratiometric measurement,^{11–13} when two emission maxima are reached after excitation at one wavelength or when two excitation wavelengths cause one emission peak. Ratiometric systems easily overcome some drawbacks of simple intensimetric systems, especially false response caused by variation in the local concentration of the probe, light scattering by the sample matrix, excitation source fluctuation, or micro-environment effects around the probe.

Thiols, mainly glutathione (GSH), responsible for different redox state of the cancer cells,¹⁴ are the key intracellular stimuli for the release of a drug from DDS or theranostics. Consequently, the level of glutathione in some tumors is up to 10-fold higher as compared to normal cells.¹⁵ Elevated GSH level is typical of some cancer cells,¹⁶ which makes them ideal triggers for the release of a drug from systems including disulfide linker.

Although a few disulfide theranostic prodrugs with an ability to monitor drug releasing *via* fluorescence have been introduced in recent years,^{17–22} only a few were reported to have the ratiometric ability for monitoring the drug release.^{23,24} These ratiometric OFF–ON systems are responsive to the presence of GSH and are based on one excitation/two emissions. However, the drawback of these systems is the application of the fluorescence resonance energy transfer (FRET) between camptothecin as the drug and the fluorescent dye. Thus, this system

^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Tr. 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. E-mail: jan.hlavac@upol.cz

^bInstitute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotinská 5, 779 00, Olomouc, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available: Description of synthesis protocols, spectral properties of the probes and fluorescence spectroscopy recording of probes cleavage. See DOI: 10.1039/c9ra03472b

lacks the general application to drugs without regards to their fluorescent properties.

In the molecular electronics, the OFF-ON or ON-OFF concept could be used for the construction of molecular logic gates operated by various inputs, such as pH, the presence of metal ions, or other specific markers.²⁵ Although the molecular switches based on the (ir)reversible turn-on or turn-off effect giving the fluorescence response in the presence of appropriate marker has been described several times,²⁶ a selector as a molecular electronic device that can switch two different power supplies for one appliance while maintaining the level of power has not yet been described.

In this study, we report a new acylamino-BODIPY/amino-BODIPY system applicable in chemical biology or molecular electronics. As the specific spectral properties of the amino-BODIPY are exhibited together with the drug after conjugate cleavage, the drug release can be monitored *via* OFF-ON effect as well as ratiometric fluorescence irrespective of the fluorescent properties of the drug. The system could also serve as a molecular electronic selector activated by the presence of thiols and optimal pH.

Experimental section

Materials and methods

For the preparation and characterization of the compounds, LC/MS analyses were performed using UHPLC/MS with an UHPLC chromatograph (Acquity) with a PDA detector, a single quadrupole mass spectrometer (Waters), an X-Select C18 column at 30 °C and a flow rate of 600 $\mu\text{L min}^{-1}$. The mobile phase consisted of (A) 0.01 M ammonium acetate in water and (B) acetonitrile, with a linear gradient over the course of 2.5 min; at the conclusion of the gradient, the final ratio was maintained for 1.5 min. The column was re-equilibrated with 10% B for 1 min. The APCI ionization operated at a discharge current of 5 μA , a vaporizer temperature of 350 °C and a capillary temperature of 200 °C. Compound purity was determined using the ratio of the appropriate peak area to sum of areas of all peaks of the mixture. Areas were determined by integration of the peaks from the PDA detector response. Purity of final compounds was determined by this method and was >95%.

Purification was performed using semi-preparative HPLC with a Waters 1500 series HPLC equipped with a 2707 Autosampler, a 1525 binary HPLC pump, a 2998 Waters Photodiode Array Detector and a Waters Fraction Collector III with a YMC C18 reverse phase column (20 $\times$ 100 mm, 5 μm particle size). The mobile phase consisted of acetonitrile and a 10 mM aqueous ammonium acetate gradient over 6 min.

NMR spectra were measured in CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$ using a Jeol ECX-500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm), and coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz).

HR-MS analysis was performed using an Orbitrap Elite high-resolution mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) operating at positive full scan mode (120 000 FWHM) in the range of 2000–3000 m/z . The settings for electrospray ionization were as follows: oven temperature of 300 °C, sheath gas

of 8 arb. units and source voltage of 1.5 kV. Samples were diluted to a final concentration of 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ with 0.1% formic acid in water and methanol (50 : 50, v/v).

Rink amide resin and Fmoc-amino acids were purchased from AAPPTec (Louisville, KY). Solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, IL, <http://www.sigmaaldrich.com>).

Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer equipped with a thermostat (FL1009M015). Excitation and emission slits were 5 nm. Absorption spectra were recorded on a Cary 300 UV/Vis spectrophotometer (UV111M031, Agilent). Excitation spectra of the model drugs 1–3 correspond to general observations published previously^{27,28} and don't interfere with the spectra of the conjugates 4–6 or released dye 7.

Quantum yield determination

Quantum yields (Φ) were calculated by standard procedure using Fluorescein as a reference ($\Phi = 0.91$) according to eqn (1).

$$\Phi = \Phi_R \times I/I_R \times A_R/A \times \eta^2/(\eta_R^2) \quad (1)$$

where Φ_R is the quantum yield of reference fluorophore, I is area under emission peak, A is absorbance at the excitation wavelength η is refractive index of the solvent.

Cleavage of the conjugates 4–6 by glutathione and its LC/MS monitoring

0.25 ml of the conjugate 4, 5 and 6 solution (2 mM) in DMSO was mixed with 0.1 ml of GSH solution (50 mM) in HEPES (0.1 M, pH 7.4) and diluted with 0.65 ml DMSO/HEPES (2 : 1 v/v). The mixture was heated to 37 °C and analyzed by LC/MS within the time. Intracellular cleavage of conjugates 4–6 by glutathione and its fluorescence monitoring.

Cleavage of the conjugates 4–6 by glutathione and its fluorescence monitoring

5 μL of the probe 4, 5 or 6 solution (1 mM) in DMSO was mixed with 20 μL , 60 μL or 100 μL of the GSH solution (50 mM) in HEPES buffer (0.1 M; pH 7.4) and diluted by HEPES buffer (0.1 M; pH 7.4) or DMSO/HEPES buffer (2 : 1) to 1 mL. The mixture was heated to 37 °C and the fluorescence was measured within the time.

Intracellular cleavage of conjugates 4–6 by glutathione and its fluorescence monitoring

HeLa cells were added to black 96-well plates by MultiDrop Combi (Thermo Fisher Scientific, USA) at a cell density of 1.25×10^4 per well and incubated overnight. Pre-treatment with GSH was performed by incubation of cells with GSH (20 mM in medium) for 2 h. The cells were washed with PBS, immediately treated with tested compounds for 2 min and washed with PBS again. Finally, 50 μL of PBS was added to each well. Fluorescence intensity was measured by EnVision plate reader (PerkinElmer, USA), two reads for each time point (first with ex 510 nm/em 535 nm and second with ex 485 nm/em 535 nm).

Fluorescent microscopy imaging

HeLa cells (3000 per well, 30 μ l per well) were seeded into 384 CellCarrier plates (PerkinElmer, USA) for live cell fluorescence imaging and preincubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ to adhere. The cells were pretreated with 20 mM GSH for 2 h and stained by Hoechst dye in concentration 1.62 μ M within last 20 min. Further, the stained cells were rinsed with fresh media, treated with tested compounds (10 μ M) for 2 min and rinsed with fresh media again. The live-cell imaging was performed by Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japan) spinning disc confocal microscopy system at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Living cells were monitored by a 40 $\times$ water immersion objective. All images were post-processed, background subtracted and deconvolved using Image J software.

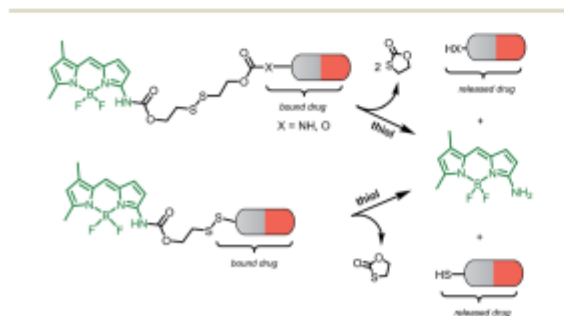
Results and discussion

This novel system is suggested as the conjugate of amino-BODIPY dye acylated by (a) symmetrical self-immolative disulfide linker, connected to a drug predestinated to release. This system was designed based on the previous study by Jain *et al.*²⁹ The symmetrical linker can be used for binding of a drug with an amino or hydroxy group, whereas the asymmetrical linker can be used for binding of a drug *via* its thiol group (Scheme 1). The disulfide bridge provides a switch that triggers the release of the drug and free amino-BODIPY in the presence of thiols.

To study the possibility of monitoring a drug release, we used the compounds 1–3 from a group of 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone derivatives, known for their anticancer activity³⁰ as the model drugs. These drugs are substituted by the thiol, hydroxy, or amino group, suitable for conjugation with amino-BODIPY 7. The structure of these model drugs and their conjugates 4–6 are presented in Fig. 1.

The model drug 1 was synthesized from quinolinone 8 (ref. 30) by standard peptide synthesis with immobilized Fmoc-cysteine on Rink resin. Compound 2 was prepared by esterification of the starting derivative 9 with triethyleneglycol (Scheme 2). Compound 3 was synthesized according to the previously published procedure.³⁰

Amino-BODIPY 7 was prepared by reaction of previously published chloroderivative 10 (ref. 31) with ammonia in



Scheme 1 Schematic illustration of the drug and amino-BODIPY release from their conjugates.

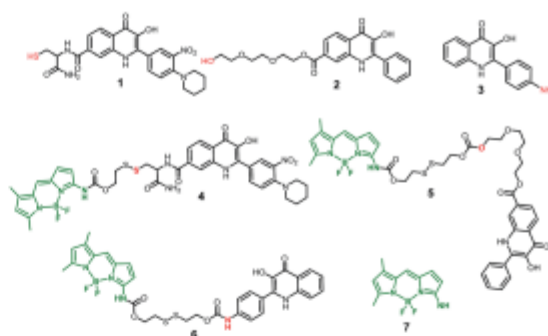


Fig. 1 Structure of model drugs 1, 2, and 3 (ref. 18) and their conjugates 4, 5, and 6 used for thiol-mediated cleavage studies.

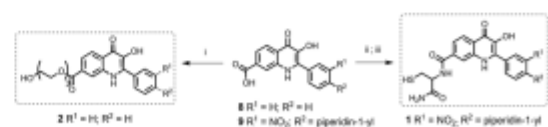
methanol/DCM as described previously. The reaction with disulfide precursor 11 (ref. 32) effectuated the intermediate 12. The disulfide exchange of this intermediate with mercapto derivative 1 afforded the final disulfide conjugate 4 (Scheme 3).

The coupling of amino-BODIPY 7 with linker precursor 13 and subsequent reaction with HOBt gave rise to compound 14 with activated carbonate group. Then, final conjugates 5 and 6 were prepared by coupling the derivative 14 with the corresponding quinolinones 2 or 3 respectively *via* carbamate or carbonate bond (Scheme 3).

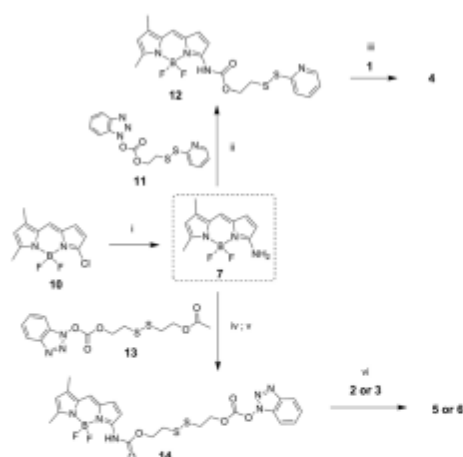
The fluorescence spectra of amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6 were first measured in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) to meet the requirements for the planned biological experiments.

Amino-BODIPY 7 has one broad excitation maximum at 480 nm and emission at 523 nm (Table 1; Fig. 2). Acylamino-BODIPY in conjugates 4–6 possesses excitation maxima 515–517 nm, while emission of 525–527 nm is very close to the emission of amino-BODIPY 7 (Fig. 2; Table 1).

Besides the shift of excitation maxima, a significant difference was observed between amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6 with respect to the quantum yields and fluorescence intensity. When excitation wavelength at 480 nm, which is the characteristic maximum for amino-BODIPY 7, was used and emission at 525 nm was collected, a significant difference was observed between the fluorescence intensity of amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6 (Fig. 3), and thus, the system can work as OFF-ON during the cleavage. The intensity ratio of amino-BODIPY 7 to appropriate conjugate 4–6 differs probably due to different quenching effect of the bound derivatives 1–3.



Scheme 2 Synthesis of model drugs 1 and 2. (i) 8, triethyleneglycol, H₂SO₄ (cat.), THF, reflux, on; (ii) Rink amide resin preloaded with cysteine, 9, HOBt, DIC, DMF/Pyr, 3 h, rt. (iii) TFA/DCM/TES (2 : 1 : 0.05), 1 h, rt.



Scheme 3 Synthesis of amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6. (i) 7.0 M NH₃/MeOH, DCM 70 °C, on; (ii) DMAP, TEA, DCM, rt, 3 h; (iii) DMF, 60 °C, on; (iv) TEA, DMAP, 13, DCM, rt, 3 h. (v) K₂CO₃, THF/MeOH 3 : 1, rt, on; (vi) DMAP, TEA, DCM, rt, on.

Therefore a significant difference was observed between amino-BODIPY 7 and conjugate 4, in which the fluorescence is expectedly quenched by the nitro group.

When the excitation wavelength was selected at 510 nm, what is close to the excitation maxima of conjugates 4–6 and sufficiently distal from the emission maximum of BODIPY 7, the emission intensity was high for amino-BODIPY 7 due to its broad excitation spectrum and high quantum yield (Fig. 3; Table 1). The system could work as OFF–ON during the cleavage as well, but less efficiently.

To assess the effect of solvent polarity to OFF–ON effect, we mixed the HEPES buffer with DMSO (1 : 2 v/v). Based on the results from Table 1 and Fig. 4, the excitation as well as emission spectra of conjugates 4–6 exhibit bathochromic shift to approximately 520 nm and 530 nm, respectively and enhanced quantum yield.

Table 1 Fluorescence profile of conjugates 4–6, 18, 19 and BODIPY dyes 7, 20

Compound	Solvent	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	QY (%)
4	HEPES	515	527	12	1.4
	DMSO/HEPES	517	531	14	7.7
5	HEPES	516	525	9	14
	DMSO/HEPES	520	530	10	58
6	HEPES	517	525	8	32
	DMSO/HEPES	521	532	11	53
7	HEPES	480	523	43	77
	DMSO/HEPES	496	523	40	95
18	DMSO/HEPES	521	549	28	23
19	DMSO/HEPES	520	531	11	95
20	DMSO/HEPES	521	550	29	48

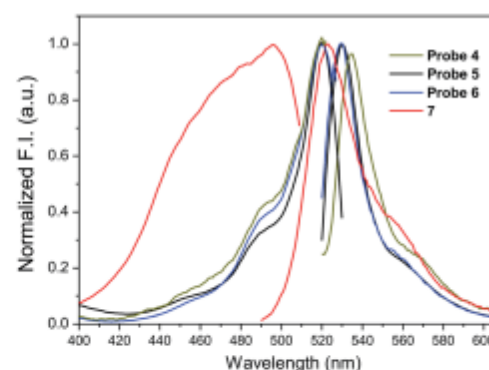


Fig. 2 Normalized fluorescence excitation and emission spectra of amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6 (HEPES buffer, 0.1 M, pH 7.4).

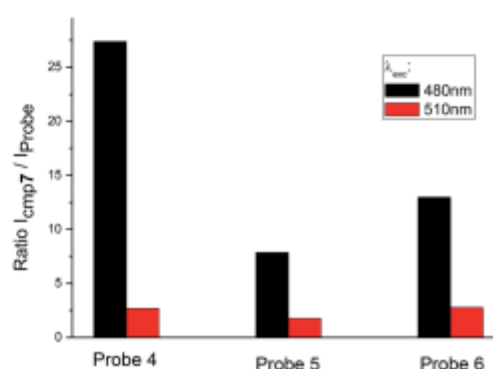


Fig. 3 Ratio of fluorescence intensity of amino-BODIPY 7 to conjugates 4–6 at 525 nm after excitation at 480 nm or 510 nm (HEPES buffer, 0.1 M, pH 7.4).

When the excitation wavelength $\lambda_{exc} = 480$ nm is applied, the emission intensity ratio for $\lambda_{em} = 530$ nm between amino-BODIPY 7 and its conjugates 4–6 is approximately 2–3, and

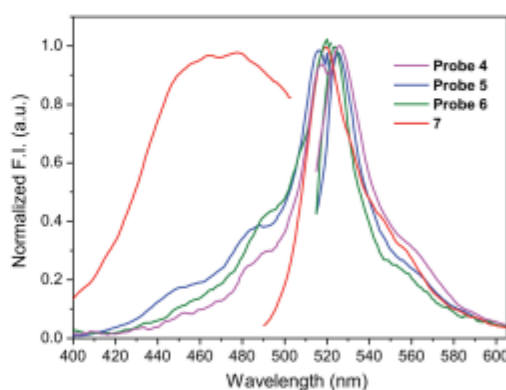


Fig. 4 Fluorescence excitation and emission spectra of amino-BODIPY 7 and conjugates 4–6 (DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, 7.4 pH).

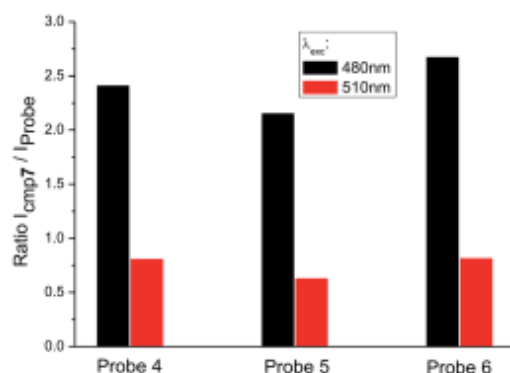


Fig. 5 Ratio of fluorescence intensity of amino-BODIPY 7 to conjugates 4–6 at 530 nm after excitation of the appropriate couple at 480 nm or 510 nm (DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, pH 7.4).

hence, the OFF–ON effect is not as effective as in the HEPES buffer. When $\lambda_{exc} = 510$ nm is used, the fluorescence intensity is lower for amino-BODIPY 7 as compared to conjugates 4–6 (Fig. 5).

To confirm the ability of disulfide linker to release the amino-BODIPY 7 and the model drugs 1–3 by thiols according to Scheme 1, conjugates 4–6 were treated with 0.5 mM glutathione at physiological conditions (37 °C, pH 7.4) and monitored by LC/MS. Because of the necessity to use a high concentration of the probes for such a detection, the present study was performed only in DMSO/HEPES buffer (2 : 1). As shown in Fig. 6, the treatment of prodrug 4 with GSH resulted in four products detected by HPLC. According to mass spectrometry, we detected the presence of the expected released drug 1 and amino-BODIPY 7 indicating complete cleavage of the conjugate, but also the formation of adducts 15 and 16 derived from the 3-HQ or BODIPY dye. Interestingly, the concentration of the adduct 15 increases in a time-dependent manner, which might be attributed to the equilibrium between 15 and 1. Conversely, the concentration of adduct 16 decreased with time because of the presence of self-immolative disulfide linker that prevents similar equilibrium.

The cleavage of the conjugates 5 and 6, wherein 3HQ is bound *via* carbonate and carbamate bonds, afforded the corresponding 3HQs 2 and 3, respectively. Although the GSH adducts 16 and 17 were also observed, these were subsequently converted to the final free 3HQ derivative 2 or 3 and amino-BODIPY 7 (Fig. 6B and C). The treatment using all prodrugs 4–6 was performed with 20 μ M in the extracellular matrix.²³ No cleavage was observed for any derivative in this case.

The difference in fluorescence profile of amino-BODIPY 7 and conjugates 4–6 should enable efficient monitoring of the cleavage of conjugates *via* OFF–ON mode in HEPES buffer (Fig. 3), which is optimal for potential biological applications. Next we performed the GSH-mediated cleavage of probes 4–6 monitored by fluorescence with excitation at 480 nm as well as 510 nm and emission at 525 nm. Within 180 min we observed

the expected enhancement of the fluorescence intensity for excitation at 480 nm and 510 nm (Fig. 7; Fig. S2 and S4†).

Furthermore, plotting the ratio of emission intensities at 525 nm after excitation at 480 nm and 510 nm (I_{480}/I_{510}) vs. time allows ratiometric fluorescence monitoring the cleavage in a concentration independent manner (Fig. 8).

The rate of the GSH-mediated cleavage of disulfide bridge depends on the concentration of GSH. While 5 mM GSH normally present in some cancer cells,⁴⁴ was sufficient for full cleavage of conjugate 4 within 50 min and 120 min for conjugates 5 and 6, respectively; the low concentrations of GSH caused only partial cleavage during the same period (Fig. 8). The limit of detection (LOD) for GSH was determined for compounds 5 and 6 (HEPES buffer 7.4 pH, 37 °C, 2 h incubation). Obtained LOD values were 305 nM and 752 nM, respectively (ESI†, Fig. 12). In addition, the cleavage is pH dependent and proceeds rapidly in basic conditions. In acidic medium, none or only little conjugate is cleaved (Fig. 9).

As exemplified on probe 4 not only GSH but also cysteine, commonly present in a biological medium, can cause the amino-BODIPY 7 releasing. On the other hand, the system is resistant to all other amino acids (Fig. 10).

The release of amino-BODIPY 7 from conjugates 4–6 is accompanied by the release of drugs 1–3 (Fig. 6) and therefore enhancing the fluorescence of amino-BODIPY 7 reflects release of the drugs. Thus, the monitoring of the drug release is dependent only on the change of acylamino-BODIPY to amino-BODIPY derivative and is independent of the type of the drug. To prove this hypothesis, compounds 18, 19, and 20 with different substitutions on amino-BODIPY (Fig. 11) were synthesized as described in Scheme 3 (see ESI†). Conjugate 18 and released BODIPY dye 20 showed the same excitation/emission profile due to the same piperidyl substitution directly bound to the BODIPY scaffold. On the other hand, conjugate 19 effectuating amino-BODIPY 7 after cleavage follows the same excitation/emission profile changes as conjugates 4–6 (Fig. 11 and 4). Thus, we can conclude that the principle of OFF–ON effect is not influenced by the nature of a compound conjugated to BODIPY dye, but rather depends only on the transformation of acylamino-BODIPY to amino-BODIPY derivative.

Probe 4-based monitoring of the cleavage by UV/Vis spectroscopy resulted in the hyperchromic as well as hypochromic shift with an isosbestic point at approximately 490 nm (Fig. 12). As the absorption profile of quinolinones 1–3 bound in conjugates 4–6 did not interfere with this wavelength (see ESI†), the isosbestic point was connected with the change of acylamino-BODIPY to amino-BODIPY regardless of the bound drug. This phenomenon could be supported by the same results from UV/Vis-based monitoring of cleavage of conjugate 19 bearing cysteine having no absorption in the UV/Vis region (Fig. 12).

The developed system might be used for monitoring the release of a drug inside the cancer cells, well known for the increased level of redox potential due to high concentration of thiols, mainly GSH.^{44,45} A maximal release of a drug within a time period corresponded to the maximal release of amino-BODIPY 7 from appropriate conjugate (Scheme 1; Fig. 6). To

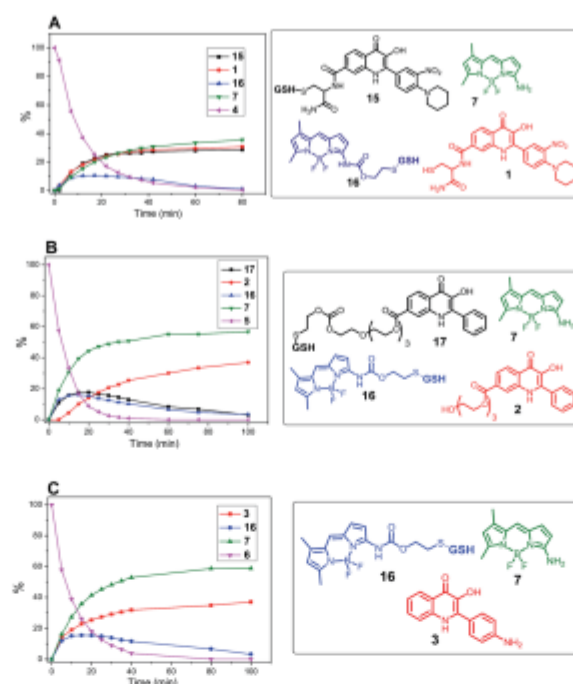


Fig. 6 Monitoring the drug release from conjugates 4, 5, and 6 (0.5 mM; DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M; pH 7.4; 37 °C) by GSH (5 mM) by HPLC/MS.

prove the real functioning of the system, we performed the cleavage experiment of conjugates 4–6 in HeLa cells that were pretreated with glutathione (20 mM). Due to the instrumental

limitation, excitation at 485 nm was used instead of $\lambda_{exc} = 480$ nm. Although the inherent concentration of GSH in the cells was sufficient to cleave the disulfide conjugates 4–6, the

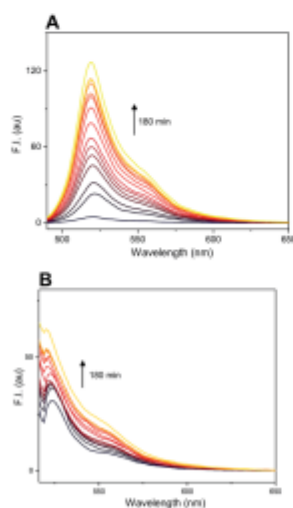


Fig. 7 GSH-mediated cleavage of probe 4 monitored within 180 min by fluorescence emission at 525 nm after excitation at 480 nm (A) and 510 nm (B) (5 μ M probe 4, 5 mM GSH; HEPES buffer, 0.1 M, pH 7.4, 37 °C).

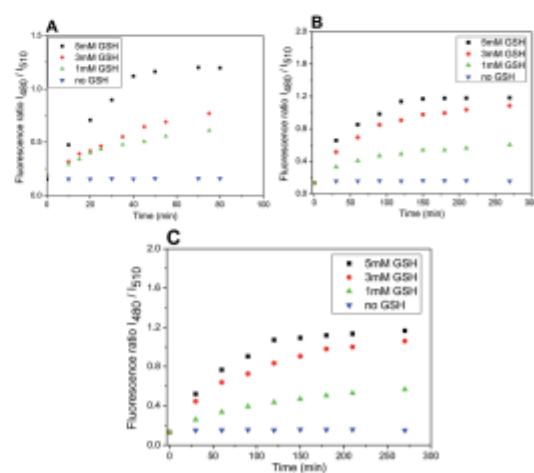


Fig. 8 Ratio of emission intensities at 525 nm upon excitation at 480 and 510 nm in time after treatment with different concentrations of GSH (5, 3, 1 mM). Probe 4 (A); probe 5 (B); probe 6 (C) (5 μ M probes 4–6; DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, pH 7.4, 37 °C).

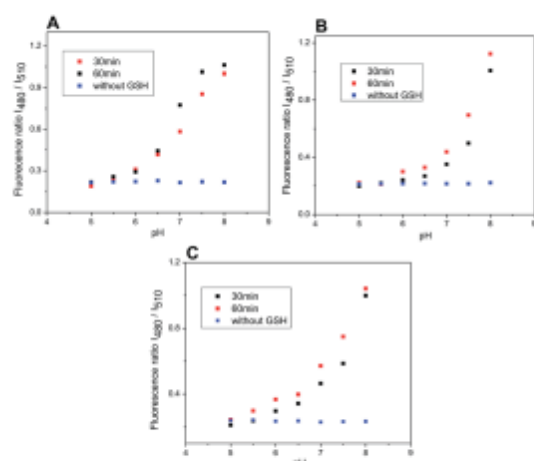


Fig. 9 Ratio of emission intensities at 525 nm upon excitation at 480 and 510 nm after 30 and 60 minutes of incubation of probes 4–6 with GSH at various pH (5.0–8.0) and without GSH after 60 minutes. Probe 4 (A); probe 5 (B); probe 6 (C) (5 μ M probe 4–6, 5 mM glutathione; DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, 37 $^{\circ}$ C).

cleavage was efficient when conjugates were added to the cells preincubated with additional GSH (Fig. 13), which is similar to the previous results (Fig. 8). The exception is conjugate 5 with the most susceptible carbonate linker between dye and model drug. Supposedly, the GSH concentration in HeLa cells is sufficiently high for maximal cleavage of the linker, and the preincubation with GSH does not accelerate the disruption of the disulfide bond.

The release of a drug inside the cells can be monitored via the OFF-ON effect by fluorescence microscopy. For this purpose, the HeLa cells were localized by staining the nuclei by Hoechst dye (blue color) and then treated with the conjugate 4, generating green emission due to the release of amino-BODIPY

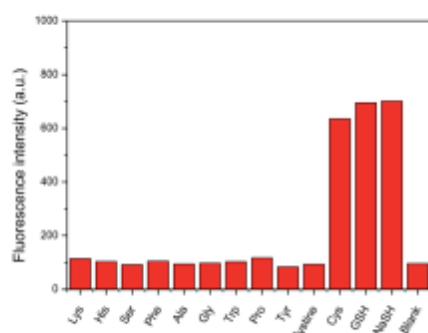


Fig. 10 Fluorescence intensity enhancement upon incubation of probe 4 (5 μ M) with various amino acids and NaSH (100 mM, DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, pH 7.4) after 60 min. (λ_{exc} = 480 nm, λ_{em} = 525 nm).

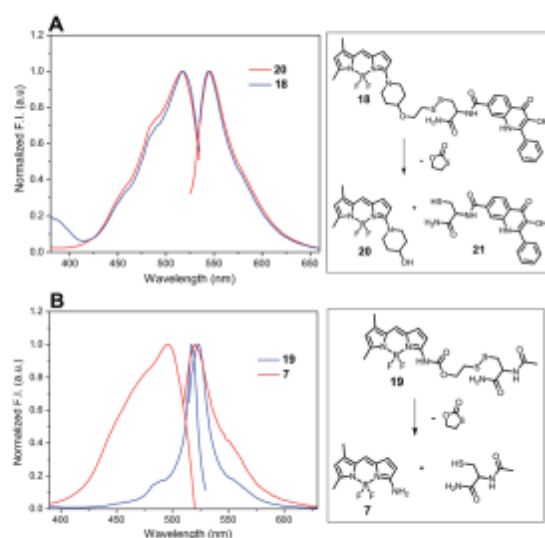


Fig. 11 Normalized excitation and emission profile of compounds 18, 19, and 20 (5 μ M in DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, pH 7.4).

7 and the corresponding drug in a time-dependent manner (Fig. 14).

The other possible applicability of the introduced system can be demonstrated by the construction of a molecular electronic “selector” of two sources for one appliance. Therefore, the derivative 4 was studied in DMSO/HEPES (2 : 1 v/v) at a concentration of 5 μ M. If none or only one of the above-mentioned conditions (lack of thiols and pH < 6) were fulfilled, the conjugate was stable (Fig. 9). However, when both conditions were fulfilled, the conjugate was cleaved. In the case of intensity of emission at 527 nm or 543 nm, the excitation at λ_{exc} = 510 nm before cleavage and at λ_{exc} = 480 nm after cleavage was similar (Fig. 15).

The molecular selector represented schematically in Fig. 16, wherein two circuits with different power supplies are connected to one light. The selector able to change the source is operated by the tandem of molecular gates AND and NAND operated by thiol and pH inputs. Before the conjugate cleavage

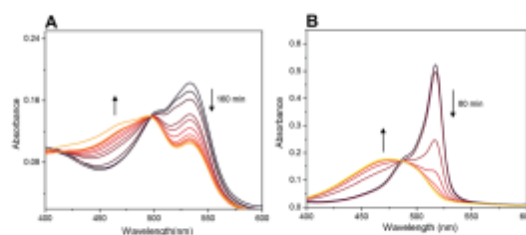


Fig. 12 Monitoring of cleavage of probes 4 (A) and 19 (B) by UV/Vis spectroscopy (5 μ M probes; 5 mM GSH, 0.1 M HEPES buffer, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C). For spectra highlighting change of fluorescence in time see Fig. 7 and S7.†

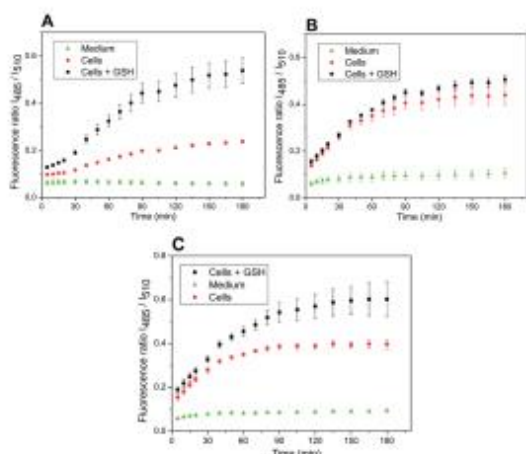


Fig. 13 Ratio of emission intensities at 525 nm upon excitation at 485 nm and 510 nm in HeLa cells corresponding to the cleavage of conjugate 4 (A), 5 (B), and 6 (C) within the prescribed period.

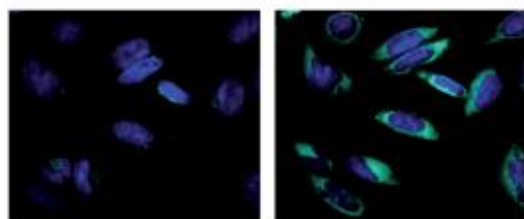


Fig. 14 Fluorescence intensity of released amino-BODIPY 7 (green color) after cleavage of conjugate 4 inside the HeLa cells pretreated with glutathione at time 0 min (left) and 120 min (right). $\lambda_{exc} = 485$ nm.

the output of operator NAND is “one” and source 520 nm is active. When the conjugate is cleaved NAND operator has the output “zero” and immediately operator AND produces output

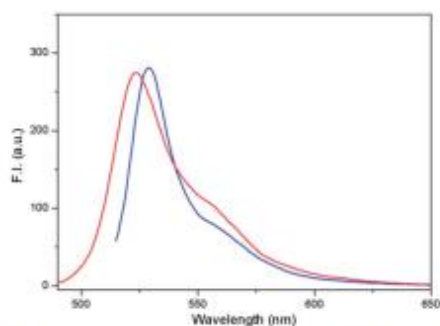
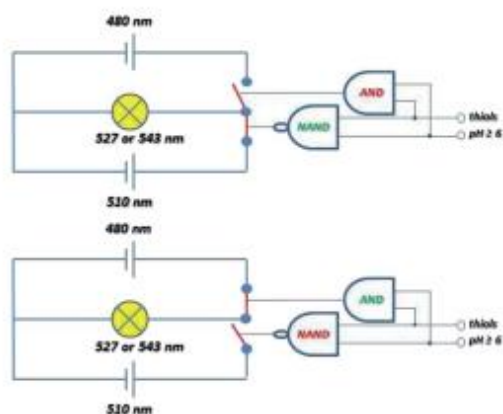


Fig. 15 Fluorescence emission spectra of compound 4 (5 μ M; DMSO/HEPES buffer 2 : 1, 0.1 M, pH 7.4) after excitation at 510 nm (blue) before cleavage and at 480 nm (red) after cleavage.



Thiols	pH ≥ 6.5	NAND	AND
0	0	1	0
0	1	1	0
1	0	1	0
1	1	0	1

Fig. 16 Schematic description of the selector based on cleavage of probe 4 able to switch the source of the light to maintain the same intensity and accuracy based on the truth table.

“one. The source 480 nm is than active. This circuitry imitates “emergency power unit” for the generation of energy for the “bulb” after the failure of the main source.

Conclusion

In conclusion, the conjugates of amino-BODIPY and model drugs bound by self-immolative linker were synthesized and analyzed using glutathione for their cleavage with respect to the change in fluorescent properties. The spectral differences between acylamino-BODIPY in the conjugates and amino-BODIPY released after the glutathione attack enabled the monitoring of the release based on two excitations/one emission ratiometric fluorescence or *via* the OFF-ON effect. Thus, the drug release corresponded to the release of the amino-BODIPY used for monitoring, rendering the system valuable for monitoring the release of non-fluorescent drugs. Moreover, the drug interactions are effectuated *via* their amino, hydroxy, or thiol group that renders versatility to the compound structure. The rate of drug release is dependent on the concentration of glutathione as well as on the pH of the solution. The monitoring of the model drug release *via* ratiometric fluorescence as well as the OFF-ON effect was also verified in cancer cells with native and artificially increased concentration of glutathione. Furthermore, the UV/Vis spectroscopy allows the estimation of the concentration of conjugates independently on the extent of cleavage.

The altered excitation wavelengths post-cleavage also showed similar emission, and hence, was used for the construction of molecular electronic selector. This selector was operated by two logic gates for irreversible switching of the two sources to maintain the intensity of one light.

The concept of acylamino-BODIPY conjugates affording the amino-BODIPY dye after thiol-mediated cleavage based on the altered fluorescence offers development of various applications in chemical biology and molecular electronics in the future.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the National Program of Sustainability (project LO1304) and by Technology Agency of the Czech Republic (project TE02000058).

References

- 1 Z.-R. Lu and P. Qiao, *Mol. Pharm.*, 2018, **15**, 3603–3616.
- 2 S. S. Kelkar and T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1879–1903.
- 3 T. Kowada, H. Maeda and K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4953–4972.
- 4 D. Zhang, J. R. Cochrane, A. Martinez and G. Gao, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 29735–29749.
- 5 S. Shanmugaraju and P. S. Mukherjee, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 16014–16032.
- 6 T. Rasheed, C. Li, M. Bilal, C. Yu and H. M. N. Iqbal, *Sci. Total Environ.*, 2018, **640–641**, 174–193.
- 7 W. Meng, Y. Chen, Y. Feng, H. Zhang, Q. Xu, M. Sun, W. Shi, J. Cen, J. Zhao and K. Xiao, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 6350–6357.
- 8 Q. Huang, Q. Li, Y. Chen, L. Tong, X. Lin, J. Zhu and Q. Tong, *Sens. Actuators, B*, 2018, **276**, 82–88.
- 9 R. Wang, R. Wang, D. Ju, W. Lu, C. Jiang, X. Shan, Q. Chen and G. Sun, *Analyst*, 2018, **143**, 5834–5840.
- 10 A. Chabok, M. Shamsipur, A. Yeganeh-Faal, F. Molaabasi, K. Molaei and M. Sarparast, *Talanta*, 2019, **194**, 752–762.
- 11 M. H. Lee, J. S. Kim and J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4185–4191.
- 12 P. Wu, X. Hou, J.-J. Xu and H.-Y. Chen, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8427–8442.
- 13 Q. Yang, J. Li, X. Wang, H. Peng, H. Xiong and L. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **112**, 54–71.
- 14 F. Q. Schafer and G. R. Buettner, *Free Radicals Biol. Med.*, 2001, **30**, 1191–1212.
- 15 R. A. Britten, J. A. Green and H. M. Warne, *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.*, 1992, **24**, 527–531.
- 16 M. S. Kasibhatla, S. D. Teeter and O. M. Colvin, *Biomarkers*, 2012, **17**, 671–691.
- 17 M. H. Lee, J. L. Sessler and J. S. Kim, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 2935–2946.
- 18 Y. Wang, L. Zhang, X. Zhang, X. Wei, Z. Tang and S. Zhou, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 5833–5846.
- 19 J. Lai, B. P. Shah, E. Garfunkel and K. B. Lee, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2741–2750.
- 20 S. Santra, C. Kaitanis, O. J. Santiesteban and J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 16680–16688.
- 21 M. H. Lee, J. Y. Kim, J. H. Han, S. Bhuniya, J. L. Sessler, C. Kang and J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 12668–12674.
- 22 X. Wu, X. Sun, Z. Guo, J. Tang, Y. Shen, T. D. James, H. Tian and W. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 3579–3588.
- 23 Y. Hu and F. Zeng, *Mater. Sci. Eng. C*, 2017, **72**, 77–85.
- 24 Y. Liu, Q. Pei, L. Chen, Z. Li and Z. Xie, *J. Mater. Chem. B*, 2016, **4**, 2332–2337.
- 25 S. Erbas-Cakmak, S. Kolenen, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, T. D. James, J. Yoon and E. U. Akkaya, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 2228–2248.
- 26 H. Li and J. C. Vaughan, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 9412–9454.
- 27 K. Motyka, J. Hlaváč, M. Soral and P. Funk, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 5060–5063.
- 28 K. Motyka, J. Hlaváč, M. Soral, P. Hradil, P. Krejčí, L. Kvapil and M. Weiss, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 715–717.
- 29 A. K. Jain, M. G. Gund, D. C. Desai, N. Borhade, S. P. Senthilkumar, M. Dhiman, N. K. Mangu, S. V. Mali, N. P. Dubash, S. Halder and A. Satyam, *Bioorg. Chem.*, 2013, **49**, 40–48.
- 30 M. Soral, J. Hlaváč, P. Hradil, I. Fryšová, M. Hajdúch, V. Bertolasi and M. Maloň, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**, 467–474.
- 31 V. Leen, T. Leemans, N. Boens and W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 4386–4396.
- 32 J. Roy, T. X. Nguyen, A. K. Kanduluru, C. Venkatesh, W. Lv, P. V. N. Reddy, P. S. Low and M. Cushman, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 3094–3103.
- 33 D. Giustarini, F. Galvagni, A. Tesi, A. Farolfi, M. Zanoni, S. Pignatta, A. Milzani, I. M. Marone, I. Dalle-Donne, R. Nassini and R. Rossi, *Free Radicals Biol. Med.*, 2015, **89**, 972–981.

AminoBODIPY Conjugates for Targeted Drug Delivery Systems and Real-Time Monitoring of Drug Release

Martin Porubský, Soňa Gurská, Jarmila Stanková, Marián Hajdúch, Petr Džubák, and Jan Hlaváč*

Cite This: *Mol. Pharmaceutics* 2021, 18, 2385–2396

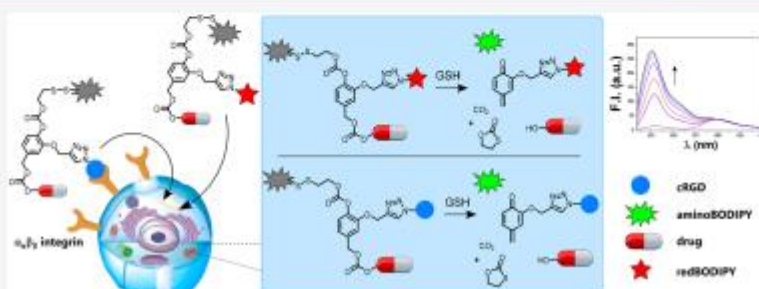
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: In this work, we report two concepts of drug delivery based on small-molecule drug conjugates with the ability of specific targeting and drug release monitoring via ratiometric fluorescence. The functionality of these concepts has been verified by two model systems consisting of three parts: (i) fluorescent aminoBODIPY for real-time detection of conjugate cleavage, (ii) a c(RGDfK) peptide specific for $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors targeting angiogenesis in most solid tumors or redBODIPY for conjugate cleavage monitoring via FRET, and (iii) pegylated-2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone (3HQ) as a model drug. The model drug release is based on a self-immolative disulfide linker sensitive to environments containing thiols, especially glutathione, which is overexpressed in cancer cells. The results show effective thiol-mediated cleavage of the fluorescent reporter and the subsequent liberation of the drug in a tube. The conjugate with c(RGDfK) was confirmed to penetrate the cells via interaction with integrin receptors. Drug release from this conjugate is possible to monitor inside the cells. Further, the synthetic approach to the conjugates and the method of fluorescence monitoring of the drug release have also been described.

KEYWORDS: BODIPY, drug delivery, controlled release, targeting, conjugate

INTRODUCTION

Glutathione in its reduced (GSH) or oxidized form (GSSG) is a ubiquitous component of all living organisms. It can prevent the oxidation of critical cellular components by reactive oxygen species, free radicals, and peroxides. It is also required in many aspects of the immune response.¹ Healthy cells maintain glutathione concentration at low submicromolar levels. However, in many cancers, the elevated glutathione levels protect against drugs and establish resistance only after developing resistance to chemotherapeutics.² The high concentration of GSH in cancer cells (up to 10 mM),^{3,4} which is approximately 100–1000 times higher than that in human plasma and blood, is considered a suitable target for effective stimuli triggered cargo delivery.^{5,6} Many small-molecule drug conjugates (SMDCs) have been synthesized/studied utilizing thiol-cleavable linkers involving various formulations such as dendrimers,⁷ polymers,⁸ nanoparticles,⁹ and micelles.¹⁰

Although the activation of these prodrugs under particular conditions in tumors is advantageous for enhancing the specificity of anticancer drugs, the next major step toward improving the therapeutic index involves the active targeting of drugs to cancerous tissues.¹¹ One of the most effective approaches for the selective delivery of drugs to the appropriate cells is based on the interaction of a drug–ligand conjugate able to target the specific receptor.^{12–16} A possible receptor that can be targeted is the heterodimeric transmembrane receptor integrin $\alpha_v\beta_3$,¹⁷ which is highly expressed on activated endothelial cells and newborn vessels, but it is absent in resting endothelial cells and most normal organ

Received: March 18, 2021

Revised: April 22, 2021

Accepted: April 23, 2021

Published: May 7, 2021



systems. This fact makes this receptor a suitable target for the antiangiogenic cancer therapy.¹⁸ In addition, integrin $\alpha_v\beta_3$ is also frequently overexpressed in tumor cells, as observed in colon,¹⁹ pancreas,²⁰ and lung²¹ cancers, melanomas,²² brain tumors,²³ or breast²⁴ cancers.

The integrins overexpressed in cancer cells interact with the RGD peptide motif (Arg-Gly-Asp), especially in its cyclic form (cRGD).²⁵ Cyclic RGD peptides conjugated with anticancer drugs, such as doxorubicin,²⁵ camptothecin,²⁶ and paclitaxel,²⁷ were shown to have improved therapeutic activities in vitro as well as in vivo as compared to the corresponding free drugs. In addition, cRGD binds to the integrins on many cancer cells, resulting in active internalization. Recently, it was shown that cRGD peptides could selectively bind to $\alpha_v\beta_3$ integrins over $\alpha_5\beta_1$ integrins with a very high affinity, an IC_{50} in the nanomolar range, and a negligible difference between the effects of the conjugated drug and free ligand.²⁸ The $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeting moiety was implemented with the cilegitide-c(RGDfV) conjugate, which has been promoted to clinical trials for the treatment of glioblastoma.²⁹

The specific responses of drug delivery systems in the presence of a selected marker, causing the consequent drug release, give rise to the development of targeted small-molecule drug conjugates (T-SMDCs) or theranostics—the combination of therapeutics and diagnostics in one material.³⁰ The significance of these SMDCs in therapy is well discussed in the recent reviews and perspective.^{31–33} Although the visualization is commonly performed via fluorescence, this technique usually relies on the fluorescent intensimetric or ratiometric response of the drugs such as camptothecin or doxorubicin.^{34,35} Only a few drug conjugates contain a universal and simple fluorescent dye, which allows drug uptake and release monitoring.^{35,36} Therefore, in this study, we have used aminoBODIPY as reported in our previous work.³⁷ Generally, BODIPY dyes are known for their exceptional fluorescence properties such as high quantum yield, extinction coefficient, and low photobleaching.³⁸

Herein, we report a model system that overcomes some of the abovementioned drawbacks. We also describe the synthesis, characterization, optical properties, and biological properties of two conjugates, namely, (i) the fluorescent dye–cRGD–drug conjugate designed for integrin-targeted delivery of (non)fluorescent drugs, providing a drug-independent fluorescent response to high concentrations of glutathione causing the drug release and (ii) the aminoBODIPY–redBODIPY–drug conjugate for the ratiometric fluorescence monitoring of glutathione-triggered drug release utilizing the FRET effect (see Figure 1). Both conjugates comprise a central unit based on the *p*-hydroxybenzyl moiety to which the fluorescent dye is bound by the cleavable disulfide

self-immolative linker, as described originally by Satyam.³⁹ The cRGD targeting moiety (conjugate 1) or the second BODIPY dye (conjugate 2) is bound via a non-cleavable linker. After the glutathione attack, the disulfide linker releases the aminoBODIPY dye, and the central unit undergoes a 1,6-elimination reaction producing the quinone-methide moieties,^{40,41} resulting in the release of the drug (Figure 1).

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods. For the preparation and characterization of the compounds, LC/MS analyses were performed by UHPLC/MS via a UHPLC chromatograph (Acquity) with a PDA detector, a single quadrupole mass spectrometer (Waters), and an X-Select C18 column at 30 °C and a flow rate of 600 μ L/min. The mobile phase consisted of (A) 0.01 M ammonium acetate in water and (B) acetonitrile, with a linear gradient over the course of 2.5 min; at the conclusion of the gradient, the final ratio was maintained for 1.5 min. The column was re-equilibrated with 10% B for 1 min. The APCI ionization was operated at a discharge current of 5 μ A, a vaporizer temperature of 350 °C and a capillary temperature of 200 °C. Compound purity was determined using the ratio of the appropriate peak area to sum of the areas of all peaks of the mixture. Areas were determined by integration of the peaks from the PDA detector response. The purity of the final compounds was determined by this method and was estimated to be >95%.

The purification was performed using a semipreparative HPLC with a Waters 1500 series HPLC equipped with a 2707 autosampler, a 1525 binary HPLC pump, a 2998 Waters photodiode array detector, and a Waters Fraction Collector III with YMC C18 a reversed-phase column (20 $\times$ 100 mm, 5 μ m particle size). The mobile phase consisted of acetonitrile and a 10 mM aqueous ammonium acetate gradient over 6 min.

NMR spectra were measured in $CDCl_3$, $DMSO-d_6$, or CD_3OD using a JEOL ECX-500 (500 MHz) spectrometer. The chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and the coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz).

The HR-MS analysis was performed using an Orbitrap Elite high-resolution mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) operating at positive full-scan mode (120,000 FWHM) in the range of 2000–3000 m/z . The settings for electrospray ionization were as follows: an oven temperature of 300 °C, a sheath gas of 8 arb. units, and a source voltage of 1.5 kV. Samples were diluted to a final concentration of 20 μ mol/L with 0.1% formic acid in water and methanol (50:50 v/v).

Rink amide resin and Fmoc-amino acids were purchased from AAPPTec (Louisville, KY). Solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, IL, www.sigmaaldrich.com).

Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer equipped with a thermostat (FL1009M015). The excitation and emission slits were 5 nm. Absorption spectra were recorded on a Cary 300 UV/VIS spectrophotometer (UV111M031, Agilent).

Compound 4. Compound 4 was prepared according to the previously published procedure.¹¹

Compound 5. Compound 5 was prepared according to the previously published procedure.¹¹

Compound 6. To a solution of the benzyl alcohol 5 (0.87 g, 4.89 mmol, 1.1 equiv) in dry DMF (20 mL) was added imidazole (366 mg, 1 equiv) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (811 mg, 1.1 equiv). The resulting solution was

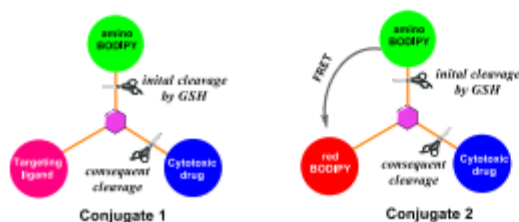


Figure 1. Suggested design of small-molecule drug conjugates.

stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was then diluted with Et₂O (150 mL) and washed with water five times to get rid of traces of DMF. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified using column chromatography (DCM/hexane 1:1) to give 1.27 g of pure compound (91% yield). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.03–7.01 (m, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.85–6.82 (m, 1H), 5.53 (s, 1H), 4.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 4.67–4.66 (m, 2H), 2.54 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.09 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 145.11, 144.72, 133.71, 120.37, 114.82, 111.23, 78.32, 76.21, 64.91, 57.15, 26.12, 18.55, –5.04. MS (ESI): calculated for C₁₆H₂₃O₃Si: 291.142. Found: 291.656.

Compound 7. Compound 7 was prepared according to our previously published procedure.³⁷

Compound 8. To a solution of phenol 6 (147 mg, 0.503 mmol, 1 equiv) in dry DCM (6 mL) were added TEA (84 μL, 1.2 equiv), DMAP (74 mg, 1.2 equiv), and the solution of the amino-BODIPY disulfide linker 7 (280 mg, 1 equiv) in dry DCM (2 mL). The reaction mixture was then stirred for 30 min at room temperature. The mixture was then diluted with Et₂O (50 mL) and washed with water three times and then with brine solution. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified using column chromatography (DCM) to give 299 mg of pure compound 8 (81% yield). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.92–6.89 (m, 1H), 6.89–6.87 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.74–4.71 (m, 4H), 4.50 (dt, *J* = 10.6, 6.6 Hz, 4H), 3.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 0.95 (s, 9H), 0.11 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 155.64, 153.17, 151.56, 149.71, 149.18, 145.09, 141.21, 140.90, 139.31, 133.66, 130.94, 129.77, 122.23, 122.09, 120.32, 119.02, 112.20, 111.23, 109.35, 78.31, 76.16, 66.55, 64.44, 64.27, 56.82, 37.14, 37.10, 26.09, 26.05, 26.04, 26.03, 26.02, 18.48, 14.65, 11.35, –5.17. MS (ESI): calculated for C₃₃H₄₃BF₂N₃O₇Si⁺: 734.237. Found: 734.582.

Compound 9. To a solution of compound 8 (340 mg, 0.46 mmol, 1 equiv) in methanol (20 mL) was added pTSA (13 mg, 0.15 equiv), and the resulting solution was stirred for 2 h at room temperature. The reaction mixture was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with water three times. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to yield 255 mg of crude product (89% yield), which was used without further purification. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (s, 1H), 7.16–7.12 (m, 2H), 7.05–6.95 (m, 4H), 6.94–6.84 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 4.75–4.73 (m, 2H), 4.67 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.54–4.50 (m, 2H), 4.50–4.46 (m, 2H), 3.08–3.04 (m, 2H), 3.02–2.99 (m, 2H), 2.56–2.53 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.23 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 155.72, 153.07, 151.61, 149.36, 140.35, 139.95, 130.94, 122.61, 122.13, 120.12, 113.08, 109.36, 78.17, 76.32, 66.59, 64.91, 64.29, 56.92, 42.96, 37.23, 37.09, 14.68, 11.38. MS (ESI): calculated for C₂₇H₂₉BF₂N₃O₇Si⁺: 620.1503. Found: 620.406.

Compound 10. To a solution of alcohol 9 (95 mg, 0.153 mmol, 1 equiv) in dry THF (4 mL) were added pyridine (25 μL, 3 equiv) and the solution of 4-nitrophenylchloroformate (93 mg, 2 equiv) in dry THF (1 mL). The reaction mixture was stirred for 2.5 h at room temperature and then diluted with EtOAc (50 mL) and washed with water three times and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated

under reduced pressure. The crude product was purified using column chromatography (DCM/hexane 1:1 to DCM) to afford 115 mg of pure product (91% yield). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.26–8.22 (m, 1H), 8.11–8.08 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.18 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.06 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.86–6.83 (m, 3H), 5.25 (s, 2H), 4.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 4.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.20 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 162.19, 155.91, 155.53, 153.02, 152.46, 151.65, 149.37, 145.50, 141.56, 141.29, 140.93, 133.69, 133.48, 130.84, 129.68, 126.21, 125.38, 122.95, 122.19, 121.85, 115.70, 114.78, 109.12, 77.78, 76.63, 70.33, 66.78, 64.28, 56.96, 37.07, 37.03, 14.19, 11.28. MS (ESI): calculated for C₃₄H₃₂BF₂N₄O₁₁Si⁺: 785.156. Found: 785.754.

Compound 11. The compound was synthesized according to our previously published procedure.³⁷

Compound 12. To a solution of the activated carbonate 10 (93 mg, 0.119 mmol, 1 equiv) in dry DMF (1.5 mL) were added TEA (33 μL, 2 equiv) and the solution of 3HQ 11 (49 mg, 1 equiv) in dry DMF (0.5 mL). The resulting solution was stirred overnight at room temperature. After consumption of the starting material, the reaction mixture was diluted with EtOAc (50 mL) and successively washed with water three times and brine solution. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified using column chromatography (DCM/EtOAc 1:1 to DCM/MeOH 50:1) to give 90 mg (72% yield) of the desired product. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10.94 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.60–7.50 (m, 2H), 7.47–7.36 (m, 3H), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 4.9 Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 4.49 (dt, *J* = 14.6, 6.6 Hz, 4H), 4.45–4.42 (m, 2H), 3.80–3.74 (m, 2H), 3.66 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H), 3.64–3.58 (m, 4H), 3.05 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 165.58, 155.64, 153.10, 152.88, 151.54, 149.59, 149.27, 144.08, 141.27, 140.55, 138.74, 134.25, 133.63, 133.08, 132.88, 130.94, 130.81, 130.67, 129.77, 128.85, 128.62, 128.19, 126.53, 123.52, 122.59, 122.13, 121.47, 120.58, 118.96, 114.25, 109.28, 77.98, 76.47, 72.00, 70.72, 70.07, 69.81, 68.98, 66.63, 64.42, 64.25, 61.78, 57.00, 37.11, 37.09, 14.63, 11.33. MS (ESI): calculated for C₅₀H₅₀BF₂N₄O₁₅Si⁺: 1059.277. Found: 1059.468.

Compound 1. To the starting compound 12 (40 mg, 0.038 mmol, 1 equiv) in DMF/ACN (1 mL) were added CuSO₄·5H₂O (5 mg, 0.5 equiv), sodium ascorbate (4 mg, 0.5 equiv), and cRGD peptide 13 (85 mg, 2 equiv; for the synthesis, see Scheme S1), and the resulting solution was heated to 50 °C and stirred overnight. The reaction was monitored by LC/MS to the full conversion of the starting material. Then, the reaction mixture was diluted with DCM (50 mL) and washed with water three times. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified using preparative HPLC with (ACN/CH₃COONH₄ buffer 40 to 70% gradient) to afford 40 mg (56% yield) of pure compound 1. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.44 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.19–8.12 (m, 3H), 7.95 (s, 3H), 7.90–7.85 (m, 1H), 7.67–7.56 (m, 6H), 7.39 (s, 1H), 7.25–7.20 (m, 5H), 7.15 (dd, *J* = 10.7, 2.7 Hz, 3H), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.79

(d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.59–4.51 (m, 4H), 4.48–4.44 (m, 2H), 4.42 (dd, $J = 11.3, 5.5$ Hz, 4H), 4.28–4.22 (m, 1H), 4.06 (dd, $J = 15.3, 7.9$ Hz, 2H), 3.86–3.78 (m, 6H), 3.61 (dd, $J = 5.8, 3.6$ Hz, 2H), 3.57–3.45 (m, 14H), 3.44–3.40 (m, 3H), 3.08 (t, $J = 6.1$ Hz, 3H), 3.05–2.99 (m, 7H), 2.41 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.74–1.71 (m, 2H), 1.61–1.53 (m, 2H), 1.43–1.38 (m, 2H), 1.36–1.29 (m, 2H), 1.10–1.01 (m, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 172.08, 171.08, 170.52, 169.06, 165.01, 162.49, 156.67, 152.56, 152.27, 149.47, 141.97, 139.65, 138.84, 134.41, 132.48, 132.01, 131.64, 130.62, 129.05, 128.77, 128.69, 128.05, 127.53, 126.16, 125.67, 124.93, 122.75, 122.43, 120.29, 113.91, 72.34, 70.15, 69.95, 69.90, 69.74, 69.56, 69.51, 68.68, 68.28, 66.25, 64.68, 63.68, 62.01, 60.20, 53.97, 51.61, 49.43, 48.84, 45.86, 45.83, 43.16, 40.39, 37.86, 37.18, 36.24, 35.94, 28.57, 25.92, 25.86, 24.91, 22.86, 14.16, 10.91. MS (ESI): calculated for $\text{C}_{85}\text{H}_{104}\text{BF}_2\text{N}_{16}\text{O}_{26}\text{S}_2^+$: 1877.6805. Found: 1877.483.

Compound 2. To a solution of compound 12 (127 mg, 0.120 mmol, 1 equiv) in DMF/ACN (3 mL) were added $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (30 mg, 1.0 equiv), sodium ascorbate (24 mg, 1.0 equiv), and red-BODIPY 14 (116 mg, 1 equiv; for the synthesis, see Scheme S2). The resulting solution was stirred overnight at room temperature. Then, it was diluted with DCM (50 mL) and washed with water three times and brine solution. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The obtained crude product was purified using preparative HPLC with (ACN/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ buffer 50 to 80% gradient) to afford 35 mg (15% yield) of pure compound 2. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.32 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 9.85 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J = 17.8$ Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (dd, $J = 8.4, 5.6$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.88–7.80 (m, 4H), 7.63–7.52 (m, 6H), 7.49–7.43 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 7.25–7.23 (m, 1H), 7.21 (dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, 1H), 7.17 (s, 2H), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 33.2, 8.2, 1.7$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 6.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 5.19 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 5.12 (s, 1H), 4.57–4.52 (m, 3H), 4.46–4.40 (m, 6H), 4.16 (s, 4H), 4.11 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.83 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 3.78 (dd, $J = 9.4, 5.2$ Hz, 6H), 3.73 (s, 1H), 3.66 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 3.63–3.60 (m, 6H), 3.57–3.51 (m, 18H), 3.47 (s, 2H), 3.44–3.41 (m, 6H), 3.23 (d, $J = 5.4$ Hz, 6H), 3.10–3.06 (m, 2H), 3.05–3.01 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.22 (d, $J = 3.4$ Hz, 3H), 1.44 (d, $J = 5.7$ Hz, 3H), 1.39 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 169.39, 168.64, 164.97, 154.95, 153.89, 152.69, 152.55, 152.26, 151.31, 149.90, 149.46, 148.83, 148.45, 143.74, 142.26, 141.96, 141.84, 141.58, 140.08, 139.65, 139.21, 138.69, 137.06, 134.39, 133.05, 132.50, 132.34, 131.98, 131.56, 131.17, 130.62, 130.25, 129.40, 129.30, 129.23, 128.93, 128.75, 128.67, 128.55, 128.29, 127.47, 125.66, 124.92, 123.66, 122.76, 122.39, 121.09, 120.79, 120.29, 119.77, 118.92, 117.97, 116.07, 114.15, 113.89, 113.11, 109.05, 72.33, 71.26, 70.38, 70.27, 70.00, 69.89, 69.85, 69.82, 69.73, 69.58, 69.54, 69.00, 68.87, 68.67, 68.54, 68.43, 68.27, 66.23, 64.66, 63.78, 62.00, 60.19, 58.02, 58.00, 54.78, 49.43, 36.12, 35.92, 28.99, 22.06, 14.39, 14.30, 14.15, 10.89. MS (ESI): calculated for $\text{C}_{98}\text{H}_{115}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_{10}\text{O}_{27}\text{S}_2^+$: 2025.749. Found: 2025.149.

Quantum Yield Determination. Quantum yields (Φ) were calculated by the standard procedure using fluorescein as a reference ($\Phi = 0.91$) and according to eq 1.

$$\Phi = \Phi_R \times I/I_R \times A_R/A \times \eta^2/\eta_R^2 \quad (1)$$

where Φ_R is the quantum yield of the reference fluorophore, I is the area under the emission peak, A is the absorbance at the excitation wavelength, and η is the refractive index of the solvent.

FRET Efficiency. FRET efficiency was calculated for conjugate 2 using standard eq 2.

$$\text{FRET} = F_A/(F_A + F_D) \quad (2)$$

where F_A is the emission intensity of the acceptor and F_D is the emission of the donor.

Cleavage of Conjugates 1 and 2 by Glutathione and Its LC/MS Monitoring. First, 0.25 mL of the conjugate 1 and 2 solution (2 mM) in DMSO was mixed with 0.1 mL of GSH solution (50 mM) in HEPES (0.1 M, pH 7.4) and diluted with 0.65 mL DMSO/HEPES (2:1 v/v). The mixture was heated to 37 °C and analyzed using LC/MS at the same time.

Cleavage of Conjugates 1 and 2 by Glutathione and Its Fluorescence Monitoring. First, 5 μL of the solution of conjugate 1 or 2 (1 mM) in DMSO was mixed with 20, 60, or 100 μL of GSH solution (50 mM) in HEPES buffer (0.1 M; pH 7.4) and diluted with 1 mL of HEPES buffer (0.1 M; pH 7.4) or DMSO/HEPES buffer (2:1). Then, the mixture was heated to 37 °C and the fluorescence was measured at the same time.

Fluorescence Microscopy. HeLa cells (10,000 well $^{-1}$, 100 μL per well) were seeded into 96 CellCarrier plates (PerkinElmer, USA) for live cell fluorescence imaging and pre-incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 to adhere. The first group of cells was pretreated with 1 mM NEM for 30 min, then rinsed with fresh media, incubated with test compounds 1 and 2 (50 μM) for 1 h, and again rinsed with fresh media. The second group of cells was only incubated with test compounds 1 and 2 (50 μM) for 1 h and rinsed with fresh media. Finally, the third group of cells was incubated with test compounds 1 and 2 (50 μM) for 1 h and rinsed with fresh media with 20 mM GSHEt. The live-cell imaging was performed using a Cell Voyager CV7000 (Yokogawa, Japan) spinning disc confocal microscopy system at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Living cells were monitored with a 60 $\times$ water immersion objective at 0 and 2 h. Microscopy images were taken separately with excitation at 488 nm using a laser and emissions detected using band pass filters (BP 515/30 and BP 595/20). All the obtained images were post-processed, background-subtracted, and deconvolved using Image J software. Fluorescence intensity quantification of microscopy images was interpreted as a median of two technical replicates calculated in a total of 10 microscopy fields.

Intracellular Cleavage of Conjugate 1 by Glutathione and Its Fluorescence Monitoring. HeLa cells (10,000 well $^{-1}$, 100 μL per well) were seeded into 96 CellCarrier plates (Perkin Elmer, USA) and incubated overnight at 37 °C and 5% CO_2 in order to adhere. The first group of cells was pretreated with 1 mM NEM for 30 min, then rinsed with fresh media, incubated with test compound 1 (50 μM) for 10 min, and again rinsed with fresh media. The second group of cells was only incubated with test compound 1 (50 μM) for 10 min and rinsed with fresh media. Finally, the third group of cells was incubated with test compound 1 (50 μM) for 10 min and rinsed with fresh media with 20 mM GSHEt. The fluorescence intensity was measured using an EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, USA), with two reads for each time point and each conjugate (conjugate 1 - first with

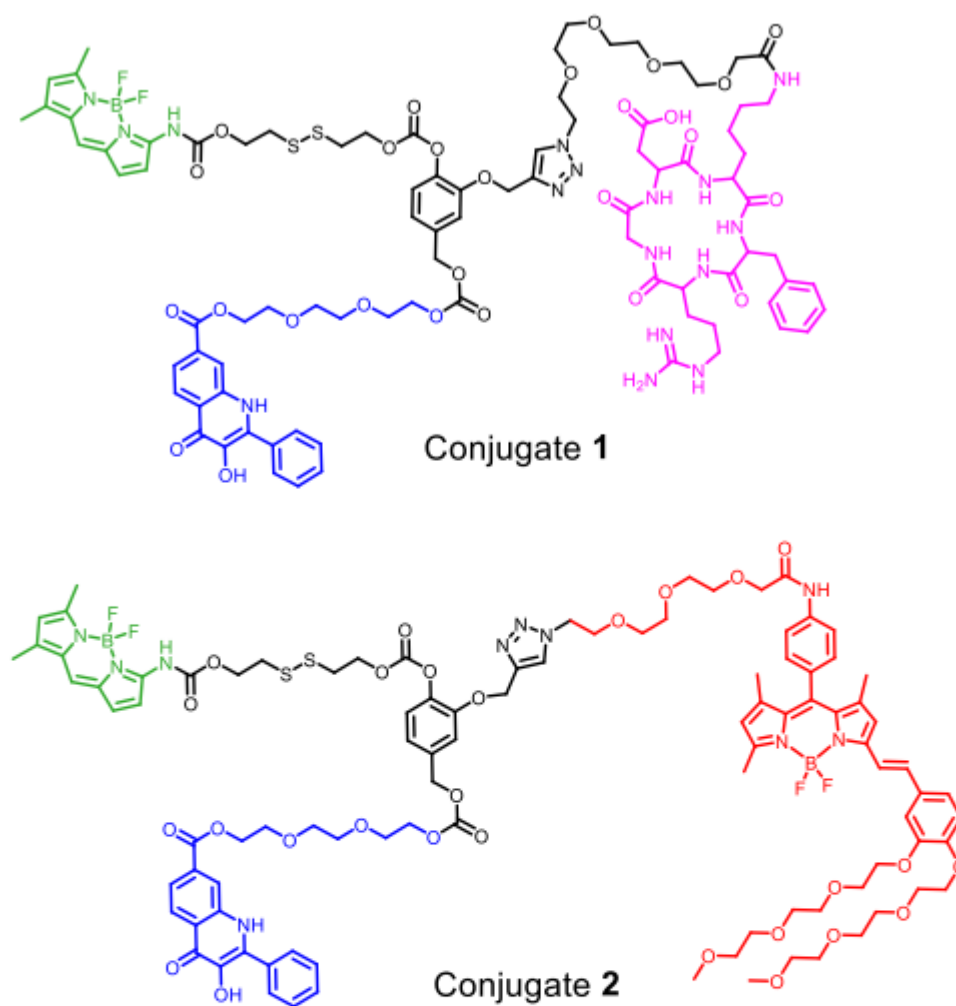


Figure 2. Structures of SMDCs aminoBDP-cRGD-3HQ **1** and T-SMDC aminoBDP-redBDP-3HQ **2**.

excitation at 485 nm/emission at 530 nm and second with excitation at 510 nm/emission at 530 nm).

cRGD Binding Assay. HeLa cells ($10,000 \text{ well}^{-1}$, $100 \mu\text{L}$ per well) were seeded into 96 CellCarrier plates (Perkin Elmer, USA) and incubated overnight at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$ in order to adhere. The cells were pretreated with a free RGD peptide in concentration from 0 to $100 \mu\text{M}$ for 30 min, and after that, the content of the wells was discarded and the cells were treated with conjugate **1** at a concentration of $10 \mu\text{M}$ for 10 min. Subsequently, the cells were rinsed with fresh media and the fluorescent emission intensity was measured using an EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, USA), with excitation at 485 nm and emission at 530 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The structures of conjugates **1** and **2** are presented in Figure 2. For both compounds, we chose 4-(hydroxymethyl) benzene-1,2-diol, a versatile building central unit suitable for

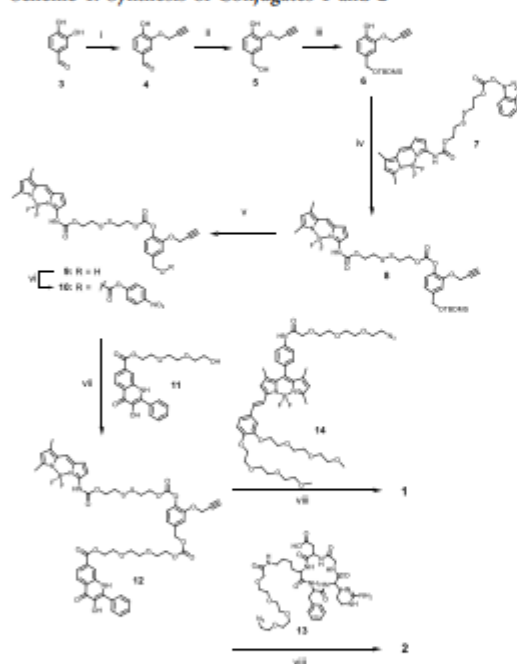
incorporating up to three different moieties as follows: For conjugate **1**, (i) the model drug 2-phenyl-3-hydroxyquinolin-4-(1H)-one(3HQ), (ii) integrin-specific cRGD-peptide-targeting ligand, and (iii) the previously characterized aminoBODIPY fluorescent dye for cleavage monitoring.⁴² For conjugate **2**, it consisted of (i) aminoBODIPY dye, serving as a “green light” FRET donor; (ii) redBODIPY dye as the FRET acceptor; and (iii) 3HQ as the model drug bound to the central unit via a carbonate bond. The tethering of the fluorescent aminoBODIPY dye to the central frame is provided by the disulfide self-immolative linker for both probes. The linker allows the controlled release of the drug upon stimulation, such as the reductive microenvironment of cancer cells (e.g., elevated concentrations of GSH or thiols), so that it can subsequently liberate the drug via 1,6-elimination and lead to the formation of quinone methide (QM) species (Figure 1 and Scheme 2). Both conjugates are capable of making a ratiometric response based on the emission intensity measurements at one

wavelength after applying two different excitation wavelengths (conjugate 1) or intensities of two emission wavelengths after one excitation (conjugate 2).

In both prepared conjugates (Figure 2), we have used a derivative of 2-phenyl-3-hydroxyquinolin-4-(1H)-one as a model drug possessing the anticancer activity but suffering from poor aqueous solubility and often causing the toxicity to normal healthy cells.^{42–45} Generally, binding such a compound to these developed conjugates could improve their physicochemical properties, the selectivity toward cancer cells, and pharmacological properties. The introduction of amino-BODIPY fluorophore, as the reporter responding to the presence of an elevated concentration of thiols together with a targeting unit, could lead to the formation of a targeted theranostic agent suitable for the studies in the field of personalized medicine.⁴⁶

Synthesis and Characterization of Conjugates 1 and 2. The synthesis of conjugates 1 and 2 is depicted in Scheme 1.

Scheme 1. Synthesis of Conjugates 1 and 2^a



^aConditions: (i) propargyl bromide, NaH, DMSO, 0 °C, on; (ii) NaBH₄, MeOH/H₂O, 0 °C, 1 h; (iii) imidazole, TBDMS-Cl, DMF, rt, 1 h; (iv) DMAP, TEA, DCM, rt, 30 min; (v) pTSA, MeOH, rt, 2 h; (vi) 4-nitrophenylchloroformate, pyridine, THF, rt, 2.5 h; (vii) TEA, DMF, rt, on; (viii) CuSO₄·5H₂O, sodium ascorbate, ACN/DMF, 50 °C, on.

To form a central frame, 3,4-dihydroxy benzaldehyde 3 was alkylated with propargyl bromide and reduced with NaBH₄ to form 4-(hydroxymethyl)-2-(prop-2-yn-1-yloxy)phenol 5, with 31% yield according to the described procedure.¹¹ The benzylic hydroxyl group of intermediate 5 was then protected with *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMS-Cl) to afford a derivative 6 with 91% yield after purification. Compound 6 was

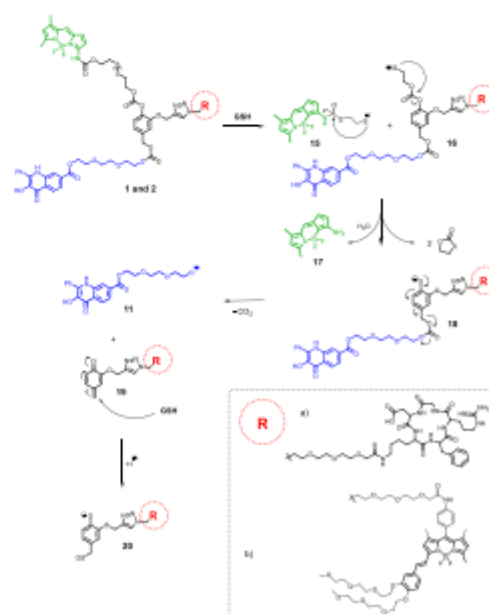
then reacted with amino-BODIPY disulfide linker 7 with the HOBt-activated carbonate group, which is synthesized according to our published procedure,³⁷ to form compound 8 with 81% yield after purification. The TBDMS protecting group was then removed under acidic conditions using pTSA and reacted with *p*-nitrophenyl chloroformate to obtain the acylated compound 10 with 96% yield.

In the next step, the 3HQ drug 11 was incorporated into the central QM frame under basic conditions through a carbonate bond using triethylamine to afford compound 12 with 45% yield after purification. Compound 12 was then used as a precursor to prepare the final conjugates 1 and 2 via a copper(I)-catalyzed cycloaddition reaction with azide 13 or 14, respectively.

The cRGD peptide derivative 13 was synthesized using the solid-phase peptide synthesis on the 2-chlorotrityl resin. RedBODIPY azido derivative 14 was synthesized by the standard Knoevenagel condensation of azido-BODIPY with 3,4-bis-[2-[2-(2-methoxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy]-benzaldehyde, available similarly to that from the reported procedures³⁷ (see the Experimental Section). This BODIPY dye motif was considered for its optical properties as a suitable FRET acceptor for the green light-emitting amino-BODIPY 17.³⁷

LC/MS Monitoring of the GSH Cleavage. To demonstrate the effective cleavage of the drug and the potential formation of any byproducts during the cleavage, we performed the UHPLC analysis with MS detection. The mechanism for the GSH-mediated cleavage of conjugates 1 and 2 is depicted in Scheme 2. In the first step, the disulfide bridge is attacked by the thiol group of GSH. After disrupting the SS bond, the linker's self-immolation occurs, where it forms

Scheme 2. Mechanism for the GSH-Promoted Cleavage of Conjugates 1 and 2 to Quinone-Methide Species 19 with the Subsequent Liberation of the Drug 11 via 1,6-elimination



two molecules of thiolactone and leaves the free aminoBODIPY 17 and intermediate 18. The push–pull effect of electrons in this intermediate causes the release of the drug 11 via 1,4-elimination and the subsequent formation of quinone methide 19. This QM 19, being a very good Michael acceptor, can be promptly captured by a nucleophile – GSH to form a fully aromatic system 20.

The obtained LCMS data showed that the total cleavage of conjugates 1 and 2 occurred within 80 and 60 min, respectively, along with the formation of the aminoBODIPY 17. In the case of conjugate 1, the formation of intermediate 16a is also observed. Similarly, the process of the elimination reaction of conjugate 2 to 19b and the liberation of the drug 11 occurred along with the formation of intermediate 16b (Figure 3).

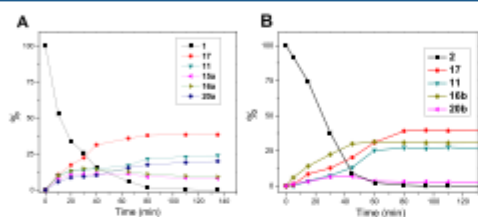


Figure 3. (A) GSH-mediated cleavage of the conjugate 1 (0.5 mM, 5 mM GSH, DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, 37 °C) and (B) GSH-mediated cleavage of the conjugate 2 (0.5 mM, 2 mM GSH, DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, 37 °C), with the detection of resulting products by LCMS.

Optical Properties of SMDs 1 and 2. According to the results described previously,³⁷ the optical response of acylaminoBODIPY in conjugate 1 and the released aminoBODIPY 17 should differ significantly in excitation wavelengths, while the emission maxima should remain almost identical. To demonstrate the validity of this feature of conjugate 1, we have compared the excitation and emission spectra of the newly synthesized cRGD-aminoBODIPY-3HQ conjugate 1 to aminoBODIPY 17. As shown in Figure 4A, the comparison of optical properties fits well with the previously described system,³⁷ allowing the OFF–ON ratiometric drug release monitoring. The fluorescence quantum yield (Φ_f) of compound 1 in HEPES was calculated to be 0.15, taking fluorescein as a reference. The quantum yield of the aminoBODIPY dye released after conjugate disruption was previously calculated to be 0.77 (in HEPES buffer).³⁷

In the case of conjugate 2 measured in DMSO/HEPES buffer, the emission of bound aminoBODIPY is expectedly transferred to redBODIPY and used for its excitation. The FRET between these two dyes is depicted in Figure 4B. The first excitation maximum belongs to the bound aminoBODIPY as observed from the comparison of excitation spectra of conjugates 1 and 2 at around 530 nm can be attributed to aminoBODIPY itself. The second emission maximum of compound 2 at 592 nm belongs to redBODIPY. This emission can be achieved after excitation of aminoBODIPY (the first excitation maximum) or by redBODIPY itself (the second excitation maximum). The FRET effect is considerable in DMSO/HEPES buffer but decreases with a lower DMSO concentration (Figure 4C). The advantage of the FRET system

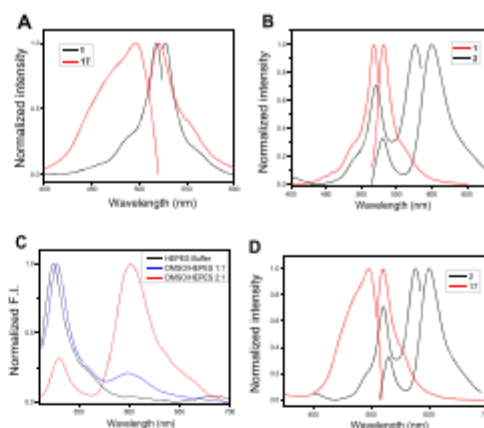


Figure 4. (A) Normalized excitation and emission spectra of conjugate 1 and aminoBODIPY 17 (HEPES buffer, 0.1 M, pH 7.4). (B) Normalized excitation and emission spectra of conjugates 1 and 2 (DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, pH 7.4). (C) Normalized emission spectra of FRET conjugate 2 in different solvents. Excitation wavelength $\lambda_{exc} = 510$ nm. (D) Normalized excitation and emission spectra of conjugate 2 and aminoBODIPY 17.

2 also includes the fact that in the case of excitation around 510 nm, not only the conjugated aminoBODIPY but the released aminoBODIPY 17 also emits light at around 530 nm (Figure 4D). Due to the significant difference in quantum yields of bound and released aminoBODIPY, the emission ratio in the given environment should increase much more significantly during the cleavage of the conjugate than during the suppression of FRET due to other effects.

To prove the ability to monitor the fluorescence of conjugates 1 and 2 in GSH-mediated cleavage and the subsequent liberation of the drug, we performed a series of fluorescence measurements using GSH in HEPES buffer and DMSO/HEPES buffer (2:1), in which conjugate 2 exhibited a significant FRET. GSH concentration used in our experiments was in the range generally found in many cancer cells (i.e., up to 5 mM).³⁴

As shown in Figure 5, upon subjecting conjugate 1 to 5 mM concentration of GSH, the rapid liberation of aminoBODIPY occurred via disrupting the disulfide bond. Similarly, the self-immolative elimination of thiolactone (Scheme 2) caused the increase in the fluorescence intensity at 530 nm with excitation at 485 nm in HEPES as well as the 2:1 HEPES/DMSO mixture (Figure 5A,C). In contrast, the emission intensity at 530 nm excited at 510 nm, belonging to the conjugate, slightly increases with time in HEPES but decreases in the DMSO/HEPES mixture at a ratio of 2:1 (Figure 5B,D). When the emission intensity ratio of 530 nm (excited at 485 nm) and 510 nm (i.e., I_{485}/I_{510}) is followed with time, it is possible to monitor the conjugate cleavage. In HEPES buffer, conjugate 1 is fully cleaved within approximately 50 min, as indicated by reaching the plateau formation. However, the cleavage in DMSO/HEPES is found to be slightly slower. In addition, the cleavage is accompanied by a significant 6-fold change in the I_{485}/I_{510} ratio in HEPES buffer or a 2.5-fold change in the DMSO/HEPES (2:1) mixture (Figure 5E).

Apart from aminoBODIPY, conjugate 2 carries the additional dye, redBODIPY—designed for the efficient FRET from

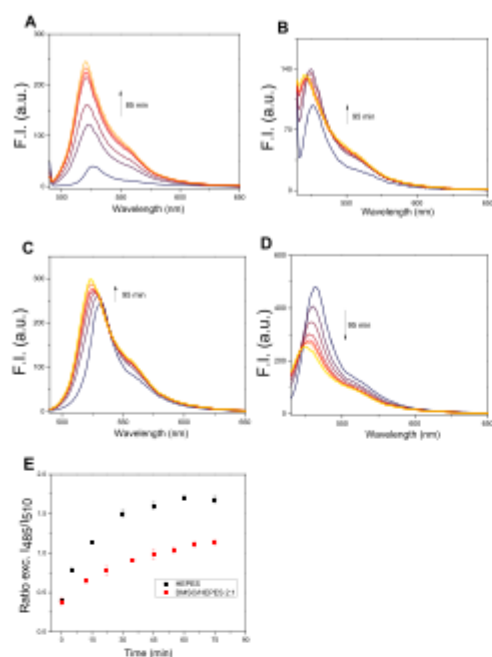


Figure 5. Fluorescence spectra of GSH-mediated cleavage (5 mM GSH) of conjugate 1 (5 μ M) upon excitation at (A) 485 nm or (B) 510 nm in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4). Fluorescence spectra of GSH-mediated cleavage (5 mM GSH) of conjugate 1 (5 μ M) upon excitation at (C) 485 nm and (D) 510 nm in DMSO/HEPES buffer (0.1 M, 2:1, 37 $^{\circ}$ C). (E) Schematic representation of the ratiometric change of fluorescence intensities at 530 nm after excitation at 485 nm and 510 nm (I_{485}/I_{510} ratio) with slit widths of 2.5 and 2.5 nm.

the aminoBODIPY dye. As demonstrated in Figure 6, before the GSH-mediated cleavage of conjugate 2 in DMSO/HEPES

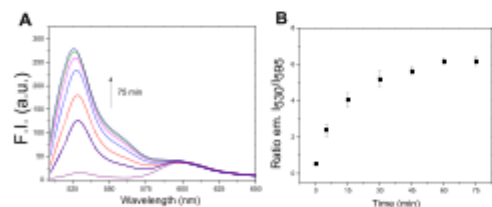


Figure 6. (A) Fluorescence spectra of conjugate 2 (1 μ M) during GSH-mediated cleavage (3 mM GSH) upon excitation at 510 nm and (B) schematic representation of the ratiometric change of I_{530}/I_{595} emissions ratio (3 mM GSH, DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, 37 $^{\circ}$ C).

(2:1), the system affords the fluorescence of redBODIPY (λ_{em} = 595 nm) upon excitation of aminoBODIPY (λ_{exc} = 510 nm) due to the effective FRET transfer. During the cleavage, the green emission (530 nm) of the released aminoBODIPY appears and increases with time (Figure 6A). FRET efficiency of conjugate 2 was determined to be 72% in DMSO/HEPES (2:1) buffer.

When the ratio of both emission intensities at 530 and 595 nm upon excitation at 510 nm (i.e., I_{530}/I_{595}) is followed with time, the plateau is achieved in approximately 30 min. In this case, the fluorescence response enhancement is remarkably higher than that in conjugate 1, and it stands for a one-order increase in the emission ratio of I_{530}/I_{595} (Figure 6B).

Next, we examined the stability of the conjugates 1 and 2 at various pH values and the rate of cleavage by 5 mM GSH at 37 $^{\circ}$ C in the pH range of 5–8. It is known that the disulfide bond is stable in the presence of thiols at lower pH, while the linker readily cleaves at higher pH. The same pH stability is also observed for both conjugates 1 and 2, as shown in Figures 7 and 8, respectively. Both conjugates were found to be stable in the presence of GSH (5 mM) at acidic pH (5–5.5) and readily cleaved at higher pH (7–8).

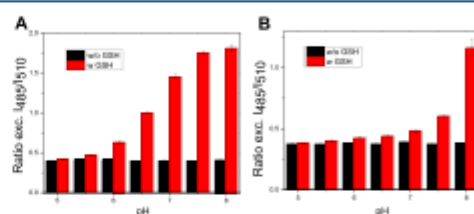


Figure 7. (A) Stability of conjugate 1 (1 μ M) at various pH 5–8 in HEPES buffer (0.1 M, 37 $^{\circ}$ C) and (B) DMSO/HEPES buffer (0.1 M, 2:1, 37 $^{\circ}$ C) without GSH and the cleavage of conjugate 1 (1 μ M) in the presence of GSH (3 mM) upon incubation for 1 h. All the data points were acquired upon excitation at 485 and 510 nm with emission at 530 nm and were performed in three repetitions.

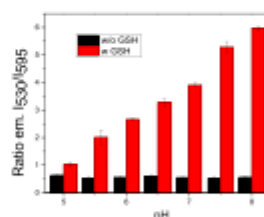


Figure 8. Stability of conjugate 2 (1 μ M) at various pH values (pH 5–8) (DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, 37 $^{\circ}$ C) without GSH and cleavage of conjugate 2 in the presence of GSH (3 mM) upon incubation for 1 h. All the data points were acquired upon excitation at 510 nm with emissions at 530 and 595 nm and were performed in three repetitions.

As expected, the cleavage of both conjugates increases with increasing pH. However, for conjugate 1, the cleavage rate in the range of 5–6.5 pH is significantly slower than that of conjugate 2. When the emission ratio I_{530}/I_{595} of conjugate 2 in the absence of GSH (I_{530}/I_{595} = 0.50) is compared to the value obtained after the incubation of conjugate 2 with GSH at pH 5 for 1 h (I_{530}/I_{595} = 1.32) and considering a value of I_{530}/I_{595} = 6.7 as the full cleavage (see Figure 6B), we can estimate that the conjugate is cleaved by 13% even at pH 5. Also, both conjugates proved to be stable in the selected pH range without the presence of reduced GSH. Figure 9 and Table 1 summarize the GSH concentration and rate of the cleavage relationship followed by the abovementioned fluorescence

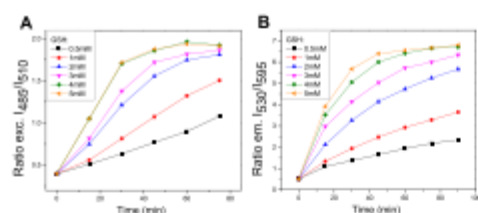


Figure 9. Influence of GSH concentration on the rate of cleavage of (A) conjugate 1 (1 μ M, HEPES buffer, 0.1 M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C) demonstrated by the ratio of the emission intensities at 530 nm after excitation at 485 and 510 nm (I_{530}/I_{510}) and (B) conjugate 2 (1 μ M, DMSO/HEPES buffer 0.1 M, 2:1, 37 $^{\circ}$ C) demonstrated by the ratio of the fluorescence intensities at 530 and 595 nm (I_{530}/I_{595}) after excitation at 510 nm. All the data points were measured in three replicates, with SD ranging up to 5%.

Table 1. Summary of Half-Lives of Conjugates 1 and 2 under Different Conditions^d

conjugate	GSH conc. (mM)	buffer	$t_{1/2}$ (min) ^c
1	5	HEPES ^a	22.3
1	4	HEPES ^a	23.1
1	3	HEPES ^a	38.2
1	2	HEPES ^a	54.6
2	5	DMSO/HEPES ^b	18.4
2	4	DMSO/HEPES ^b	23.6
2	3	DMSO/HEPES ^b	32.7
2	2	DMSO/HEPES ^b	51.5

^aHEPES, 0.1 M, pH 7.4; ^bDMSO/HEPES 2:1, 0.1 M, pH 7.4. ^c $t_{1/2}$ was determined by the ExpDecay function in OriginLab software. ^dAll the measurements were performed in three repetitions.

intensity ratios. The half-life of conjugate 1 was significantly longer than that of conjugate 2 under the same conditions.

Monitoring of the Conjugate 1 Cleavage Inside the Cell. Since compound 2 lacks the FRET effect in the buffer medium, we performed fluorescence monitoring of the drug release inside the cells only with compound 1.

Conjugate 1 was subjected to a series of experiments on HeLa cells, with and without pre-incubation by additional glutathione, to prove its cleavability. The pretreatment with the *N*-ethylmaleimide (NEM) was used for the total thiol activity inhibition in the assay.

The obtained fluorescence microscopy images of HeLa cells pretreated with NEM show that our model system 1 emits green light at the beginning of the experiment and after 2 h (Figure 10A) with the same intensity (Figure 10D). This fact corresponds to the assumption that NEM depletes the active thiols in the cells so that conjugate 1 is not cleaved, and no or negligible changes in fluorescence intensity are observed. Additionally, from the microscopy images, an altered distribution of compound 1 inside the NEM-treated cells and slightly higher green emission intensity at the beginning of the experiment was observed (Figure 10A) as compared to non-treated cells (Figure 10A,B). Arguably, this behavior may be explained by the fact that SH groups play crucial roles in regulating the permeability of transition pores. NEM is a membrane-permeant alkylating agent, and its binding to cysteine residues may affect the transition pores in membranes. This hypothesis results from the literature confirmed the fact

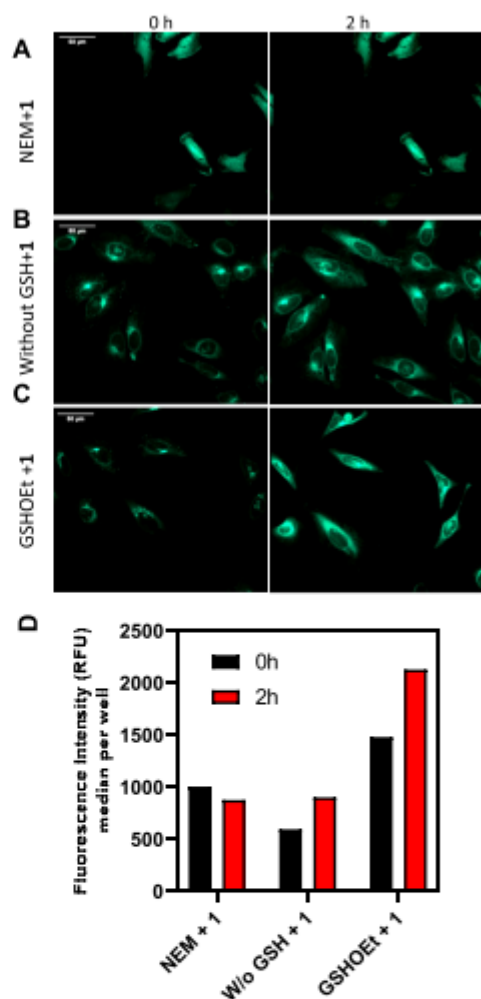


Figure 10. (A) Microscopy images of the conjugate 1 internalization inside the HeLa cells after the pretreatment with 1 mM NEM, (B) without any pretreatment, and (C) after pretreatment with 20 mM GSHOEt. (D) Quantification of fluorescence intensity in HeLa cells. Excitation/emission wavelengths of 488/515–530 nm.

that the high concentrations of NEM (0.5–1.0 mM) induce the pore opening in membranes.^{45,49}

When the cells without NEM pretreatment are incubated with conjugate 1, the fluorescence is found to be increased in 2 h (Figure 10B,D) as the conjugate is cleaved by native GSH to release the aminoBODIPY together with the drug (see Scheme 2). On the other hand, the emission intensity is significantly enhanced in 2 h when the cells are pretreated with GSHOEt (Figure 10C,D), and a significant amount of aminoBODIPY as well as the drug is released. Thus, the drug release can be easily detected by the OFF–ON effect and confirmed by the experiments with real-time monitoring of cleavage using a cell EnVision plate reader (Figure 11).

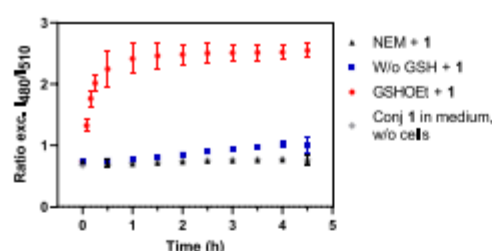


Figure 11. Time-dependent conjugate 1 cleavage monitoring inside HeLa cells pretreated with NEM (1 mM, 30 min) and HeLa cells with or without treatment with GSHOEt (20 mM). Excitation/emission wavelengths for conjugate 1 were selected as 485/530 and 510/530 nm.

To prove the enhanced uptake of conjugate 1 by HeLa cells, which possess overexpressed levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins,^{50,51} the cRGD binding assay was performed by adopting the described protocol.⁵² In the process, the cells were pre-incubated with various cRGD peptide concentrations (0–100 μ M) and then treated with conjugate 1 (10 μ M). As Figure 12 depicts, the

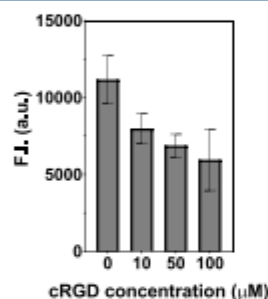


Figure 12. Uptake of conjugate 1 (10 μ M) by HeLa cells pre-incubated with the cRGD peptide (0–100 μ M). Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{em} = 530$ nm upon excitation at $\lambda_{exc} = 485$ nm. All measurements were performed in at least five repetitions.

decreased fluorescence response with higher cRGD peptide concentrations suggested that the binding sites at $\alpha_5\beta_1$ integrins were occupied by free cRGD peptides. This essentially results in reducing the penetration of conjugate 1 into the cells. The pre-incubation with 100 μ M cRGD led to an approximately 53% reduction in the cell uptake of conjugate 1 according to the fluorescence intensity at 530 nm.

In this study, the next-generation small-molecule drug conjugates (SMDCs) based on aminoBODIPY ratiometric fluorescence system were prepared utilizing a quinone methide (QM) central frame for the incorporation of three moieties, namely, (i) fluorescent aminoBODIPY for real-time detection of prodrug cleavage; (ii) the c(RGDfK) peptide, which is specific for targeting $\alpha_5\beta_1$ integrin receptors or the redBODIPY dye with a bathochromic shift of absorption for real-time FRET monitoring of drug release; and (iii) pegylated-2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone (3HQ) as a model drug. Both the targeting SMDC 1 and di-BODIPY FRET conjugate 2 were proven to be functional as cleavable conjugates in the presence of high concentrations of GSH (0.5–5 mM). The monitoring of the conjugates' cleavage was possible via the

fluorescence response with the advantage of ratiometric mode. System 2 showed an enhanced FRET effect in a mixture of HEPES buffer and DMSO, but this effect was significantly suppressed in an aqueous buffer alone.

Conjugate 1 was proven to be an effective drug delivery system with enhanced selectivity toward the cells having $\alpha_5\beta_1$ integrins, serving as the cRGD binding sites. Drug release became possible to be monitored inside the cell via ratiometric fluorescence.

In summary, we have prepared and tested the first thiol-cleavable system based on QM elimination. The synthetic protocol enabled the modification of the system by different drugs and target moieties while keeping the fluorescence properties for drug release monitored. Increased selectivity toward cancer cells was assured by a thiol cleavable linker (both types of conjugates) or by combination with a cRGD targeting unit (conjugate 1). As system 1, which is based on the QM motif, can reflect the drug release inside the cells, it can potentially serve as a motif for the development of real-time theranostics system in anticancer therapy.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00219>.

NMR spectra of newly synthesized compounds; synthesis of the compounds 13 and 14 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Jan Hlaváč – Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 771 46 Olomouc, Czech Republic; orcid.org/0000-0002-4652-7751; Email: jan.hlavac@upol.cz

Authors

Martin Porubský – Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 771 46 Olomouc, Czech Republic
 Soňa Gurská – Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 Jarmila Stanková – Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 Marián Hajdúch – Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 Petr Džubák – Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 779 00 Olomouc, Czech Republic

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00219>

Author Contributions

The manuscript was written through the contributions of all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Czech Science Foundation (GACR project 19-23972S), Czech Ministry of Education, Youth, and Sports (projects IGA PrF_2020_012, IGA LF_2021-038) and by grants from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (LM2018133, LM2018130) and by the European Regional Development Fund - Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868).

■ REFERENCES

- (1) Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; De Tata, V.; Casini, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1499–1503.
- (2) Balendiran, G. K.; Dabur, R.; Fraser, D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343–352.
- (3) Britten, R. A.; Green, J. A.; Warenius, H. M. Cellular glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1992**, *24*, S27–S31.
- (4) Gamcsik, M. P.; Kasibhatla, M. S.; Teeter, S. D.; Colvin, O. M. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers* **2012**, *17*, 671–691.
- (5) Cheetham, A. G.; Zhang, P.; Lin, Y.; Lin Lock, L.; Cui, H. Supramolecular Nanostructures Formed by Anticancer Drug Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2907–2910.
- (6) Qin, S. Y.; Zhang, A. Q.; Cheng, S. X.; Rong, L.; Zhang, X. Z. Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials* **2017**, *112*, 234–247.
- (7) Kurtoglu, Y. E.; Navath, R. S.; Wang, B.; Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R. M. Biomaterials Poly (amidoamine) dendrimer – drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2112–2121.
- (8) Dragojevic, S.; Ryu, J.; Raucher, D. Polymer-based prodrugs: Improving tumor targeting and the solubility of small molecule drugs in cancer therapy. *Molecules* **2015**, *20*, 21750–21769.
- (9) Zhang, J.; Yuan, Z. F.; Wang, Y.; Chen, W. H.; Luo, G. F.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X.; Zhang, X. Z. Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor-Triggered Targeted Drug Delivery. *JACS* **2012**, *134*, 6.
- (10) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.
- (11) Shin, W. S.; Han, J.; Verwilt, P.; Kumar, R.; Kim, J. H.; Kim, J. S. Cancer Targeted Enzymatic Therapeutic Prodrug: Precise Diagnosis and Chemotherapy. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1419–1426.
- (12) Chen, S.; Zhao, X.; Chen, J.; Chen, J.; Kuznetsova, L.; Wong, S. S.; Ojima, I. Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 979–987.
- (13) Dcona, M. M.; Sheldon, J. E.; Mitra, D.; Hartman, M. C. T. Light induced drug release from a folic acid-drug conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 466–469.
- (14) Cho, H. J.; Lee, S. J.; Park, S. J.; Paik, C. H.; Lee, S. M.; Kim, S.; Lee, Y. S. Activatable iRGD-based peptide monolith: Targeting, internalization, and fluorescence activation for precise tumor imaging. *J. Controlled Release* **2016**, *237*, 177–184.
- (15) Ranyuk, E.; Cauchon, N.; Klarskov, K.; Guérin, B.; Van Lier, J. E. Phthalocyanine-peptide conjugates: Receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1520–1534.
- (16) Pillow, T. H.; Sadowsky, J. D.; Zhang, D.; Yu, S.-F.; Del Rosario, G.; Xu, K.; He, J.; Bhakta, S.; Ohri, R.; Kozak, K. R.; et al. Decoupling stability and release in disulfide bonds with antibody-small molecule conjugates. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 366–370.
- (17) Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X. Integrin α V β 3-targeted cancer therapy. *Drug Dev. Res.* **2008**, *69*, 329–339.
- (18) Sancey, L.; Garanger, E.; Foillard, S.; Schoehn, G.; Hurbin, A.; Albigez-Rizo, C.; Boturyn, D.; Souchier, C.; Grichine, A.; Dumy, P.; Coll, J.-L. Clustering and Internalization of Integrin α V β 3 With a Tetrameric RGD-synthetic Peptide. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 837–843.
- (19) Danhier, F.; Le Breton, A.; Preat, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha (α) Beta (β) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2961–2973.
- (20) Nieberler, M.; Reuning, U.; Reichart, F.; Notni, J.; Wester, H. J.; Schwaiger, M.; Weinmüller, M.; Räder, A.; Steiger, K.; Kessler, H. Exploring the role of RGD-recognizing integrins in cancer. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, 116.
- (21) Chen, X.; Sievers, E.; Hou, Y.; Park, R.; Tohme, M.; Bart, R.; Bremner, R.; Bading, J. R.; Conti, P. S. Integrin α β 3 – Targeted Imaging of Lung Cancer. *Neoplasia* **2005**, *7*, 271–279.
- (22) Seftor, R. E.; Seftor, E. A.; Gehlsen, K. R.; Stetler-Stevenson, W. G.; Brown, P. D.; Ruoslahti, E.; Hendrix, M. J. Role of the α β 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 1557–1561.
- (23) Gladson, C. L.; Chereseth, D. A. Glioblastoma expression of vitronectin and the α β 3 integrin: Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1924–1932.
- (24) Rolli, M.; Fransvea, E.; Pilch, J.; Saven, A.; Felding-habermann, B. Activated integrin α β 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *PNAS* **2003**, *100*, 9482–9487.
- (25) Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* (80-.) **1997**, *279*, 377–380.
- (26) Dal Pozzo, A.; Ni, M. H.; Esposito, E.; Dallavalle, S.; Musso, L.; Bargiotti, A.; Pisano, C.; Vesci, L.; Bucci, F.; Castorina, M.; Fodera, R.; Giannini, G.; Aulicino, C.; Penco, S. Novel tumor-targeted RGD peptide-camptothecin conjugates: Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18*, 64–72.
- (27) Chen, X.; Plasencia, C.; Hou, Y.; Neamati, N. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric RGD Peptide - Paclitaxel Conjugate as a Model for Integrin-Targeted Drug Delivery. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1098–1106.
- (28) Rivas, P. L.; Radelović, I.; Moreira, R.; Pina, A.; Arosio, D.; Tóvári, J.; Mező, G.; Corso, D.; Pignataro, L.; Gennari, C. Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Conjugates Involving Linkers Cleavable by Lysosomal Enzymes and α V β 3 - Integrin Ligands for Tumor Targeting. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2902–2909.
- (29) Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H. Nanomolar Small Molecule Inhibitors for α β 6, α β 5, and α β 3 Integrins. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045–1051.
- (30) Ma, Y.; Huang, J.; Song, S.; Chen, H.; Zhang, Z. Cancer-Targeted Nanotherapeutics: Recent Advances and Perspectives. *Small* **2016**, *1*–4954.
- (31) Fernandez, A.; Vendrell, M. Fluorophore–Drug Conjugates To Unravel the Mechanisms of Action of Therapeutic Assets. *Biochemistry* **2017**, *57*, 175–176.
- (32) Zhuang, C.; Guan, X.; Ma, H.; Cong, H.; Zhang, W.; Miao, Z. Small molecule-drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 883–895.
- (33) Cusi, G.; Neri, D. Antibody–Drug Conjugates and Small Molecule–Drug Conjugates: Opportunities and Challenges for the Development of Selective Anticancer Cytotoxic Agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8751–8761.
- (34) Santra, S.; Kaftanis, C.; Santiesteban, O. J.; Perez, J. M. Cell-specific, activatable, and theranostic prodrug for dual-targeted cancer imaging and therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16680–16688.
- (35) Hu, Y.; Zeng, F. A theranostic prodrug based on FRET for real-time drug release monitoring in response to biothiols. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *72*, 77–85.
- (36) Liu, Y.; Pei, Q.; Chen, L.; Li, Z.; Xie, Z. Reduction-responsive fluorescence off – on BODIPY – camptothecin conjugates for. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2332–2337.
- (37) Porubský, M.; Gurská, S.; Stanková, J.; Hajdúch, M.; Džubák, P.; Hlaváč, J. Amino-BODIPY as the ratiometric fluorescent sensor for monitoring drug release or “power supply” selector for molecular electronics. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 25075–25083.

- (38) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- (39) Satyam, A. Design and synthesis of releasable folate-drug conjugates using a novel heterobifunctional disulfide-containing linker. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3196–3199.
- (40) Gnaïm, S.; Shabat, D. Quinone-Methide Species, A Gateway to Functional Molecular Systems: From Self-Immolative Dendrimers to Long-Wavelength Fluorescent Dyes. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2970–2984.
- (41) Polaske, N. W.; Kelly, B. D.; Ashworth-Sharp, J.; Bieniarz, C. Quinone Methide Signal Amplification: Covalent Reporter Labeling of Cancer Epitopes using Alkaline Phosphatase Substrates. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 660–666.
- (42) Funk, P.; Motyka, K.; Džubák, P.; Znojek, P.; Gurská, S.; Kusz, J.; McMaster, C.; Hajdúch, M.; Soural, M. Preparation of 2-phenyl-3-hydroxyquinoline-4(1H)-one-5-carboxamides as potential anticancer and fluorescence agents. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 48861–48867.
- (43) Motyka, K.; Hlaváč, J.; Soural, M.; Funk, P. Fluorescence properties of 2-aryl-3-hydroxyquinolin-4(1H)-one-carboxamides. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5060–5063.
- (44) di Cagno, M.; Stýskala, J.; Hlaváč, J.; Brandl, M.; Bauer-Brandl, A.; Skalko-Basnet, N. Liposomal solubilization of new 3-hydroxy-quinolinone derivatives with promising anticancer activity: a screening method to identify maximum incorporation capacity. *J. Liposome Res.* **2011**, *21*, 272–278.
- (45) di Cagno, M.; Stein, P. C.; Stýskala, J.; Hlaváč, J.; Skalko-Basnet, N.; Bauer-Brandl, A. Overcoming instability and low solubility of new cytostatic compounds: A comparison of two approaches. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 657–662.
- (46) Jo, S. D.; Ku, S. H.; Won, Y. Y.; Kim, S. H.; Kwon, I. C. Targeted Nanotheranostics for Future Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 1362–1377.
- (47) Poolman, J. M.; Maity, C.; Boekhoven, J.; Van Der Mee, L.; Le Sage, V. A. A.; Groenewold, G. J. M.; Van Kasteren, S. L.; Versluis, F.; Van Esch, J. H.; Eelkema, R. A toolbox for controlling the properties and functionalisation of hydrazone-based supramolecular hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 852–858.
- (48) Costantini, P.; Colonna, R.; Bernardi, P. Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-ortho-phenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1998**, *136S*, 385–392.
- (49) Garcia, N.; Pavón, N.; Chávez, E. The effect of N-ethylmaleimide on permeability transition as induced by carboxyatractyloside, agaric acid, and oleate. *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *51*, 81–87.
- (50) Liu, Y.; Zhao, F.; Gu, W.; Yang, H.; Meng, Q.; Zhang, Y.; Yang, H.; Duan, Q. The roles of platelet GPIIb/IIIa and $\alpha v\beta 3$ integrins during HeLa cells adhesion, migration, and invasion to monolayer endothelium under static and dynamic shear flow. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 1.
- (51) Orgovan, N.; Peter, B.; Bosze, S.; Ramsden, J. J.; Szabó, B.; Horvath, R. Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–8.
- (52) Jang, J. H.; Kim, W. R.; Sharma, A.; Cho, S. H.; James, T. D.; Kang, C.; Kim, J. S. Targeted tumor detection: guidelines for developing biotinylated diagnostics. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2154–2157.



Contents lists available at ScienceDirect

Computers in Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/combiomed

Characterization of drug effects on cell cultures from phase-contrast microscopy images

Denis Baručič^a, Sumit Kaushik^a, Jan Kybic^{a,*}, Jarmila Stanková^b, Petr Džubák^b, Marián Hajdúch^b

^a Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

^b Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Deep learning
Phase-contrast images
Drug discovery
Anti-cancer drugs
Convolutional neural networks

ABSTRACT

In this work, we classify chemotherapeutic agents (topoisomerase inhibitors) based on their effect on U-2 OS cells. We use phase-contrast microscopy images, which are faster and easier to obtain than fluorescence images and support live cell imaging. We use a convolutional neural network (CNN) trained end-to-end directly on the input images without requiring for manual segmentations or any other auxiliary data. Our method can distinguish between tested cytotoxic drugs with an accuracy of 98%, provided that their mechanism of action differs, outperforming previous work. The results are even better when substance-specific concentrations are used. We show the benefit of sharing the extracted features over all classes (drugs). Finally, a 2D visualization of these features reveals clusters, which correspond well to known class labels, suggesting the possible use of our methodology for drug discovery application in analyzing new, unseen drugs.

1. Introduction

Drug discovery aims to search for effective treatment of diseases with minimum side effects. Machine learning methods [1] can significantly reduce the time, effort and costs involved. Here we shall focus on one step of this process — cellular phenotypic screening, where the effect of a large set of potential candidate chemical compounds is evaluated on standard target cell lines [2,3]. The goal is to examine as many combinations of chemicals and cell lines as fast as possible. The combinations are contained in so-called ‘wells’, and a single array may contain hundreds of them. The fastest and least invasive way of evaluating the state of the cells is automatic microscopy imaging. The whole process can be robotized, producing a vast number of microscopic images of cells in particular wells at various time points. Therefore, automated image analysis techniques are necessary to achieve the desired high throughput.

Existing methods are usually based on fluorescence microscopy images (Figs. 1 and 2), which provide very clear images (especially of cell nuclei) that are straightforward to segment and evaluate automatically, using relatively simple methods. However, fluorescence imaging requires additional labeling by fluorescent dye or protein, which increases the cost and processing time and could affect the cellular morphology and the final analytical output [4]. Furthermore, only a limited combination of dyes can be used simultaneously.

As an alternative to fluorescence imaging, we use phase-contrast microscopy images (Figs. 1, 2), which do not damage the cells and can be acquired much easier and faster. However, these images are more challenging to segment (see Fig. 3) and analyze because of the intricate cell appearance and frequent imaging artifacts.

In our previous work [5,6], we have shown that it is possible to distinguish the effect of several chemical compounds on cell culture from phase-contrast images. However, our procedure was complicated. It used simultaneously acquired geometrically aligned fluorescence and phase-contrast images to learn to ‘translate’ phase-contrast images to binary segmentations obtained from fluorescence images. These segmentations were then analyzed using classical geometric shape features.

Here, in contrast to the previous work, we analyze the phase-contrast images directly using convolutional neural networks (CNNs), avoiding the necessity of acquiring the paired fluorescence and phase-contrast images and the limitation of considering only the shape of the segmented nuclei. We also show the benefit of sharing the features by formulating the task as a multiclass classification instead of solving independent binary problems separately for each class (chemical compound). This approach leads to a much-improved classification accuracy compared to the work of Mertanova et al. [5,6]. Moreover, we show visually that clusters of the extracted features correspond to

* Corresponding author.

E-mail addresses: baruuden@fel.cvut.cz (D. Baručič), kaushsum@fel.cvut.cz (S. Kaushik), kybic@fel.cvut.cz (J. Kybic).

<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.106171>

Received 26 May 2022; Received in revised form 30 August 2022; Accepted 1 October 2022

Available online 14 October 2022

0010-4825/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

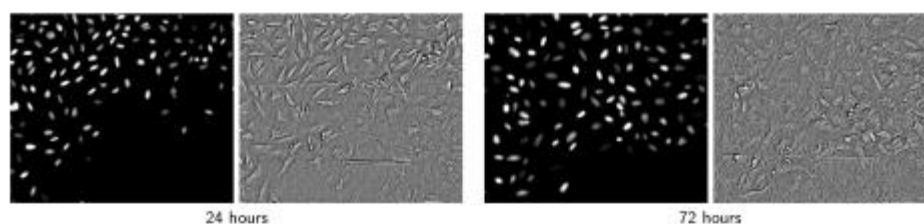


Fig. 1. Example of two pairs of the corresponding fluorescence (left) and phase-contrast (right) images taken 24 h and 72 h after being treated with Topotecan.

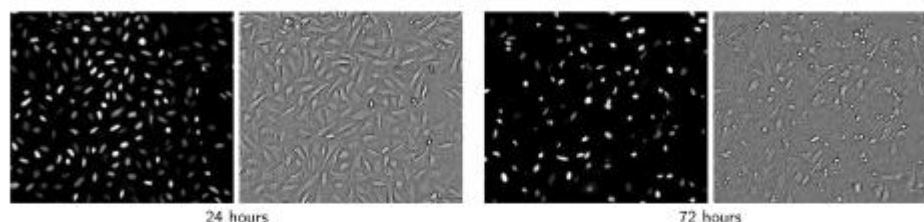


Fig. 2. Example of two pairs of the corresponding fluorescence (left) and phase-contrast (right) images taken 24 h and 72 h after being treated with Etoposide.

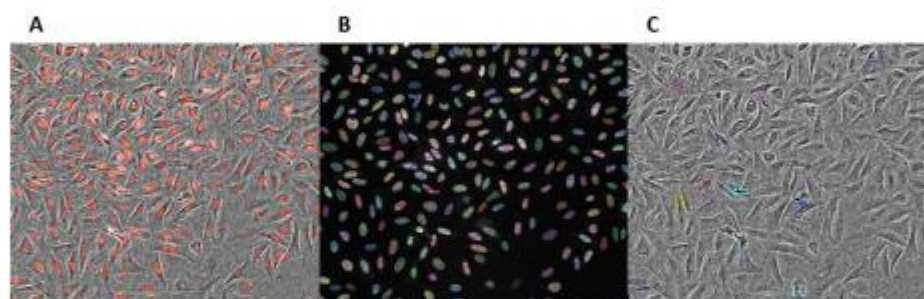


Fig. 3. Fluorescence image (in red) overlaid over a phase-contrast image (A). The fluorescence image can be segmented by standard tools, such as the Columbus software by PerkinElmer (B). The same method fails when applied to phase-contrast images (C). In (B, C), segmented objects are individually colored and overlaid over the grayscale input image.

the mechanism of action of the chemical compounds tested. This hints at the generalization ability of these features, which could be used as image-based fingerprints [7].

1.1. Related work

Image-based high-throughput screening for drug discovery has become an established and frequently used technique described in multiple review articles [8–10]. Classical approaches typically start by segmenting individual cells and evaluating especially the shape features, which describe the cell morphology, a part of the cell phenotype. Cell shape is known to be related to the cell type, state, and other relevant properties, such as metastatic capacity [11]. The final step involves machine learning for feature-based classification or clustering. Such pipelines can be implemented using open software such as ImageJ/Fiji [12], Icy [13], CellProfiler [14], and EBImage [15]. Later on, deep learning methods [16] appeared, combining feature extraction and classification for single-cell analysis [17]. An independent segmentation step [18] can be avoided by processing the input images directly [19,20]. These methods are usually based on well-known neural network architectures from computer vision for image segmentation (e.g., U-Net [21]) and classification (e.g., ResNet [22]). The networks are adapted to microscopic images, for example by

adding color normalization [23] and the multi-scale approach [24] to capture both short and long-range patterns.

Note that this work addresses the task of classifying the whole sample (slide or well) into one class. It is also possible to classify individual cells in the image [25], which is outside of this article's scope.

The high-throughput screening for drug discovery described in the aforementioned publications works mainly with fluorescence images [10,26], which is also the majority modality in dataset repositories such as the Broad Bioimage Benchmark Collection [27] used for performance evaluation. Phase-contrast images are much rarer in high-throughput applications because of their more complicated analysis. Nevertheless, there are methods to perform some processing steps, for example segmentation of individual cells [28], mitosis detection [29], classification [30] and segmentation [31] of different cell types, or morphology classification of individual cells [32]. However, we are not aware of any work where phase-contrast cell culture images similar in appearance to ours would be analyzed with the goal of drug discovery.

In our previous work [5,6], we have taken the roundabout way of learning to transform the phase-contrast images using the pix2pix model [33] to look similar to fluorescence images, which are then straightforward to segment using a U-Net [21]. Shape-based features were extracted from the segmented images and fed to a support vector

Table 1
The number of images per class.

Class	Fluorescence	Phase-contrast
Topotecan	79	64
Daunorubicin	78	67
Etoposide	80	71
DMSO	79	74
No treatment	119	116
Total	435	392

machine (SVM) [34] for binary classification. The approach required paired fluorescence and phase-contrast images.

2. Data

We are using the same dataset as in [5,6]: The U-2 OS cell line, derived from human osteosarcoma (American Tissue Culture Collection), was transduced by fluorescent mCherry-NLS (nuclear localization signal, cat. n. 0023VCT, Vector-TaKaRa, Japan). The cells were seeded at a density of 1500 cells per well and treated with three topoisomerase inhibitors, Topotecan, Daunorubicin, and Etoposide, at a final concentration 0.5 μ M. The treated and control cells were imaged at 20 $\times$ magnification and sampled at five locations per well and two time points — 24 and 72 h after the treatment. The images are of size 2560 $\times$ 2160 pixels. The original dataset also contained images taken before the treatment. However, we have decided not to use these images to reduce the over-representation of cells with no treatment.

Fluorescence images were acquired in parallel with the digital phase-contrast images. We use them here only for comparison with existing methods.

There are five different image classes. *Topotecan*, *Daunorubicin*, and *Etoposide* are each applied to 8 wells. The remaining two classes are controls: 8 wells with a 0.05% solution of *DMSO* (Dimethyl Sulfoxide) and 12 wells with no treatment. In total, we have 440 phase-contrast images from 44 wells. Excluding controls, there are 120 images from 24 wells with active treatment for each time point. Finally, skipping images containing less than three cells — mostly due to failed acquisition — leads to class sizes summarized in Table 1.

3. Method

We formulate the task as a standard multiclass image classification: given an input phase-contrast image, a convolutional neural network (CNN) assigns it to one of the $n = 5$ classes defined above.

3.1. Tiling

The input images are too big and cannot be fed directly to the CNN due to the limited GPU memory. Instead, we uniformly divide each image into $m = 16$ partially overlapping tiles of size 1024 $\times$ 864 pixels (see Section 4.1 for experiments with other tile sizes).

Each tile i is processed separately by the CNN, and the resulting tile-wise class probabilities p'_k are aggregated by averaging to obtain image-wise probabilities

$$\bar{p}_k = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m p'_k. \quad (1)$$

Maximization over the class index leads to the final image-wise prediction

$$k^* = \arg \max_k \bar{p}_k. \quad (2)$$

See Section 4.2 for an experimental comparison of this approach with (i) maximum-based aggregation and (ii) no aggregation, considering all tiles independently and sharing the same image label.

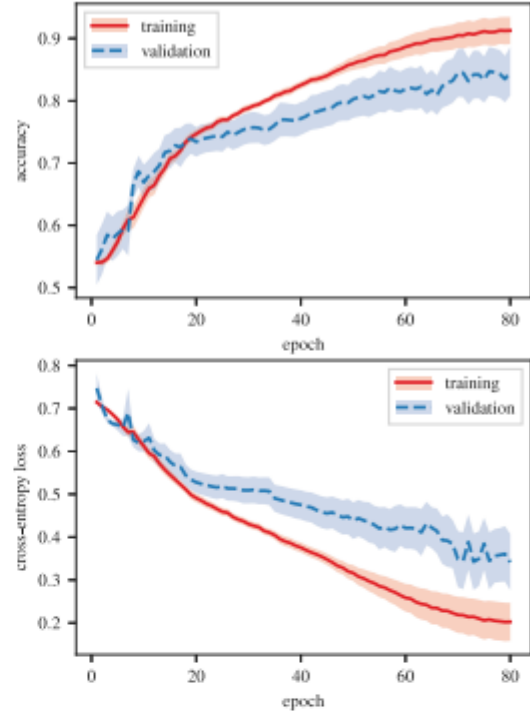


Fig. 4. The evolution of the training and validation accuracy and loss during training for the Etoposide vs. Topotecan classification on phase-contrast images. Mean (solid line) and standard error (shaded region) are shown.

3.2. Network architecture

We use the ResNet18 [22] network, known to perform well on a number of tasks. It uses residual blocks with skip connections for regularization and to combat the vanishing gradient problem. In our case, we have used the smaller, 18-layer version due to the limited size of our dataset. The final layer has $n = 5$ outputs, one for each class, to which we apply the softmax transformation [35] to obtain class probability estimates p_k for each class k . Since our batch size is small (5, due to GPU memory limitation), we use instance normalization [36,37] instead of the more standard batch normalization [38].

Apart from the multiclass approach, we have also trained binary classifiers ($n = 2$) for each class pair (Sections 4.2 and 4.3). The binary classifiers were either trained in two ways: either from scratch or by fine-tuning the final layer of a pre-trained multiclass classifier.

3.3. Training and evaluation

The network is trained by minimizing the cross-entropy loss using the Adam optimizer. We use class weights inversely proportional to class sizes to account for class imbalances. The initial learning rate $\lambda = 10^{-4}$, determined by the cyclical method [39], is reduced 10 $\times$ during training whenever the validation loss stops improving. For augmentation, we apply random horizontal and vertical flipping and color adjustments. The best model with respect to the validation loss is used for the final evaluation on the test set.

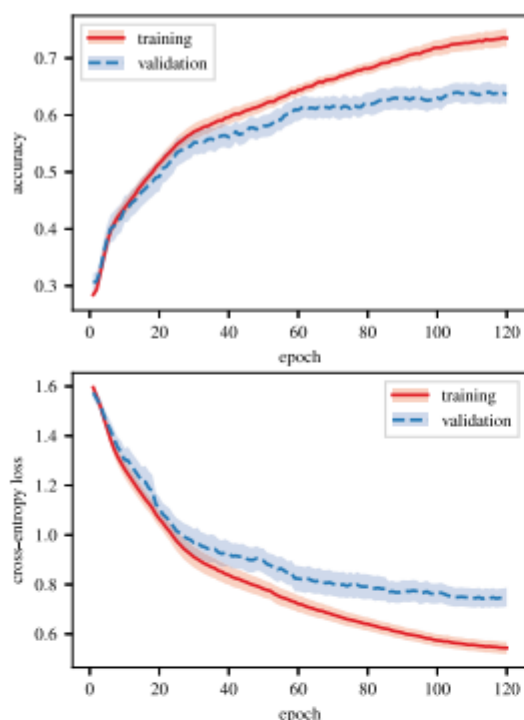


Fig. 5. The evolution of the training and validation 5 class accuracy and loss during training for phase-contrast images. Mean (solid line) and standard error (shaded region) is shown.

4. Experiments

All experiments were conducted using 10-fold stratified cross-validation. In each fold, 10% of the training data is used for validation, e.g., for learning rate adaptation. Average results and standard errors are reported. The number of training epochs for the binary and multiclass classification was set to 80 and 120, respectively, which seems sufficient for convergence (see Figs. 4 and 5).

We first experimentally justify the choice of the tiling parameters (see Section 3.1) and compare our deep learning approach with previous work on fluorescence images in Sections 4.1 and 4.2. The main experiments on supervised classification of phase-contrast images are in Sections 4.3 and 4.4. Furthermore, we analyze the effect of the time delay between drug application and image acquisition in Section 4.5 and the dependency on the dataset size in Section 4.6. We visualize the features extracted by our network in Section 4.7. Finally, we illustrate the effect of equalizing the effects of the substances by using substance-specific concentrations in Section 4.8. See the Appendix for a summary of the used statistical measures.

4.1. Tiling effect

For the binary classification of phase-contrast images of *Topotecan* and *Etoposide*, we have tried tile sizes 256×216 , 512×432 , 768×648 , and 1024×864 . The classification accuracies were 0.76 ± 0.17 , 0.88 ± 0.18 , 0.90 ± 0.15 , and 0.96 ± 0.07 , respectively, increasing monotonously with the tile size. Moreover, greater tile size leads to faster processing. This justifies our choice of 1024×864 . Larger sizes are not feasible due to GPU memory limitations.

4.2. Fluorescence images

We first apply our CNN to the binary classification task of distinguishing between a pair of classes from fluorescence images to enable a direct comparison with earlier work [5,6]. We consider all ten possible pairs of our five classes. In Table 2, note that distinguishing *Topotecan* from *Daurorubicin* and *DMSO* from the *No treatment* class (last two rows) seems to be much more difficult than for the remaining pairs. This holds for all methods and both types of input data. We call these pairs *ambiguous* and do not consider them in the observations below. See Section 5 for more discussion.

We compare the average and maximum aggregation operators (see Section 3.1) with the tile-wise accuracy, i.e., no aggregation. We see that average aggregation outperforms maximum aggregation and no aggregation. We shall therefore use average aggregation for all the remaining experiments.

The rightmost column of Table 2 shows the result of the previous method from [5,6] using hand-crafted shape features and an SVM classifier. We see that the new CNN method either outperforms the earlier SVM method or matches its performance.

4.3. Phase-contrast images

We repeated the binary classification experiment from Section 4.2 with phase-contrast images (see Table 3). We see that fine-tuning a pre-trained multiclass classifier (see Section 3.2) is almost always better (and never significantly worse) than training each classifier independently from scratch. This is probably because the images in all classes are similar, so high-quality features learned on a large dataset work well for all pairs of classes. Another advantage of sharing the features is speed, as fine-tuning is faster than repeated tuning-from-scratch by a factor of at least 6.

4.4. Multiclass classification

Our main result is the multiclass classification method for phase-contrast images. Table 4a shows the confusion matrix (for the sum of all folds). The ambiguous classes identified earlier (*Topotecan* vs. *Daurorubicin* and *DMSO* vs. *No treatment*) are often confused, leading to the average classification accuracy of only 70%. We, therefore, also report results where the ambiguous class pairs are considered together (Table 4b). Then the classification is almost perfect, with an average classification accuracy of 98%. On fluorescence images, the results are similar (Tables 5a and 5b).

4.5. Time delay effect

To investigate the effect of the delay between drug application and image acquisition, we divided the dataset into two subsets, acquired 24 h and 72 h after application. We examined different combinations of these subsets for training and testing.

Table 6a shows that for the 5 class formulation, the 24 h images seem about as difficult to classify as 72 h images, with accuracies 61% and 63%, respectively. Interestingly, the two subsets seem quite different, as we observe a significant drop in accuracy when training on one and testing on the other subset (24 h vs. 72 h). On the other hand, aggregating the ambiguous classes leads to almost perfect classification results for the 72 h data in the 3 class formulation (Table 6b), with a weaker performance on the 24 h subset. We can conclude that given more time, the effects of the drugs are more substantial.¹ We have repeated the same experiments also for fluorescence images with qualitatively similar results (Tables 7a and 7b).

¹ The slight difference between reported accuracies in Tables 6 and 4 is caused by averaging accuracies over runs instead of averaging the counts.

Table 2

Pairwise class accuracies for average and maximum tile aggregations and no-aggregation (tile-wise accuracy) for fluorescence images. The last column (SVM) shows accuracies obtained by the previous method [5,6]. Cross-validation means and standard errors are reported, and a bold font denotes the best results for a particular class pair. Ambiguous class pairs are denoted by a star (*).

Classes	Tile-wise	Image-wise		SVM [6]
		Average	Maximum	
Topotecan vs. Etoposide	0.96 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.85 ± 0.04	0.85
Topotecan vs. DMSO	0.92 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.75 ± 0.06	0.98
Topotecan vs. No treatment	0.94 ± 0.02	0.94 ± 0.03	0.94 ± 0.03	0.96
D Daunorubicin vs. Etoposide	0.97 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.82 ± 0.05	0.95
D Daunorubicin vs. DMSO	0.92 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.80 ± 0.05	1.00
D Daunorubicin vs. No treatment	0.95 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.89 ± 0.09	1.00
Etoposide vs. DMSO	0.97 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.84 ± 0.03	0.97
Etoposide vs. No treatment	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.00	0.96 ± 0.03	0.98
DMSO vs. No treatment*	0.61 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.64
Topotecan vs. Daunorubicin*	0.62 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.52
Average (all)	0.89 ± 0.04	0.89 ± 0.06	0.79 ± 0.05	0.89 ± 0.05
Average (unambiguous)	0.95 ± 0.02	0.99 ± 0.01	0.86 ± 0.02	0.96 ± 0.02

Table 3

Pairwise class accuracies on phase-contrast images, with the binary classifiers obtained by training from scratch or by fine-tuning a pre-trained multiclass classifier. We show both the tile-wise and image-wise accuracies (after aggregation). The last column (SVM) shows accuracies obtained by the previous method [5,6]. Cross-validation means and standard errors are reported, and a bold font denotes the best results for a particular class pair. Ambiguous class pairs are denoted by a star (*).

Classes	From scratch		Fine-tuning		SVM [6]
	Tile-wise	Image-wise	Tile-wise	Image-wise	
Topotecan vs. Etoposide	0.79 ± 0.06	0.93 ± 0.03	0.82 ± 0.04	0.96 ± 0.02	0.78
Topotecan vs. DMSO	0.89 ± 0.03	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.02	1.00 ± 0.00	0.79
Topotecan vs. No treatment	0.94 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.95 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.77
D Daunorubicin vs. Etoposide	0.88 ± 0.02	0.95 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.97 ± 0.01	0.79
D Daunorubicin vs. DMSO	0.88 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.91 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.91
D Daunorubicin vs. No treatment	0.94 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.95 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.95
Etoposide vs. DMSO	0.87 ± 0.03	0.94 ± 0.04	0.93 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.72
Etoposide vs. No treatment	0.98 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.95 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.77
DMSO vs. No treatment*	0.61 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.54
Topotecan vs. Daunorubicin*	0.60 ± 0.06	0.53 ± 0.08	0.46 ± 0.04	0.58 ± 0.06	0.41
Average (all)	0.84 ± 0.04	0.89 ± 0.05	0.82 ± 0.06	0.91 ± 0.05	0.74 ± 0.05
Average (unambiguous)	0.90 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.91 ± 0.02	0.99 ± 0.01	0.81 ± 0.03

Table 4

Confusion matrices for the multiclass classification of phase-contrast images. We provide Table 4(a) a confusion matrix for the five-class classification, where the average prediction accuracy is 70%, and Table 4(b) a reduced confusion matrix, where the ambiguous classes are joined together, leading to the average prediction accuracy of 98%. The matrices were obtained as a sum of matrices from all folds.

(a) Five classes						(b) Reduced			
True class	Prediction					True class	Prediction		
	Topot.	DMSO	Daun.	Etop.	No treat.		Daun. + Topot.	Etop.	No treat. + DMSO
Topot.	16	0	15	0	0	Daun. + Topot.	66	0	0
DMSO	1	4	0	0	28	Etop.	1	31	1
Daun.	10	0	25	0	0	No treat. + DMSO	1	0	92
Etop.	1	0	0	31	1				
No treat.	0	1	0	0	59				
Recall [%]	51.6	12.1	71.4	93.9	98.3	Recall [%]	100.0	93.9	98.9
Precision [%]	57.1	80.0	62.5	100.0	67.0	Precision [%]	97.1	100.0	98.9

Table 5

Confusion matrices for the multiclass classification of fluorescence images. We provide Table 5(a) a confusion matrix for the five-class classification, where the average prediction accuracy is 65%, and Table 5(b) a reduced confusion matrix, where the ambiguous classes are joined together, leading to the average prediction accuracy of 99%. The matrices were obtained as a sum of matrices from all folds.

(a) Five classes						(b) Reduced			
True class	Prediction					True class	Prediction		
	Topot.	DMSO	Daun.	Etop.	No treat.		Daun. + Topot.	Etop.	No treat. + DMSO
Topot.	21	0	19	0	0	Daun. + Topot.	68	0	0
DMSO	0	4	1	0	32	Etop.	0	33	0
Daun.	14	0	14	0	0	No treat. + DMSO	2	0	87
Etop.	0	0	0	33	0				
No treat.	1	0	0	0	51				
Recall [%]	52.5	10.8	50.0	100.0	98.1	Recall [%]	100.0	100.0	98.0
Precision [%]	58.3	100.0	41.2	100.0	61.4	Precision [%]	97.0	100.0	100.0

Table 6

Multiclass classification accuracy as a function of the time between drug application and image acquisition for phase-contrast images for Table 6(a) 5 classes and Table 6(b) 3 aggregated classes.

(a) Five class				(b) Reduced			
Trained on	Tested on			Trained on	Tested on		
	24 h	72 h	all		24 h	72 h	all
24 h	0.61 ± 0.06	0.39 ± 0.08	0.51 ± 0.05	24 h	0.88 ± 0.06	0.71 ± 0.06	0.81 ± 0.05
72 h	0.36 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.48 ± 0.03	72 h	0.57 ± 0.05	0.98 ± 0.02	0.76 ± 0.03
All	0.72 ± 0.05	0.74 ± 0.04	0.73 ± 0.03	All	0.95 ± 0.03	1.00 ± 0.00	0.96 ± 0.03

Table 7

Multiclass classification accuracy as a function of the time between drug application and image acquisition for fluorescence images for Table 7(a) 5 classes and Table 7(b) 3 aggregated classes.

(a) Five class				(b) Reduced			
Trained on	Tested on			Trained on	Tested on		
	24 h	72 h	all		24 h	72 h	all
24 h	0.55 ± 0.05	0.50 ± 0.04	0.53 ± 0.04	24 h	0.92 ± 0.04	0.93 ± 0.03	0.92 ± 0.03
72 h	0.42 ± 0.06	0.64 ± 0.04	0.55 ± 0.05	72 h	0.58 ± 0.05	0.98 ± 0.01	0.78 ± 0.04
All	0.64 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.61 ± 0.04	All	0.98 ± 0.02	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.01

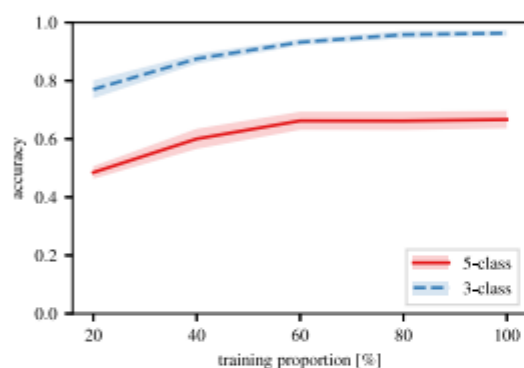


Fig. 6. Dependency of the multiclass image classification accuracy on the training dataset size. We show a curve for the 5-class problem and also the 3-class formulation with the two ambiguous class pairs merged into two classes. Mean (solid line) and standard error (shaded region) are shown.

4.6. Dataset size impact

To understand the effect of the training data size on the generalization ability, we evaluated the multiclass classification accuracy using 20 ~ 100% of the original data for training. We found that, for the 5-class formulation, the test image accuracy already gets saturated at 60% of the data (Fig. 6). However, this is probably due to the ambiguous classes, since for the 3-class problem, the accuracy continues to improve with more data, albeit slowly.

4.7. Feature visualization

This experiment illustrates the potential usefulness of the features extracted by our CNN to analyze unseen data. We took the 512-dimensional feature vectors from the penultimate layer of the multiclass CNN classifier trained on the image tiles from one of the cross-validation folds. We employed the t-SNE [40] dimension reduction method to visualize the features corresponding to unseen test image tiles as two-dimensional vectors. Three distinct clusters emerge (Fig. 7), with the ambiguous classes belonging to the same clusters. This indicates that the features characterize well the drugs' mechanism of action.

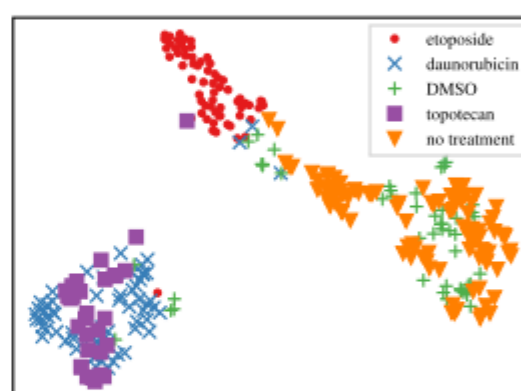


Fig. 7. The extracted features from the penultimate layer of the classification CNN visualized using the t-SNE mapping algorithm.

4.8. IC_{50} concentrations

The response to different active substances varies both in the appearance of the affected cells as well as in their number. We want to focus on appearance since the concentration will be unknown in real use cases. To eliminate the differences in the effect size, we have repeated the data acquisition not with equal concentrations but with substance-specific IC_{50} ² concentrations of the active substances, chosen so that 50% of the cells are affected. In particular, we used: Topotecan (1.24 μ M), Daunorubicin (0.18 μ M), and Etoposide (5.88 μ M). We then repeated the multiclass classification experiment on phase-contrast images (Section 4.4). Very interestingly, the classification results have much improved from 70% to 87.5% in the 5 class case — compare Tables 4 and 8. The formerly ambiguous Topotecan and Daunorubicin can be distinguished in this case. Aggregating DMSO and no treatment classes (which are truly ambiguous) leads to an almost perfect classification accuracy of 98% for this 4 class problem (Table 8), the same as we had previously for the 3 class problem (Table 4). See the next section for more discussion.

² Half maximal inhibitory concentrations.

Table 8

Confusion matrices for the multiclass classification of phase-contrast images with biologically-active drug concentrations: Table 8(a) a confusion matrix for the five-class classification with the average prediction accuracy of 87.5%, and Table 8(b) a reduced confusion matrix, where DMSO and No treatment are joined together, leading to the average prediction accuracy of 97.7%.

(a) Five class						(b) Reduced				
True class	Prediction					True class	Prediction			
	Topot.	DMSO	Daun.	Etop.	No treat.		Topot.	DMSO + No treat.	Daun.	Etop.
Topot.	44	0	1	0	0	Topot.	44	0	1	0
DMSO	0	22	0	0	12	DMSO + No treat.	0	52	0	0
Daun.	0	0	39	1	0	Daun.	0	0	39	1
Etop.	1	1	0	37	0	Etop.	1	1	0	37
No treat.	0	6	0	0	12					
Recall [%]	97.8	64.7	97.5	94.9	66.7	Recall [%]	97.8	100.0	97.5	94.9
Precision [%]	97.8	75.9	97.5	97.4	50.0	Precision [%]	97.8	98.1	97.5	97.4

5. Discussion and conclusions

We created a method capable of distinguishing the effect of several cytotoxic compounds on a cell line population from phase-contrast microscopy images instead of the more commonly used fluorescence images. This paves the way to a much simpler and faster high-throughput screening for new potential drugs. Moreover, we could visually observe a meaningful separation between classes in the feature space. This is very promising for the future task of clustering yet unseen drugs according to their mechanism of action, which we believe will be one of the primary use cases of this methodology. Finally, we saw that the drug effects are easier to distinguish after 72 h than after 24 h.

Our method can improve the speed and accuracy of the cellular micro-array screening, potentially leading to improved efficiency of the drug discovery process and, thus, to better clinical outcomes in the long term. Of course, we need to be aware that high-throughput cellular screening under standardized conditions is only one of the many steps in the drug discovery process.

It is well known that the cell response can be different *in vivo* than *in vitro*, vary for different cell lines, and be influenced by multiple genes. This is not a problem for our use case where the conditions are well controlled, and the cell lines are identical. However, they would need to be addressed for this technique to be used for predicting the effect in more general situations with more confounding factors. The principal limitation of our study is the relatively small dataset size — we plan to extend it to a much larger dataset with more active substances, various mechanisms of action and possibly more cell line types and other confounding factors, which should improve the robustness of the classification.

The preliminary results in Section 4.8 suggest that substance concentration is one of the confounding factors that have an essential effect on classification accuracy. In particular, by optimizing the concentrations, it was possible to distinguish Topotecan and Daunorubicin, which could not be discerned in the fixed concentration dataset, possibly because they are both topoisomerase inhibitors [41] and their mechanism of action is similar. Although the concentration will be unknown in real use cases, it should be possible to analyze images at several dilution levels and automatically choose the most relevant ones, complicating the experiment and increasing the number of necessary acquisitions. We also cannot distinguish between DMSO and no treatment, which is not surprising since DMSO is not supposed to affect the cells.

In theory, our method could be used directly on histological images in the clinical setting, similar to [42], although the network would have to be retrained. The principal difficulty would be obtaining a sufficiently large and comprehensive database.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports through the OP VVV project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000765 “Research Center for Informatics”, projects CZ-OPENSOURCE (LM2018130) and EATRIS-CZ (LM2018133); the Grant Agency of the Czech Technical University in Prague, grant No. SGS20/170/OHK3/3T/13; the European Regional Development Fund project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868); and the project National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, No. LX22NPO5102) funded by the European Union – Next Generation EU.

Appendix. Statistical evaluation measures

The classification performance is evaluated via accuracy, the proportion of correct classifications,

$$\text{accuracy} = \frac{|\text{correctly classified instances}|}{|\text{all instances}|}$$

For each class i separately, we also report recall (also known as sensitivity),

$$\text{recall} = \frac{|\text{correctly classified instances of } i|}{|\text{all instances of } i|},$$

and precision (or positive predictive value),

$$\text{precision} = \frac{|\text{correctly classified instances of } i|}{|\text{instances classified as } i|}.$$

We do not use specificity, which we consider less relevant in the multiclass setting.

References

- [1] P. Carracedo-Reboredo, et al., A review on machine learning approaches and trends in drug discovery, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19 (2021) 4538.
- [2] A. Smith, Screening for drug discovery: the leading question, *Nature* 418 (6896) (2002) 453–455.
- [3] P. Land, et al., Cellular imaging in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (4) (2006) 343–356.
- [4] S. Hickey, et al., Fluorescence microscopy—An outline of hardware, biological handling, and fluorophore considerations, *Cells* 11 (2022) 35.
- [5] H. Mertanová, et al., Learning to segment cell nuclei in phase-contrast microscopy from fluorescence images for drug discovery, in: *Medical Imaging 2022: Image Processing*, Vol. 12032, SPIE, 2022, pp. 688–694.
- [6] H. Mertanová, Cell segmentation in microscopy using a reference modality, (Diploma Thesis), Czech Technical University in Prague, 2021.
- [7] J. Simm, et al., Repurposing high-throughput image assays enables biological activity prediction for drug discovery, *Cell Chem. Biol.* 25 (5) (2018) 611–618.
- [8] C. Scheeder, et al., Machine learning and image-based profiling in drug discovery, *Curr. Opin. Syst. Biol.* 10 (2018) 43–52, Pharmacology and drug discovery.

- [9] A. Shariff, et al., Automated image analysis for high-content screening and analysis, *J. Biomol. Screen.* 15 (7) (2010) 726–734.
- [10] M. Boutros, et al., Microscopy-based high-content screening, *Cell* 163 (6) (2015) 1314–1325.
- [11] A. Prasad, E. Alizadeh, Cell form and function: interpreting and controlling the shape of adherent cells, *Trends Biotechnol.* 37 (4) (2019) 347–357.
- [12] J. Schindelin, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods* 9 (7) (2012) 676–682.
- [13] F. De Chaumont, et al., Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research, *Nature Methods* 9 (7) (2012) 690–696.
- [14] A.E. Carpenter, et al., CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, *Genome Biol.* 7 (10) (2006) 1–11.
- [15] G. Pau, et al., EImage—an R package for image processing with applications to cellular phenotypes, *Bioinformatics* 26 (7) (2010) 979–981.
- [16] A. Gupta, et al., Deep learning in image cytometry: a review, *Cytom. Part A* 95 (4) (2019) 366–380.
- [17] O. Dürr, B. Sick, Single-cell phenotype classification using deep convolutional neural networks, *J. Biomol. Screen.* 21 (9) (2016) 998–1003.
- [18] M.L. Guerriero, et al., Delivering robust candidates to the drug pipeline through computational analysis of arrayed CRISPR screens, *SLAS Discov.* 25 (6) (2020) 646–654.
- [19] A. Pratapa, et al., Image-based cell phenotyping with deep learning, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 65 (2021) 9–17.
- [20] N. Pawlowski, Towards Image-Based Morphological Profiling using Deep Learning Techniques (Ph.D. thesis), University of Edinburgh, 2016.
- [21] O. Ronneberger, et al., U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation, in: *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, Springer, 2015, pp. 234–241.
- [22] K.o. He, Deep residual learning for image recognition, in: *Computer Vision and Pattern Recognition*, 2016, pp. 770–778.
- [23] F. Ciompi, et al., The importance of stain normalization in colorectal tissue classification with convolutional networks, in: *2017 IEEE 14th International Symposium on Biomedical Imaging*, IEEE, 2017, pp. 160–163.
- [24] W.J. Godinez, et al., A multi-scale convolutional neural network for phenotyping high-content cellular images, *Bioinformatics* 33 (13) (2017) 2010–2019.
- [25] K. Yanagisawa, et al., Convolutional neural network can recognize drug resistance of single cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (9) (2020) 3166.
- [26] M. Götte, D. Gabriel, Image-based high-content screening in drug discovery, in: *Drug Discovery and Development—Present and Future*, InTech, Croatia, 2011, pp. 339–361.
- [27] V. Ljosa, et al., Annotated high-throughput microscopy image sets for validation, *Nature Methods* 9 (7) (2012) 637.
- [28] R. Bensch, O. Ronneberger, Cell segmentation and tracking in phase contrast images using graph cut with asymmetric boundary costs, in: *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging*, IEEE, 2015, pp. 1220–1223.
- [29] S. Huh, et al., Automated mitosis detection of stem cell populations in phase-contrast microscopy images, *IEEE Trans. Med. Imaging* 30 (3) (2010) 586–596.
- [30] H. Niioka, et al., Classification of C2C12 cells at differentiation by convolutional neural network of deep learning using phase contrast images, *Hum. Cell* 31 (1) (2018) 87–93.
- [31] J. Pan, et al., Learning to detect different types of cells under phase contrast microscopy, *Microsc. Image Anal. Appl. Biol.* 2009 (2009).
- [32] D.H. Theriault, et al., Cell morphology classification and clutter mitigation in phase-contrast microscopy images using machine learning, *Mach. Vis. Appl.* 23 (4) (2012) 659–673.
- [33] P. Isola, et al., Image-to-image translation with conditional adversarial networks, in: *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2017, pp. 1125–1134.
- [34] C. Cortes, V. Vapnik, Support vector networks, *Mach. Learn.* 20 (1995) 273–297.
- [35] L.J. Goodfellow, et al., *Deep Learning*, MIT Press, 2016.
- [36] D. Ulyanov, et al., Improved texture networks: Maximizing quality and diversity in feed-forward stylization and texture synthesis, in: *Computer Vision and Pattern Recognition*, 2017, pp. 6924–6932.
- [37] M. Kolarik, et al., Comparing normalization methods for limited batch size segmentation neural networks, in: *2020 43rd International Conference on Telecommunications and Signal Processing*, IEEE, 2020, pp. 677–680.
- [38] S. Ioffe, C. Szegedy, Batch normalization: Accelerating deep network training by reducing internal covariate shift, in: *International Conference on Machine Learning*, PMLR, 2015, pp. 448–456.
- [39] L.N. Smith, Cyclical learning rates for training neural networks, in: *2017 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision*, IEEE, 2017, pp. 464–472.
- [40] L. van der Maaten, G. Hinton, Visualizing data using t-SNE, *J. Mach. Learn. Res.* 9 (11) (2008).
- [41] X. Liang, et al., A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade, *Eur. J. Med. Chem.* 171 (2019) 129–168.
- [42] H. Shih-Chiang, C. Chi-Chung, et al., Deep neural network trained on gigapixel images improves lymph node metastasis detection in clinical settings, *Nature Commun.* 3347 (13) (2022) 1–14.