

## СЕНСОРЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

©2019 г. А. А. БОГДАНОВ, мл.<sup>1,2,3\*</sup>,  
И. Д. СОЛОВЬЕВ<sup>2,4</sup>, А. П. САВИЦКИЙ<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Molecular Imaging Probes, Department of Radiology,  
University of Massachusetts Medical School, Вустер*

<sup>2</sup> *Лаборатория молекулярного имиджинга, Институт биохимии им.  
А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные  
основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

<sup>3</sup> *Факультет биоинженерии и биоинформатики  
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва*

<sup>4</sup> *Лаборатория физической биохимии, Институт биохимии им. А.Н.Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Активность протеаз и ее дерегуляция в терапии и имиджинговой диагностики заболеваний. III. Флуоресцирующие вещества в клинической практике. IV. Сенсорные флуоресцирующие молекулы как субстраты для визуализации активности протеаз в живых системах. V. Фармакокинетика МФС, предназначенных для визуализации ферментативной активности в живых системах. VI. Флуоресцентная визуализация с использованием МФС, основанная на определении времени жизни флуоресценции. VII. Низкомолекулярные сенсорные молекулы для визуализации протеолитической активности. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Во многих пораженных тканях идет активный экзоцитоз (секреция) протеолитических проферментов, и идет их активация во вне-

---

*Принятые сокращения:* MPEG-gPLL – привитой сополимер метоксиполиэтиленгликоля и поли-L-лизина; uPA – активатор плазминогена урокиназного типа; AFI – автофлуоресцентный имиджинг; FMT – флуоресцентная томография; ICG – индоцианиновый зеленый; MB – метиленовый синий; ABP – сенсор-аналог субстрата; qNIRF-ABP – сенсор-аналог субстрата с тушением ближне-инфракрасной флуоресценции; FITC – флуоресцеин изотиоцианат; PSA – антиген предстательной железы; FL – время жизни флуоресценции; NIR – ближне-инфракрасный; CCP – проникающие в клетку пептиды.

\* *Адрес для корреспонденции:* Alexei.Bogdanov@umassmed.edu

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку по проекту № 14.W03.31.0023 Министерству науки и высшего образования РФ.

клеточном пространстве, в результате чего наблюдается локально повышенная каталитическая активность протеаз (напр. в растущих раковых опухолях или в очагах воспаления). Некоторые клинические методы визуализации (имиджинга) в живых системах, т.е. магнитнорезонансная и позитронно-эмиссионная томография, были успешно использованы для неинвазивного обнаружения активности ферментов [1–4]. Тем не менее, в последнее время именно флуоресцентные сенсоры ферментативной активности проходят испытания для различных типов мониторинга терапии, что обусловлено тем, что для получения оптических изображений можно использовать малые дозы сенсорных веществ, а также тем, что при применении оптических типов имиджинга можно не опасаться побочных эффектов, вызванных радиацией, даже если процедура визуализации применяется неоднократно [5, 6]. Флуоресценция, как частный случай люминесценции, является свойством многих органических и неорганических молекул и материалов. Электромагнитное излучение (с длинами волн в видимом диапазоне или ультрафиолете) поглощается подобными веществами и, после перехода вещества в возбужденное состояние, происходит испускание фотонов с более низкой энергией. В общем случае, возбуждающий свет всегда имеет более короткую длину волны (более высокую энергию), чем свет излучения. Так как возбуждающее излучение и собственно флуоресценцию можно разделить по спектральным (частотным) и временным характеристикам, наличие чувствительных воспринимающих приборов дает возможность определять наличие пикомолярных концентраций ферментов в биологических образцах. Именно поэтому технологии визуализации и измерения ферментативной активности с применением флуоресцентных субстратов развиваются уже в течение нескольких десятилетий. За это время они получили широкое распространение, что в значительной степени связано с экономичностью и высокой чувствительностью. Эти молекулы обычно флуорогенны, т.е. способны образовывать флуоресцирующие продукты реакции в результате ферментативного катализа. Распространение получили флуорогенные субстраты, предназначенные не только для анализа кинетики ферментативных процессов в растворах, но и для получения изображений с микрометровым разрешением и с высокой чувствительностью. Однако, в последнее время на стадии разработки находятся все больше специализированных зондов и сенсоров, предназначенных для визуализации *in vivo*, т.е. для мониторинга как нормальных, так и патофизиологических процессов, а также для слежения за отдельными клетками (трекинг).

Подобные сенсоры необходимы для решения сложных задач, связанных с визуализацией экспрессии гена и ее регуляции, внутриклеточной передачи сигналов, активации и дифференцировки стволовых клеток. Основным ограничением флуоресцентной визуализации в системах *in vivo* является неспособность обнаружить сигнал в глубоко залегающих тканях. Этот предел обнаружения определяется глубиной, на которую проникает возбуждающий свет, и на которой, следовательно, происходит излучение флуорофора. Почти все биологические ткани поглощают и рассеивают свет в видимом диапазоне и ультрафиолете. Однако, длинноволновой возбуждающий свет (от дальних красных до ближне-инфракрасных (NIR) длин волн, то есть 700–1500 нм) обеспечивает проникновение глубиной до нескольких сантиметров [7]. Флуоресцентные красители, излучающие фотоны с более низкой энергией (красный и ближний инфракрасный диапазон), которые редко поглощаются различными молекулами в ткани, могут быть обнаружены на глубине в несколько миллиметров до сантиметра. Вторичным, но чрезвычайно важным фактором является рассеяние света в ткани, которое уменьшает количество возвращаемого сигнала, а также осложняет пространственную локализацию сигнала, поступающего из ткани. Тем не менее, ранние достижения на уровне визуализации с использованием животных моделей болезни человека вскоре вызвали интерес к использованию флуоресцентной визуализации для диагностики заболеваний человека, в частности тех, которые либо имеют воспалительную природу, либо их патогенез имеет воспалительные компоненты (т.е. рак, атеросклероз, остеоартрит). Особенно стоит отметить интраоперационную визуализацию хирургического поля с помощью флуоресцентно меченых молекул, которые позволяют выявлять очаги ракового поражения [8–10]. Например, флуоресценция зондов, накапливающихся во вторичных опухолях или сторожевых лимфоузлах позволит хирургам с большей точностью и более полно удалять метастазы с использованием флуоресцентной «навигации» при лапароскопии и иных хирургических процедурах и без применения радиоактивных меток [11, 12]. Кроме того, при помощи флуоресцентного имиджинга можно проводить т.н. мультиплексинг различных молекул, так как флуоресцентные методы позволяют обнаруживать одновременно несколько (в некоторых случаях до 8–10) молекул-мишеней с использованием сенсорных флуоресцентных молекул, имеющих отличные друг от друга спектральные характеристики [13].

## II. АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ И ЕЕ ДЕРЕГУЛЯЦИЯ В ТЕРАПИИ И ИМИДЖИНГОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ценность определения уровня содержания ферментов в диагностике заболеваний подтверждена опытом клинической практики многих лет. В настоящее время ряд рутинных анализов крови основан именно на определении содержания ферментов. В их число входит определение присутствия сериновой пептидазы, известной как простат-специфический антиген (антиген предстательной железы PSA), для диагностики рака предстательной железы. Учитывая относительную дешевизну, универсальность и высокую эффективность клинических анализов ферментативной активности, потребность в определении анатомической локализации и одновременного количественного определения уровня активности ферментов у пациентов неочевидны. Однако, при наличии изначального диагноза многих заболеваний (рак, атеросклероз, инфекции трудно выявляемой этиологии) в клинике используют инвазивные процедуры, необходимые для более детальной диагностики (например, биопсии, поисковой хирургии), а также и для лечения методом облучения, хирургического иссечения опухоли, тромбэктомии/эмболотомии. Эти процедуры могут быть проведены с большей эффективностью и безопасностью, особенно тогда, когда точное расположение очага в пораженной ткани может быть заранее выявлено. Кроме того, выбор лечения может зависеть от степени распространения болезни (например, опухолевых метастаз) с учетом анатомических данных.

Стратегии, направленные на визуализацию и выявление активности ферментов, несут в себе значительный потенциал для диагностики и прогностики широкого спектра заболеваний. Есть многочисленные доказательства того, что дерегуляция ферментативной активности играет роль в этиологии и/или прогрессии рака, атеросклероза, инсульта и сердечных заболеваний, диабета, артрита, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера [14], ВИЧ, и других инфекций. Например, целые семейства протеаз участвует в росте раковых опухолей, включая активатор плазминогена урокиназного типа [15], матриксные металлопротеиназы (ММП) [16] и цистеиновые протеиназы [17]. Считается, что эти ферменты способствуют образованию дефектов во внеклеточном матриксе, позволяющих раковым клеткам, а также активированной строме, инвазировать в окружающие ткани [18]. ММП экспрессируются клетками при некоторых типах рака, и их уровень экспрессии коррелирует с стадией прогрессии опухоли [19] и ее инвазивностью [20, 21], метастазированием [22] и степенью

снабжения кровеносными сосудами [23]. Повышенные уровни экспрессии и активности цистеиновых катепсинов и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) также обнаружены в некоторых опухолях [24–27], а повышенные уровни катепсина В, D и L обнаруживаются в аденокарциноме молочных желез, являясь, таким образом, прогностическим фактором [28–31]. В патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, хронической обструктивной болезни легких, а также муковисцидозе (кистозном фиброзе) играют значительную роль воспалительные процессы, опосредованные активацией соответствующего сигналинга у нейтрофилов, и опосредованной им выброса эластазы и миелопероксидазы в результате секреции гранул и НЕТоза. Синтез и секреция аниона гипохлорита, т.е. продукта активности миелопероксидазы, приводит к активации матрилизина (ММР-7) и может способствовать нарушению интактности атеросклеротической бляшки в результате деградации фиброзного поверхностного слоя [32, 33]. Для терапии рака, помимо ингибиторов протеасом при терапии множественной миеломы [34], ингибиторы ферментов были использованы для ингибирования активности активированной АМР протеинкиназы [35], матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) и ММП-14 [36, 37] катепсина S [38] и катепсинов В, L, S и Т [39].

### **III. ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Наиболее распространенным в клинической диагностике является применение аутофлуоресцентной визуализации (AFI) в качестве компонента эндоскопических исследований. AFI основана на флуоресценции, которая испускается эндогенными биомолекулами в ткани. Этими биомолекулами с флуоресцентными свойствами являются коллаген, флавины и другие кофакторы, порфирины и родственные соединения. Их длина волны излучения иногда заметно изменяется при изменении метаболического состояния ткани, что можно использовать, например, в качестве индикатора злокачественности опухоли. В настоящее время разрабатываются методы, основанные на системном применении флуоресцентных красителей и флуоресцентно меченных макромолекул, которые распределяются по всему организму после системного введения. Успех этого подхода будет зависеть от способности сигнала флуоресцентного зонда содержать точную информацию о физиологических процессах и диагностических признаках заболеваний. Это, в свою очередь, в значительной степени

зависит от способности зонда обладать специфичностью к данному процессу в ткани и генерировать сигнал, который обладает достаточной интенсивностью для последующего обнаружения. Отдельный фактор, влияющий на качество информации, которую можно получить при измерении интенсивности флуоресценции *in vivo*, – это автофлуоресценция биологической ткани. Различные молекулы, входящие в состав биомакромолекул и тканей (гемоглобин, триптофан, НАДН, пиридоксин, коллаген, эластин, флавины, порфирины, нуклеотиды и др.) могут поглощать свет в видимом диапазоне, а некоторые из вышеуказанных молекул также и обладают флуоресцентными свойствами.

«Идеальный» флуоресцентный сенсор для работ *in vivo* (эндогенный или экзогенный) должен обладать следующими свойствами: 1) иметь пик эмиссии флуоресценции в «первом» или «втором» окнах ближне-инфракрасного (NIR) диапазона, т.е. 700–900 и 1000–1700 нм, соответственно; 2) иметь высокий квантовый выход; 3) узкую полосу волн возбуждения молекул, с максимально возможным батохромным сдвигом относительно области поглощения фотонов; 4) иметь высокую фотохимическую стабильность; 5) обладать низкой токсичностью и прежде всего низкой фототоксичностью; 6) обладать биосовместимостью и способностью к деградации и выведению из организма; 7) наличие активированных производных [40].

В настоящее время из всех красителей, флуоресцентных в NIR области для клинического применения разрешены только индоцианиновый зеленый краситель (ICG) и метиленовый синий (МВ) (рис. 1). Первый из них применяется в качестве неспецифического флуоресцентного контрастного трейсера для целей внутриоперационной ангиографии, визуализации желчных протоков и для визуализации сторожевых лимфатических узлов при раковых заболеваниях (см. [41–43]). Главное предназначение МВ, это терапия метгемоглобинемии, т.е. для визуализации в качестве трейсера МВ используется только в клинических испытаниях для тех же целей, что и ICG. Для визуализации опухолей в виде предшественника флуорофора в клинике применяют 5-аминолевулиновую кислоту, которая сама по себе не флуоресцирует, но задействована в биосинтезе флуоресцирующего протопорфирина IX, который накапливается в раковых клетках из-за низкой активности феррохелатазы, способствуя, таким образом, обнаружению и терапии опухолей (глиома, карциномы мочевого пузыря) с обнаружением полосы испускаемого света в диапазоне 625–710 нм. Флуоресценция протопорфирина IX используется для картирования расположения опухолей при нейрохирургических

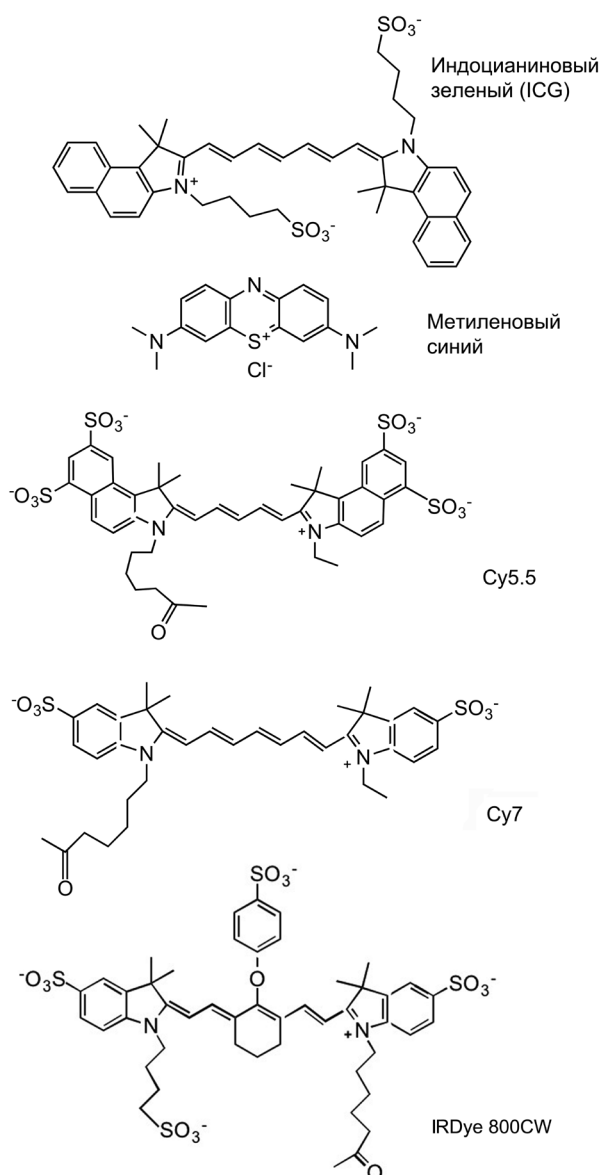


Рис. 1. Химическая структура флуорофоров, часто используемых в дизайне сенсоров активности ферментов для оптической визуализации *in vivo*.

Разрешенные к клиническому применению индоцианиновый зеленый (ICG); метиленовый синий. Примеры цианиновых флуорофоров, применяемых в исследовательских целях для работы с животными: Cy7 и IRDye 800CW.

операциях. Существуют примеры более полной резекции опухолей мозга с применением флуоресцентного имиджинга и улучшения последующей клинической картины [44, 45].

#### **IV. СЕНСОРНЫЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ КАК СУБСТРАТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ**

Несмотря на то, что измерения уровня синтеза специфических мРНК и протеомика на уровне биологических образцов и проб дают полуколичественную информацию об уровнях экспрессии ферментов в тканях, многие ферменты активируются пост-трансляционно. Поэтому часто требуется прямой подход определения активности ферментов в интактной ткани и целых организмах. Флуоресцентные сенсоры подходят для решения этой задачи благодаря их способности быстро переходить на шкале от миллисекунд до нескольких секунд во флуоресцирующее состояние под воздействием ферментативного катализа.

Существуют три основные стратегии получения сигнала, на основании которого можно делать выводы о наличии или отсутствии в тканях ферментативной активности. Первая из основана на принципе обнаружения сигнала, генерируемого в результате деградации оптически «неактивных» молекул и макромолекул ферментами с образованием фрагментов, которые способны генерировать такой сигнал. Данный подход часто используется для детекции протеаз с помощью макромолекулярных флуоресцентных сенсоров (МФС), несущих ковалентно связанные молекулы флуорофоров [5] (рис. 2а, б).

Вторая стратегия основана на принципе синтеза молекул при помощи низкомолекулярных субстратов – предшественников, которые способны удерживаться в исследуемом объеме за счет реакционной способности продуктов реакции [46]. Одна молекула фермента может локально активировать множество связанных с флуорофором субстратов. Если флуоресцентные продукты реакции способны находиться в течение времени, необходимого для их обнаружения, в пределах области, где идет катализ, без уменьшения суммарного сигнала из-за эффекта «самотушения», то происходит амплификация флуоресцентного сигнала. Данный подход может быть использован для обнаружения активности миелопероксидазы [47].

Третий подход основан на сенсорах-аналогах субстратов (АВР), специфически реагирующих с активными центрами молекул ферментов. Эти реакции необратимы, и вызывают ингибирование активности,



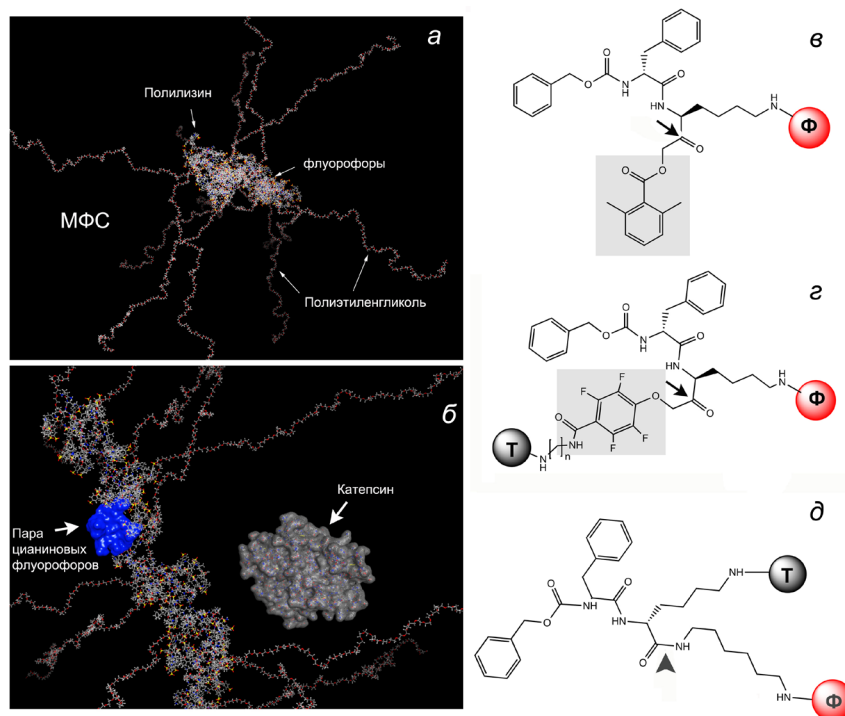


Рис. 2. Модели и структуры макромолекулярного флуоресцентного сенсора (МФС, а, б) на основе MPEG-gPLL и низкомолекулярных сенсоров протеаз (в–д).

Главные элементы структуры фрагмента MPEG-gPLL ( $n = 20$  мономеров, молекулярная модель, полученная в Molecular Operating Environment (MOE)). С фрагментом связаны флуорохромы IRDye 800CW, для наглядности приведена «вытянутая» конформация цепей метоксиполиэтиленгликоля MPEG (а); модель MPEG-gPLL, на которой поверхность пары взаимодействующих красителей IRDye 800CW (*H*-димер) выделена синим цветом. Для сравнения масштабов приведена молекула катепсина, который расщепляет многие производные модифицированных MPEG-gPLL (б); структура ABP (в); структура qNIRF-ABP (г); структура низкомолекулярного субстрата с лизосомальной специфичностью (д). Серым цветом показаны электрофильные заместители, стрелками показаны места расщепления или нуклеофильной атаки сульфгидрильной группой активного центра цистеиновых протеаз (адаптировано из [48–50, 69]).

так как АВР специфически и необратимо ингибируют цистеиновые протеазы (рис. 2в, г) [48]. Эти сенсоры низкомолекулярны, способны легко преодолевать тканевые барьеры, и, как правило, крайне реакционноспособны за счет наличия электрофильной группы в составе сенсора, и подвержены гидролизу. Вследствие этого они могут давать высокий сигнал фона и обладают достаточно низкой селективностью в живых системах. В состав таких сенсоров вводили тушители для уменьшения флуоресценции фона [49], а также синтезировали сенсоры без реакционноспособных электрофильных заместителей, которые после расщепления катепсинами образуют положительно заряженные, лизосомотропные флуорофоры (рис. 2д) [50].

Сенсорные молекулы, предназначенные для применения в живых системах для обнаружения ферментативной активности протеаз изначально разрабатывались на основе фермент-гидролизуемых макромолекул (т.е. квази-субстратов) с полипептидным «скелетом», а в роли флуорофора выступал часто используемый флуоресцентный краситель FITC. FITC реагирует с N-ε-аминогруппами лизина полипептидов при высоких значениях pH с образованием соответствующих тиокарбаматов [51]. Первое подробное описание визуализации клеток *in vitro* с использованием макромолекулы, несущей молекулы флуоресцеина [52] содержит вывод, что при мечении альбумина несколькими молекулами FITC флуорофор подвергается тушению с уменьшением интенсивности флуоресценции и продолжительности времени жизни. С течением времени в клетках после эндоцитоза FITC-меченого альбумина наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции флуоресцеина и резкое 6-кратное удлинение времени жизни флуоресценции (FL) с 0,5 нс до 3 нс. Эксперименты FITC-меченым L- и D-полилизинном позволили сделать вывод о том, что протеолиз ответственен за увеличение флуоресценции, поскольку у D-полилизина, который, в отличие от L-полилизина, не расщепляется клеточными протеазами, не происходили изменения интенсивности флуоресценции [52]. Позднее, для слежения за миграцией клеток в трехмерном матриксе также пользовались макромолекулами, мечеными FITC [53]. Таким образом, данные работы показали, что при ковалентном связывании с макромолекулами, несущими реакционноспособные группы, с увеличением плотности ковалентного связывания флуорофоров (Ф), например FITC, с макромолекулой флуоресценция нелинейным образом зависит от концентрации [Ф], и уменьшается при достижении определенной локальной концентрации [Ф] в макромолекуле. Этот эффект можно объяснить переносом энергии возбужденного состояния молекулы Ф на другую

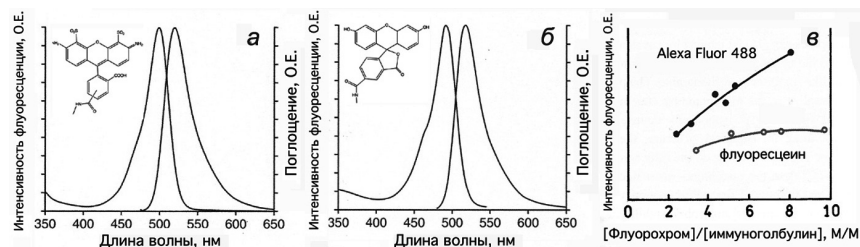


Рис. 3. Влияние структуры молекулы флуорофора на самотушение в конъюгатах с белками.

Структурно различные, но спектрально идентичные Alexa Fluor 488 (а) и флуоресцеин (б) образуют конъюгаты с антителами (в), в которых флуорофоры гораздо сильнее подвержены самотушению в случае (б), чем (а). Данные свидетельствуют о вкладе статических механизмов, основанных на взаимодействиях между молекулами, в эффект самотушения в ковалентных конъюгатах с полипептидами.

молекулу Ф, т.е. путем динамического самотушения по Ферстеру или Декстеру. Вероятность самотушения зависит от расстояния между флуорофорами:  $W(r) = (1 + (r/R_0)^6)^{-1}$ , где  $R_0$  – радиус Ферстера соответствующий 50% вероятности переноса энергии  $W(r) = 0,5$ . При ковалентном связывании флуорофоров с полипептидами расстояние между отдельными молекулами флуорофоров с высокой вероятностью меньше 4 нм, т.е. в границах Ферстеровского диапазона расстояний, при которых перенос энергии высоковероятен, т.е. в границах 1,5–6 нм. Тем не менее, несмотря на то, что теория динамического самотушения Ферстера широко используется при трактовке резонансного переноса энергии, она не всегда подходит для описания эффектов самотушения в макромолекулах, содержащих более двух близко расположенных ковалентно связанных флуорофоров. Если бы расстояние Ферстера однозначно определяло эффективность самотушения, то эффект самотушения наблюдался бы для любой пары флуорофоров, находящейся на расстоянии меньше 6 нм друг от друга. Однако, известен пример коммерчески доступного красителя Alexa Fluor 488, который спектрально практически идентичен флуоресцеину, и, тем не менее, меньше подвержен самотушению при ковалентном связывании с белками (рис. 3).

Данный пример доказывает, что т.н. статические эффекты тушения происходят из-за образования не флуоресцирующих димеров вида ФФ в основном состоянии молекул, которое сопровождается поглощением света и возвращением в основное состояние без испускания фотона. В отличие от динамического тушения, статическое тушение

уменьшается, а не увеличивается с ростом температуры, т.к. константа ассоциации флуорофоров  $K_S = [\Phi\Phi]/(\Phi \times \Phi)$  зависит от температуры. В самом простом случае концентрация флуорофора  $[\Phi_0]$  равна:  $[\Phi_0] = [\Phi] + [\Phi\Phi]$ , где  $[\Phi]$  – концентрация флуоресцентных мономеров, а  $[\Phi\Phi]$  концентрация не флуоресцентных димеров. Зависимость соотношения интенсивностей флуоресценции в отсутствие эффекта самотушения  $F_0$  и наблюдаемой величины флуоресценции в присутствии эффекта самотушения  $F$  по закону Штерна-Фольмера:  $F_0/F = 1 + K_S \times [\Phi]$ . В общем случае, самотушение вызывается суммарным эффектом динамического и статического самотушения и  $F_0/F = 1 + K_{набл} \times [\Phi]$ , где наблюдаемая  $K_{набл} = (K_D + K_S) + K_D \times K_S \times [\Phi]$ , где  $K_D$  константа тушения Штерна-Фольмера. В отсутствие динамического самотушения среднее время жизни в системе, состоящей из  $\Phi$  и  $\Phi\Phi$  определяется временем жизни  $\Phi$ , т.е. единичного флуорофора, связанного с макромолекулой. Однако, при наличии динамических взаимодействий между  $\Phi$  и  $\Phi\Phi$  среднее время жизни может быть и намного короче. Данные теоретические соображения распространяются и на флуоресцентные красители с максимумом флуоресценции в NIR диапазоне световых волн. Например, цианины сильно подвержены статическому тушению путем неизлучательного резонансного переноса энергии фотонов. Они образуют т.н. Н-агрегаты в крайне близком, т.е. Ферстеровском расстоянии друг от друга с переносом возбуждающего излучения как на молекулы-акцепторы, отличные по химической структуре, так и на идентичные по структуре молекулы. Их полную агрегацию обычно предотвращают путем специальной модификации с образованием ковалентно связанных сульфогрупп для увеличения суммарной полярности молекул.

Первые работы, выполненные в культуре клеток с флуоресцентно мечеными белками оказались важными для последующей разработки зондов для имиджинга протеолиза. Рост интенсивность флуоресценции, происходящий в результате расщепления макромолекулярного субстрата, происходит из-за конформационных и химических изменений в продуктах расщепления. Большинство полипептидов имеют вторичную и третичную структуры, определяемые водородными связями и гидрофобными взаимодействиями аминокислотных остатков. Если реакционноспособные группы в составе полипептидной цепи (т.е. прежде всего, N-ε-аминогруппы лизинов) являются пространственно расположенными близко друг от друга, то ковалентное связывание  $\Phi$  с этими группами с большой вероятностью приведет к низкой флуоресценции молекулы. В глобулах природных белков сегментная подвижность цепей низкая, в отличие от их синтетических поли-

олигоаминокислотных аналогов. Например, полилизины существуют в неупорядоченной конформации при рН выше 8,5. Конформационная гибкость линейных или разветвленных синтетических полиаминокислот может потенциально приводить к увеличению числа взаимодействующих Ф из-за 1) более высокого общего количества доступных реакционноспособных групп; и 2) их подвижности, которая облегчает образование переходных или стабильных димеров Ф (или их агрегатов). Вероятность тушения флуоресцентного красителя в этом случае высока. Таким образом, связывание Ф, флуоресцирующих в NIR области спектра с белками плазмы с целью получения зондов имеет преимущества и недостатки: преимущества включает доступность индивидуально очищенных или рекомбинантных белков плазмы крови, их гомогенность и низкую иммуногенность в нативной форме. Недостатки включают ограниченное количество реакционноспособных групп, недостаточное длительное время циркуляции в кровотоке, захват в клетках ретикулоэндотелиальной системы и способность флуорофоров индуцировать иммунный ответ, если они присоединены к белкам. Линейные синтетические полиаминокислоты имеют короткие времена циркуляции в кровотоке, а их отрицательный или положительный заряд может привести к высокому уровню поглощения в почках и индуцировать нежелательный процесс агрегации тромбоцитов. Однако, иммуногенность полиаминокислот с высокой степенью модификации боковой группы различными лигандами обычно ниже, чем в случае белков.

Дизайн макромолекулярных флуоресцентных сенсоров (МФС), способных обнаруживать каталитическую активность протеаз в живых системах, также основан на использовании эффекта диссоциации нефлуоресцирующих цианиновых Ф, ковалентно связанных непосредственно с фермент-расщепляемым полимером (рис. 2 а). Агрегаты цианинов способны диссоциировать под воздействием ферментативного гидролиза, который нарушает целостность компонентов сенсорных молекул (т.е. либо линкера, либо самого макромолекулярного носителя, к которому химически присоединены флуорофоры (рис. 4). В результате вместо неизлучательных процессов имеет место флуоресценция с испусканием фотонов.

В настоящее время ближнеинфракрасные «активируемые» субстратные макромолекулярные сенсоры для визуализации протеолиза коммерчески доступны для экспериментов в живых системах. Эти МФС синтезируют с применением метоксиполиэтиленгликоль (МPEG)-привитых сополимеров поли-L-лизина (MPEG-gPLL, например, Prosense, Perkin Elmer) содержащих пептидные связи, которые

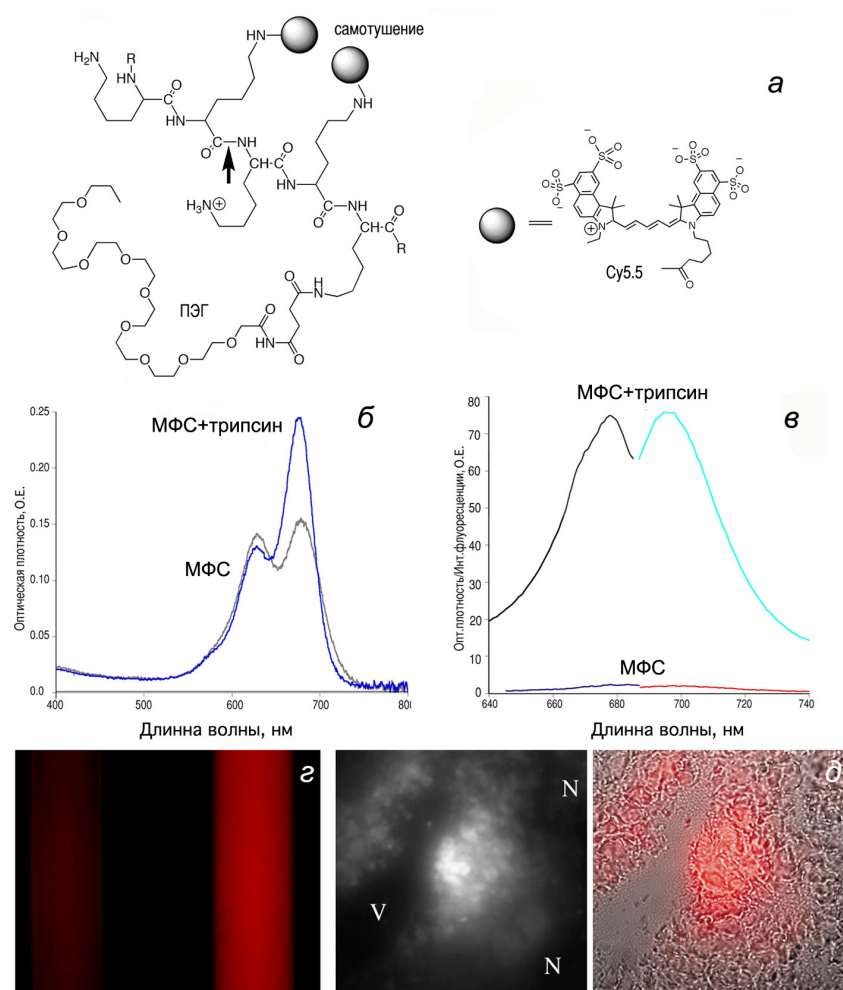


Рис. 4. Эффект самотушения флуоресценции и обнаружение протеолитической активности с помощью макромолекулярных флуоресцентных сенсоров.

(а) – протеолитическое расщепление МФС по пептидной связи (стрелка) приводит к фрагментации зонда и разделению пар Cy5.5-Cy5.5, подверженных самотушению,

(б) – спектры поглощения исходного зонда и продуктов трипсинолиза, которые содержат значительно больше мономеров,

(в) – спектры возбуждения и испускания флуоресценции до и после трипсинолиза, (г) – визуализация эффекта трипсинолиза с применением возбуждающего излучения в диапазоне волн 610–650 нм и испускания флуоресценции свыше 700 нм.

(д) – NIR флуоресценция в срезе опухоли. В центре показано совмещенное изображение в видимом свете и в NIR диапазоне. V-просвет сосуда, N- некротическая ткань. Адаптировано из [69–71].

подвержены гидролизу под воздействием, различных цистеиновых и сериновых протеиназ (рис. 4). Частичная ковалентная модификация N-ε-аминогрупп лизина с помощью активированных производных полиэтиленгликоля, то есть пэгилирования (ковалентного связывания с полиэтиленгликолем с другими молекулами или поверхностями) необходима для того, чтобы обойти проблемы, связанные с очень быстрым удалением этих МФС из кровотока и иммуногенностью полилизина. Кроме того, MPEG необходим для увеличения гидродинамического радиуса и, следовательно, увеличения времени циркуляции МФС *in vivo*. Полученный привитой сополимер (т.н. «стерически защищенный привитой сополимер» (рис. 2а, 4а) используют как для диагностической визуализации, так и для доставки лекарств (см. [54]) (см. таблицу).

Одним из преимуществ пэгилирования является то, что из-за очень высокого уровня гидратации (3 молекулы координированной воды с одним моноэтиленоксидным мономером PEG) и очень высокой сегментной гибкости, молекулы MPEG создают оболочку т.н. «мягкого вещества» вокруг центральной молекулы полилизина. Как следствие, полилизин и флуорохромы, ковалентно связанные с ним, предохранены от быстрого удаления МФС из кровотока. Другим важным свойством MPEG является способность предотвращать или замедлять активацию комплемента, и, как следствие, подавлять активацию иммунного ответа в присутствии биомакромолекул. В ходе экспериментов по оптимизации МФС мы установили, что для достижения моноэкспоненциального выведения из кровотока и предотвращения образования антител к полилизину подходит MPEG со средней массой 5000. Полученные МФС на основе MPEG-gPLL и используемые в начальных экспериментах *in vivo*, имеют приблизительную молекулярную массу 350–450 кДа и несут приблизительно 50–55 доступных для модификации свободных аминогрупп на молекулу [55]. В присутствии избытка активированного эфира цианиновых красителей не все доступные аминогруппы могут быть эффективно модифицированы в водной среде из-за стерических ограничений. Обычно удается связать приблизительно 30–45 молекул крупных цианиновых красителей на молекулу МФС, в зависимости от структуры красителя. Результатом является МФС, в котором большая часть флуорофоров находится в нефлуоресцирующей форме. Фоновая флуоресценция МФС обычно низка, а эффективность активации зависит от нескольких факторов: 1) способности красителей находиться в состоянии тушения, т. е. прочности димеризации красителя; 2) квантового выхода флуоресценции после фрагментирования сенсора; и 3) легкости образования фрагментов ацилиро-

Таблица. Макромолекулярные фермент-активируемые сенсоры и их использование для оптического имиджинга в животных

Ферментативная специфичность	Макромолекулярный носитель флуорофоров	Флуорофор (количество моль флуорофора/моль носителя)	Модель болезни	Соотношение интенсивности флуоресценции <i>in vivo</i> , цель/фон, (доза)	Метод имиджинга	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7
Катепсины L/S/B плазмин, эластаза, трипсин	MPEG-gPLL,	Cy5.5 (11)	Рак молочной железы	12	планарный, ИФ	[55]
				9.4 (250 пмоль) 27.5 (3.5 нмоль)	томографический ИФ (FMT)	[56]
				5	томографический ИФ (FMT)	[57]
				1.5-увеличение сигнала в инвазивном варианте опухоли	планарный, ИФ	[58]
				4.8 (внутривенное) 6.6 (подкожное)	планарный, ИФ	[59]
				3	планарный, ИФ	[60, 61]
				50–70% уменьшение сигнала после терапии	планарный, ИФ	[62]
				2–4.5	планарный, ИФ	[63]
				–	Планарный, время жизни флуоресценции	[64]
				IR Dye 800CW (12)	Инфаркт миокарда	–

Продолжение табл. см. на сл. стр.



Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7		
Катепсины L/S/B плазмин, эластаза, трипсин	ProSense-680	VivoTag 680 (6)	Карцинома легкого	7	Интравитальная микроскопия	[65]		
			Инфаркт миокарда	–	томографический ИФ (FMT)	[66]		
			Аденокарцинома кишечника	8,9	флуоресцентная эндоскопия	[67]		
			Рак поджелудочной железы	–	интравитальная фибро-оптическая конфокальная микроскопия	[68]		
			Азоксиметан индуцированные опухоли кишечника, Аденоматоз кишечника в мышцах линии <i>Apc</i> <sup>Min</sup>	–	томографический ИФ (FMT)	[69]		
			ProSense-750	VivoTag 750	Воспаление легких	–	томографический ИФ (FMT)	[70]
					Метастазы рака яичников в перитонеальной полости	3,5	лапароскопия	[71]
					Карцинома пищевода, ксенотрансплантаты человеческих клеток OE-33, OE-19	3,64+/-0,14, 4,50+/-0,11	флуоресцентная эндоскопия	[72]
			Пептиды с олиголизинным скелетом (PS-5, PS-25, PS-40)	VivoTag 680 (6)	атеросклероз	2,75 (PS-40)	томографический ИФ (FMT), планарный, ИФ	[73]

Окончание табл. см. на сл. стр.

*Окончание табл.*

1	2	3	4	5	6	7
Капелсин В	НРМА кополимер GFLG-этилендиамин	Su5 Su5/DQ	Рак молочной железы, меланома	2 (4 часа) 5 (24 часа)	планарный операционного поля, ИФ	[74]
Капелсин D	MPEG-gPLL	Su5.5 (22)	Капелсин D(+) опухоли		планарный, ИФ	[75]
Капелсин К		Su5.5 (18)	атеросклероз	1.7	интравитальная микроскопия	[76]
Тромбин		Su5.5	тромбоз	2	планарный, ИФ	[77]
Металлопротеиназа-2			Фибросаркома	3	планарный, ИФ	[78]
			Глиома	-	томографический ИФ (FMT),	[79]
Металлопротеиназы-2 и -9			Инфаркт миокарда	7	интравитальная микроскопия	[80]
Металлопротеиназы-2 и -9	MPEG-gPLL	Su5.5	Атеросклероз сосудов	5	томографический ИФ (FMT), планарный, ИФ	[81]
Металлопротеиназа-7	РАМАМ дендример	Su5.5 (8)	Аденома кишечника	2.2	планарный, ИФ	[82]
Металлопротеиназы -9, 2, 3, 7-10, 12-16	MPEG-gPLL (MMP sense)	Su5.5	Инсульт (ишемия мозга)	1.3	планарный, ИФ	[83]
Каспаза 1	MPEG-gPLL	Su5.5 (18)	Глиобластома	1.7	планарный, ИФ	[84]
Урокиназа		Su5.5, Cy7 (15-16)	Фибросаркома, аденокарцинома	3.1-3.2	планарный, ИФ	[85]
ПСА	PSAFAST	VevoTag750	Рак простаты (РС3, LNCaP)	-	томографический ИФ (FMT)	[86]

ИФ - интенсивность флуоресценции, FMT - флуоресцентная томография

ванного полилизина во время протеолиза. Среди различных NIR флуорохромов все вышеперечисленные параметры различаются, хотя и не очень сильно. Спектральные свойства МФС-связанных молекул Ф зависят от плотности связывания с полилизином. Если молекула МФС связана с менее чем 12 красителями на молекулу, то их спектры поглощения отражают небольшой процент близкого взаимодействия между отдельными красителями (пик поглощения с гипсохромным сдвигом очень мал (рис. 5 в)). Если плотность высока, т.е. более 35 Ф/ мол, наблюдается выраженный пик поглощения света, который характерен для образования *H*-димеров. Этот пик менее выражен в образцах после протеолитического расщепления сенсоров. Флуоресцентные свойства резко изменяются после протеолиза и приводит к многократному увеличению интенсивности флуоресценции (рис. 4в, г). Из всех тестированных молекул Ф гептаметиновый IRDye 800CW после связывания с МФС давал многократное увеличение интенсивности флуоресценции в результате активации протеазами (фрагментации). Расщепление МФС с помощью модельной протеазы зависит от того, связаны ли цианиновые красители с полилизином в условиях высокой, или низкой плотности пришивки и присоединены ли цепи MPEG к центральной цепи полилизина с использованием сложноэфирных (т.е. метастабильных) линкеров, или нет. Метастабильные линкеры подвергаются гидролизу неспецифическими эстеразами, а также быстро разлагаются в щелочных или кислых средах. Их присутствие обычно приводит к полной деградации МФС сенсоров на небольшие фрагменты, что приводит к большому увеличению интенсивности флуоресценции и времени жизни цианинов. В целом, изменения интенсивности выше для цианиновых красителей, которые флуоресцируют в дальнем красном диапазоне спектра, например, Cy5.5 (рис. 1), и вызывает удлинение времени жизни флуоресценции (до 5 раз), у которых время жизни флуоресценции длиннее, чем для собственно NIR Ф, т.е. Cy7 и IRDye 800CW (рис. 1). Однако, эксперименты по визуализации *in vivo* показывают, что гептаметиновые красители имеют преимущества, которые не ограничены спектральным диапазоном возбуждения и излучения флуоресценции у данных Ф. Предполагается, что защитные цепи MPEG теоретически могут препятствовать ферментативному расщеплению связей в МФС, но подобный сценарий маловероятен при относительно небольших гидродинамических диаметрах лизосомальных гидролаз. Тем не менее, медленная скорость расщепления типична для больших матричных протеаз, которые секретируются и активируются во внеклеточном

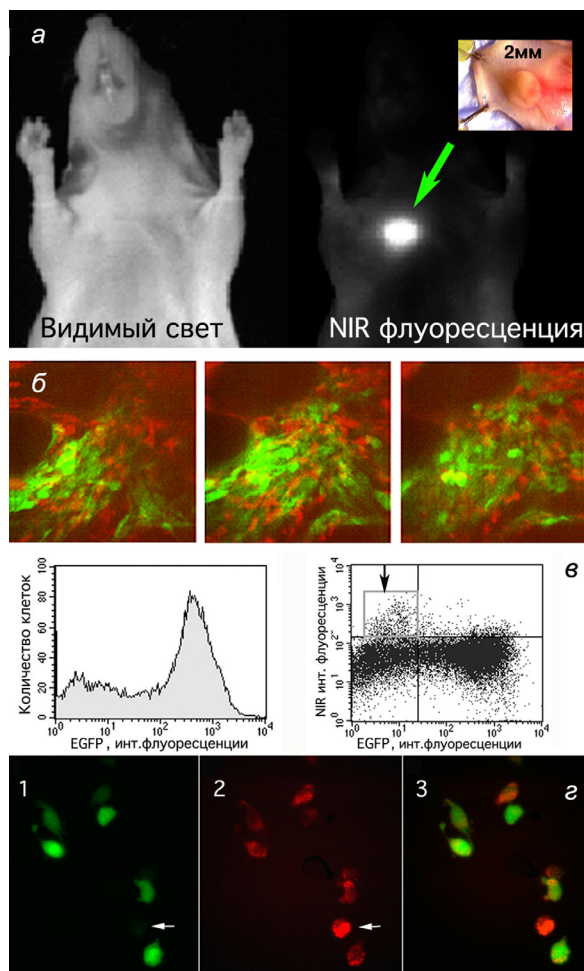


Рис. 5. Накопление и расщепление МФС в ксенографтах опухолей человека, имплантированных в атикусных мышей *in vivo*.

Изображение в видимом свете и в NIR диапазоне, полученное через 24 ч после внутривенного введения МФС (MPEG-gPLL, несущего самозатухающие молекулы Су5.5) (а); интравитальная флуоресцентная двуканальная микроскопия с использованием двухфотонного возбуждения флуоресценции EGFP и конфокальной микроскопии в NIR канале флуоресценции. Изображения получены в мышках с имплантированной опухолью глиомы, экспрессирующей EGFP, после инъекций МФС, на глубине примерно 100 мкм от поверхности кожи, расстояние по глубине между изображениями 15 мкм (б); проточная флуориметрия клеток, выделенных из опухоли. Фракция клеток с высокой интенсивностью NIR флуоресценции красителя Су5.5 показана стрелкой, (в); флуоресцентная микроскопия клеток, выделенных из опухоли. Клетки, не содержавшие EGFP, обладали наибольшей яркостью в NIR канале флуоресценции (г). Адаптировано из [70, 72].

пространстве, например, во внеклеточном матриксе. В любом случае, степень фрагментации МФС будет зависеть от того, могут ли протеаза и сенсор находиться в одном и том же объеме ткани в течение достаточного периода времени. В то время, как модельные сериновые протеазы имеют высокую каталитическую активность, реальные каталитические константы реакций *in vivo* могут быть значительно ниже, что, несомненно, влияет на чувствительность МФС. Тем не менее, благодаря длительному времени циркуляции в кровотоке и расщеплению МФС в клетках экспериментальных опухолей удалось провести успешную визуализацию опухолей в ксенотрансплантированных мышцах с высоким уровнем усиления NIR флуоресцентного сигнала в ткани (рис. 5).

Визуализация в животных позволила обнаруживать фемтомольные количества флуорохромов (0.8 пмоль) с сохранением достаточно высоких соотношений сигнал/фон = 4,6 (время визуализации – 5 мин). Имиджинг малых количеств флуорохрома в животных показала, что Су5.5 можно обнаруживать в концентрациях до 5 мкМ (250 пмоль флуорохрома) на глубине 5 мм от поверхности (время экспонирования 10 с, сигнал/фон = 9,4). Данный эффект является результатом действия нескольких факторов, т.е. накопления МФС в результате высокой проницаемости стенки сосудов; высокого уровня экспрессии катепсина в клетках стромы опухоли и в собственно раковых клетках, локализации продуктов расщепления полимерного зонда в лизосомах, т.е. внутри клеток. Дальнейший анализ с применением двуканальной трансдермальной микроскопии опухолей, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок показал, что именно в клетках стромы идет наиболее сильный захват и расщепление МФС (рис. 5, б–г).

Использование полилизиннов с природной «закодированной» катепсин-специфичностью оказалось практически возможным в многочисленных приложениях *in vivo*. Существует также множество гидролаз, включая катепсины, которые могут расщеплять полилизины либо со свободными, либо с ацилированными амино группами у МФС. Эти сенсоры были изначально разработаны без учета высокой селективности и специфичности для данного типа гидролаз. Специфичность предложили обеспечивать при помощи использования иодоацетилированного МФС в качестве «матрицы» для связывания синтетических пептидов, кодирующих специфические пептидные последовательности и несущих свободные цистеины, а также свободные аминокислоты [55]. Аминокислоты модифицировали различными цианиновыми Ф (например, Су5.5). В результате МФС, давали увеличение интенсивности флуоресценции до 350 раз после реакции с гидролазами, способными расщеплять такой линкер в

составе МФС. Добавление линкеров может также способствовать в решении проблемы потенциального отсутствия доступности к полилизинному «скелету» МФС. Однако проблема заключается в том, что даже такой более сложный дизайн МФС не предотвращает гидролиз несколькими внеклеточными протеазами одновременно (включая секретируемый клетками катепсин В [56]), которые способны приводить к гидролизу как полилизинного «скелета», так и собственно линкеров. Одним из возможных решений является использование поли-D-лизина, который не расщепляется природными протеазами. Этот подход был использован для синтеза стабильного, не подверженного гидролизу и долгоциркулирующего МФС (Angiosense), который широко использовался для мониторинга объема крови в органах с использованием оптической визуализации [57].

В некоторых случаях используются МФС, полученные на основе макромолекул, отличных по составу и структуре от MPEG-gPL, но также являющимися субстратами протеаз. В частности, для обнаружения неоплазии кишечника использовали полиамидоамин (РАМАМ), ковалентно связанный с Су5.5-мечеными пептидами в качестве макромолекулярного субстрата для ММР7. В опухолях, в клетках которых шла экспрессия и активация ММР7 данный оптически неактивный из за самотушения Су5.5 МФС уже через 3 часа после внутривенного введения наблюдали 2,2-кратное увеличение флуоресценции [58]. Визуализация *ex vivo* давала возможность наблюдать 6 кратное относительное увеличение сигнала и позволила идентифицировать опухоли диаметром 10 мм. В отличие от MPEG-gPL МФС на основе РАМАМ-дендримеров не подвергаются полному расщеплению протеазами. Широкая субстратная специфичность большинства протеаз осложняет визуализацию строго определенных классов протеаз в системах *in vivo*. Если целью визуализации является использование протеаз для амплификации сигнала, а не визуализация специфической протеолитической активности, можно использовать различные интернализуемые молекулы на поверхности мембран клеток для доставки флуоресцентных сенсорных молекул, например, состоящих конъюгата авидин-родамин X (Av-3ROX). Этот высокомолекулярный маннозилированный конъюгат имеет сродство к лектину на некоторых раковых клетках, способных метастазировать (таких как рак яичника, толстой кишки, желудка и поджелудочной железы). При связывании с лектином конъюгат интернализуется, и происходит его расщепление лизосомными протеазами на флуоресцирующие фрагменты (т.е. диссоциация авидиновых тетрамеров на мономеры и их расщепление). Этот подход основан

как на широкой специфичности лизосомальных ферментов, так и на способности лектинов клеточной поверхности специфически связывать маннаны авидина. [59]. При интравитальной визуализации в моделях метастазирования рака яичника с помощью Av-3ROX удалось наблюдать субмиллиметровые опухоли (с чувствительностью 92% и специфичностью 98%) при низком уровне фонового сигнала. В дальнейших работах использовался неиммуногенный заменитель авидина, связанный с галактозамином сывороточного альбумина (GmSA) с похожими результатами [60].

Таким образом, сенсоры, представляющие собой субстраты ферментов, имеют важные преимущества, т.е.: 1) сохраняют активность фермента (т. е. не вызывают необратимой инактивации ферментов; 2) имеют высокую растворимость в воде; 3) нетоксичны при концентрациях, намного превышающих дозу субстрата, необходимого для проведения визуализации *in vivo*; 4) имеют длительный период полувыведения MPEG-gPLL *in vivo* из организма, который позволяет субстрату накапливаться в ткани в результате локально повышенной проницаемости сосудов (например, в экспериментально полученных опухолях).

#### **V. ФАРМАКОКИНЕТИКА МФС, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ**

Макромолекулярные флуоресцентные сенсоры, полученные на основе долгоциркулирующих привитых сополимеров MPEG и полиаминокислот (например, MPEG-gPLL) несут в своей структуре по крайней мере один элемент (т.е. аминокислоту или их последовательность), которые распознаются активным центром протеаз. Как было упомянуто выше, эти макромолекулярные сенсоры способны доставлять Ф с последующей фермент-опосредованной активацией, являются крупными молекулами, которые, как правило, захватываются в органах ретикуло-эндотелиальной системы (т.е. печени и селезенки) в небольших количествах. Исключение составляют только МФС, полученные на основе сополимеров с низкой степенью пэггилирования или очень низкой степенью модификации центрального элемента молекулы, (т.е. 10% аминогрупп). В этом случае МФС обычно удаляются из кровообращения быстро (период полувыведения из крови <1 час). Известно, что биораспределение МФС у животных различных видов, (т.е. крыс, кроликов и приматов) приблизительно соответствует времени жизни MPEG-PL, у которого модифицированы все остаточные амино группы, например, после модификации хела-

тирующими молекулами. Период полувыведения пэгиллированных фермент-чувствительных макромолекулярных сенсоров из кровотока у разных видов варьирует от 24 ч (крыса) и до 32 часов (кролик). Длительная циркуляция в кровотоке дает медленное увеличение экстрavasации МФС в области повышенной проницаемости сосудов. В раковых опухолях и местах воспалительного поражения барьер стенок сосудов, как правило, обладает повышенной проницаемостью, но не является свободно проницаемым даже в случае относительно молекул размером 5–10 нм сходным с МФС. Если представить себе процесс экстрavasации МФС, описываемого граничными условиями масс-переноса через полупроницаемую стенку сосуда, то его можно описать уравнением Кедем-Качальского [61]. Тогда  $J_s$  (т.е. скорость переноса вещества, растворенного в крови, через стенку кровеносного сосуда, в данном случае, макромолекулярного МФС), может быть выражена в виде:

$$J_s = \omega RT(C_v - C_e) + J_v(1 - \sigma)\bar{C}, \quad (1)$$

где  $\bar{C} = 1/2(C_v + C_e)$  есть средняя концентрация МФС в кровотоке ( $C_v$ ) и во внесосудистом пространстве ( $C_e$ );  $J_v$  – поток объема жидкости;  $\sigma$  – коэффициент отражения Ставермана (в общем случае  $0 < \sigma < 1$ ),  $\omega$  – коэффициент проницаемости для растворенного вещества,  $RT$  – производное температуры и универсальной газовой постоянной. Первый член уравнения описывает диффузионный перенос, а второй член описывает скорость конвекции. Если принять температуру за константу, то:

$$\omega RT \cong PS,$$

где  $PS$  – произведение площади поверхности фильтрации и проницаемости сосуда.

Большая часть всех методов визуализации флуоресценции в живом организме основана на измерении интенсивности флуоресценции в органе с течением времени. В общем случае суммарная интенсивность флуоресценции, измеренная в органе, представляет собой сумму:

$$I_o(t) = I_e(t) + I_v(t), \quad (2)$$

где  $I_o$  – суммарная флуоресценция, т.е. интенсивность флуоресценции внесосудистого компартмента,  $I_v$  – интенсивность флуоресценции в кровотоке сосуда. Однако, для макромолекулярных и самозатухающих МФС, которые долго циркулируют в кровотоке в интактном состоянии,  $I_v$  приближается к 0 и, следовательно, уравнение (2) можно упростить:

$$I_o(t) \cong I_e(t).$$



Изменение интенсивности флуоресценции вне стенок сосуда (т. е. суммарной флуоресценции в органе-мишени ( $I_e$ ) в отсутствие самозатухающих, высвобождаемых ферментом флуоресцентных продуктов расщепления МФС), будет пропорционально увеличению концентрации свободного  $\Phi$  ( $L$ ), который будет высвобождаться при расщеплении МФС или иного другой макромолекулы-переносчика. Если предположить, что за время наблюдения увеличение интенсивности флуоресценции прямо пропорционально скорости высвобождения  $\Phi$  в результате расщепления МФС ферментом, то тогда начальная скорость изменения интенсивности флуоресценции может быть записана в виде:

$$dI_o/dt = dI_e/dt = A(dL/dt)$$

и скорость образования флуоресцентных фрагментов МФС ферментом может быть выражена в виде:

$$dL/dt = a \cdot c \cdot Dt, \quad (3)$$

где  $Dt$  – концентрация МФС в органе-мишени в любой момент времени,  $c$  – безразмерная концентрация  $\Phi$  в макромолекуле МФС,  $a$  – коэффициент пропорциональности. Таким образом, при наличии ненулевого потока крови  $J_v$  через орган-мишень внесосудистая интенсивность флуоресценции, измеренная в органе-мишени, в общем случае может быть выражена следующим образом:

$$I_o \cong I_e = A \cdot Dt \cdot c, \quad (4)$$

где  $Dt$  можно определить, используя начальную известную дозу МФС введенную внутривенно, т.е. ( $D_o$ ):

$$Dt = D_o \cdot B(1 - \exp(-B \cdot t))$$

$$B = (PS \cdot I_e) / (V_e K_{av}),$$

где:  $PS$  – производное поверхности и проницаемости сосудов, через которую происходит перенос МФС (т.е. макромолекулы-переносчика);  $J_v$  – скорость кровотока;  $V_e$  – внесосудистый объем и  $K_{av}$  – доступная доля внесосудистого объема (внесосудистая фракция). Некоторые из вышеуказанных параметров могут быть оценены экспериментально с использованием микроскопии и флуоресцентных изображений целого организма. Следует отметить, что в общем случае кинетика высвобождения (или образования флуоресцентного продукта) нелинейна и уравнение (3) записано в упрощенной форме. Флуоресцентные продукты расщепления МФС протеазами могут удерживаться во внесосудистом пространстве. Тогда, при отсутствии концентрационного тушения флуоресценции, зависимость  $I_o$  от  $Dt$  может быть в первом приближении описана

уравнением (4). Однако, скорость изменения  $I_0$  в идеальном случае должна отражать порядок ферментативной реакции, в общем случае неизвестного для большинства лизосомальных гидролаз или других ферментов, которые могут одновременно участвовать в гидролизе МФС во внеклеточном матриксе.

## **VI. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МФС, ОСНОВАННАЯ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

До настоящего времени доклинические подходы к визуализации на основе оптических методов основывались прежде всего на возбуждении флуоресценции и измерении ее интенсивности при помощи непрерывных постоянных источников света (CW). Однако, помимо преимуществ флуоресцентного имиджинга в живых системах, основанного на измерении интенсивности флуоресценции, имеется и ряд его очевидных недостатков, главным из которых является зависимость сигнала от многих параметров, которые в большинстве случаев трудно контролировать. Интенсивность флуоресценции зависит как от концентрации  $\Phi$ , так и времени жизни возбужденного состояния молекулы, после поглощения фотона. В общем случае, при измерении интенсивности флуоресценции вклад концентрации и времени жизни  $\Phi$  невозможно оценить по отдельности, поскольку как локальная концентрация молекулы, так и время жизни сигнала  $\Phi$ , независимо друг от друга влияют на интенсивность флуоресценции. Эффективность тушения флуоресценции в «активируемых» сенсорных молекулах обычно происходит не на 100% что может приводить к повышенной интенсивности фона, вклад которого мешает выявить искомый сигнал визуализации ферментативной активности. Более того, наиболее серьезная проблема для визуализации *in vivo* с помощью субстратов-сенсоров часто связана с эффектом активации сенсора, происходящим в органах ретикулоэндотелиальной системы (например, при неспецифической активации из-за деградации сенсорных молекул в печени). Этот нежелательный процесс ведет к высокому неспецифическому «фоновому» сигналу. Для того, чтобы более успешно разделять фоновый сигнал и собственно искомый сигнал (в нашем случае, обусловленный наличием ферментативной активности) можно применять временные в зависимости от типа используемой аппаратуры называемые либо частотный домен либо домен времен жизни в возбужденном состоянии) методы визуа-

лизации в обоих случаях с использованием параметров времени жизни флуоресцирующих молекул *in vivo*. Преимуществом этого метода является уникальный «почерк» затухания флуоресценции данной конкретной популяции молекул Ф, который пропорционален квантовому выходу процесса и, в общем случае, при постоянной температуре не зависит от концентрации Ф. Другие преимущества визуализации времени жизни включают а) независимость измерений от интенсивности возбуждающего флуоресценцию излучения, б) в некоторых случаях возможно разделять сигналы, соответствующие диффузионным фотонам возбуждающего излучения и собственно флуоресцентный сигнал; в) проводить мультиплексинг, то есть одно-временную визуализацию или измерения сигналов нескольких Ф, даже в том случае, даже если значительные различия в спектрах флуоресценции молекул отсутствуют.

Нами ранее был предложен и разработан экспериментальный подход к визуализации параметров времени жизни во временной домене *in vivo*, с использованием анализа многоэкспоненциальных кривых затухания сигнала, что позволяет оценивать относительные количества компонентов с длинным и коротким временем жизни путем анализа фракций по вкладу в общий флуоресцентный сигнал. С применением этого подхода нам удалось выявить в животных присутствие флуоресцентных продуктов расщепления молекул-сенсоров с длинным временем жизни (рис. 6а–в).

Мы показали, что измерение различий во времени жизни позволяет проводить визуализацию внутренних органов *in vivo*, которые невозможно по отдельности исследовать в режиме постоянной световой волны. Данное наблюдение было сделано при визуализации экспериментального инфаркта миокарда мыши благодаря устранению сильного фонового сигнала печени, который имел более короткое среднее время жизни, чем в зоне инфаркта миокарда [62] (Рисунок 6 б,в). Сам факт наличия коротких и длинных компонентов времени жизни продуктов протеолитического расщепления МФС несколько парадоксален, так как считалось, что ближне-инфракрасные Ф в сенсорах, полученных на основе MPEG-gPLL подвергаются тушению исключительно из-за статического эффекта, и что время жизни Ф в МФС при этом не должно изменяться [63].

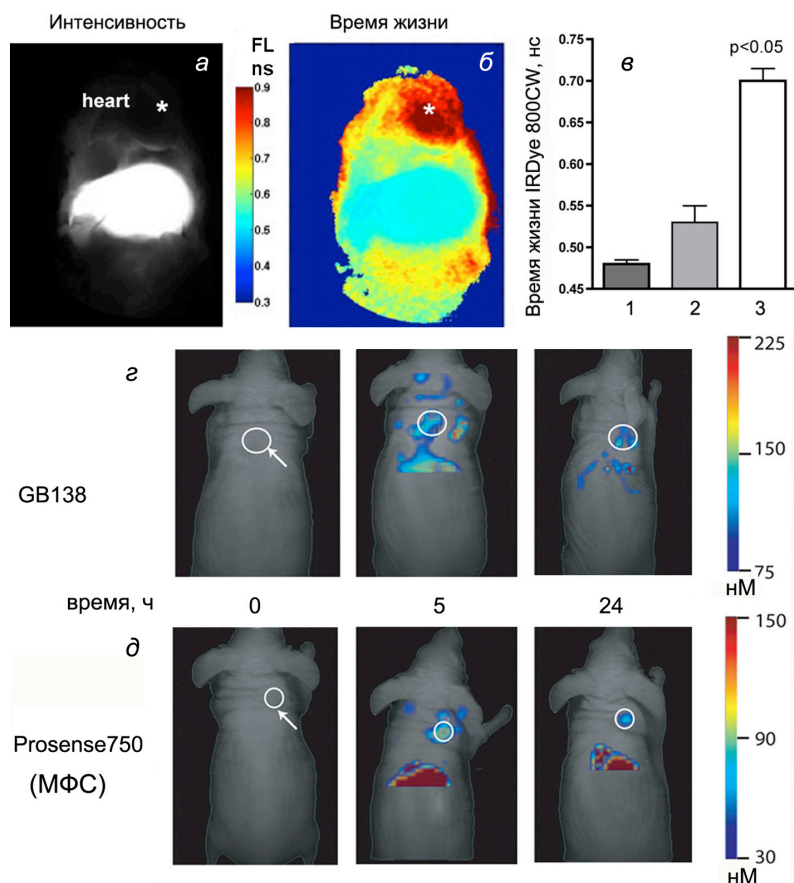


Рис. 6. Визуализация *in vivo* с применением метода времени жизни флуоресценции и флуоресцентной томографии (FMT).

Изображение, полученное с использованием традиционного непрерывного возбуждения флуоресценции в NIR диапазоне, показывает высокий уровень интенсивности флуоресценции в печени, который не позволяет наблюдать флуоресценцию в области сердца. Флуоресценцию IRDye 800CW измеряли после инъекции МФС и сравнивали с изменением интенсивности флуоресценции при экспериментальном инфаркте миокарда *in situ* (а); изображение на основе времен жизни флуоресценции показывает, что большее время жизни флуоресценции в области сердца является следствием процессов расщепления МФС типичного для ишемической области в миокарде (б); увеличение продолжительности жизни в области грудной клетки у мышей с инфарктом миокарда (3) было значительно выше, чем в печени контрольных (1) или печени мышей в экспериментальной группе с инфарктом миокарда (2),  $p < 0.05$  (в); изображение, полученное с использованием флуоресцентной томографии (FMT), показывающее накопление АВР (GB138) и МФС (Prosense 750) в модели ксенотрансплантации рака человека. Показаны FMT-реконструированные флуоресцентные сигналы в подкожных аденокарциномах у мышей (окружности) (г). Адаптировано из [68, 73].

## VII. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЕНСОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Продуктами расщепления МФС во внеклеточном пространстве (например, ММП, УПА и тромбин), являются флуоресцентные фрагменты, которые могут быстро диффундировать и удаляться из тканей, уменьшая тем самым чувствительность обнаружения ферментативной активности. Поэтому в качестве альтернативы МФС были предложены сенсоры на основе полиионной пары  $Cu^{5.5}$ -меченных пептидов, состоящих из трех элементов: 1) проникающих в клетку олигоаргининов (СРР), которые несут положительный заряд, 2) расщепляемый протеазой линкер; 3) отрицательно заряженный фрагмент, маскирующий заряд на СРР. Принцип работы т.н. активируемых СРР (АСРР) заключается в том, что АСРР способны накапливаться в межклеточном пространстве, не проникая в клетки до тех пор, пока линкер не будет расщеплен внеклеточной ММП, которая разделяет СРР и нейтрализующий пептид, облегчая тем самым взаимодействие с клеточной поверхностью. Таким образом, активированный ферментом сенсор может быть локализован в опухолевых клетках, в то время как исходный сенсор со временем будет удален из ткани, тем самым создавая контраст между тканями с высокой и низкой протеолитической активностью. Было показано, что в культуре опухолевых клеток и в образцах биопсии карциномы, секретирующей матриксные металлопротеиназы (2 и 9) имело место 2–3 кратное увеличение NIR флуоресценции по сравнению с фоном. Последующие исследования показали, что АСРР способствуют визуализации несколько различных типов рака (включая рак молочной железы) и что накопление АСРР было самым высоким на границе опухолевой стромы [64].

Альтернативная подход с применением т.н. «сенсоров, основанных на ферментативной активности, АВР», т.е. флуорогенных необратимых ингибиторов, основана на использовании реакционноспособной группы для ковалентной пришивки затушенного Ф к активному центру фермента [65, 66]. При ковалентной модификации Ф становится флуоресцирующим. В экспериментах с опухолями в бестимусных мышцах использовали АВР с тушителем NIR Ф (qNIRF-ABPs, рис. 2г), специфичный к лизосомальным цистеиновым протеазам, что позволило обнаружить опухоли *in vivo* (сигнал опухоли было примерно в 9 раз выше, чем окружающая ткань [67]) и определить уменьшение активности фермента после терапии соответствующим ингибитором фермента. Промежутки времени, требуемые для получе-

ния измеряемого оптического NIR сигнала различны в случае АВР и МФС, т.е. непосредственное сравнение двух методов является проблематичным. Однако, эффект амплификации не всегда приводит к общему увеличению оптического сигнала [68]. При визуализации с использованием флуоресцентно-опосредованной томографии (FMT) низкомолекулярные qNIRF-ABPs специфичные к катепсину давали высокий сигнал интенсивности флуоресценции в опухолях и низкий фон в печени и селезенке. Сравнение суммарного флуоресцентного сигнала FMT в подкожных (эктопических) опухолях молочной железы показало, что в случае qNIRF-ABP концентрация зонда в опухоли была выше. Однако, по сравнению с qNIRF-ABP результаты экспериментов с МФС (ProSense™, Perkin-Elmer) указывают значительный контраст между опухолями и легкими у животных и гораздо более яркий суммарный сигнал на более поздних стадиях по времени (см. рис. 6г, д) [68]. По всей видимости, наблюдаемые различия между qNIRF-ABP и сенсорами на основе МФС обусловлены различиями как в биораспределении, так и в активации. qNIRF-ABP быстро распределяются во внесосудистом пространстве и быстро выводятся, а ProSense (МФС) медленно диффундирует во внесосудистое пространство и медленно поглощается клетками, а флуоресцентные фрагменты МФС дольше удерживаются в клетках и способны флуоресцировать более длительное время, чем qNIRF-ABP. Последние подвергаются быстрому расщеплению, экзоцитозу, и захвату в лизосомы после ковалентного или не ковалентного взаимодействия с ферментами. Подобное экспериментальное сравнение свойств АВР сенсоров, «основанных на активности», и собственно флуорогенных субстратов способствовало работе по оптимизации и получению улучшенного дизайна низкомолекулярных сенсоров цистеиновых катепсинов [50] (рис. 2д).

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные сенсоры для оптических и фото(опто)акустических методов визуализации в живых системах становятся важными компонентами в фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях. Многие из них, в том числе и разработанные непосредственно для определения ферментативной активности *in vivo* вследствие фермент-опосредованной активации, становятся коммерчески доступными. Эти сенсоры могут использоваться для различных флуоресцентных методов обнаружения сигнала: от томографии всего организма до эндоскопии с использованием миниатюрных камер. Сенсорные молекулы в состоянии доставлять полезную

нагрузку в виде флуорофоров и имеют длительное время циркуляции *in vivo*, что позволяет обнаруживать сигналы, соответствующие искомой ферментной активности в течение продолжительных периодов времени, при низкой дозе самого сенсорного вещества. В будущем можно ожидать появление более эффективных «активируемых» зондов с оптимизированной чувствительностью к ферментативной активности, спектральными характеристиками, пригодными для интраоперационной визуализации хирургического поля, биосовместимостью и отсутствием иммуногенности и токсичности. Новые оптические методы визуализации, такими как продолжительность жизни флуоресценции и фото(опто)акустика, будут способствовать появлению более совершенных методов ранней диагностики болезней человека. Использование сенсоров для оптической визуализации *in vivo* будет включать более обширные доклинические применения экспериментальной терапии. В то же время, продолжающаяся разработка и совершенствование детекторов оптических сигналов, а также увеличение доступности биологически инертных и высокоспецифичных флуоресцентных зондов, будут в дальнейшем способствовать внедрению флуоресцентной визуализации в клинику.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Moats, R.A., Fraser, S.E., Meade, T.J. (1997) A «smart» magnetic resonance imaging agent that reports on specific enzymatic activity, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **36**, 726–731.
2. Gambhir, S.S., Herschman, H.R., Cherry, S.R., Barrio, J.R., Satyamurthy, N., Toyokuni, T., Phelps, M.E., Larson, S.M., Balatoni, J., Finn, R., Sadelain, M., Tjuvajev, J., Blasberg, R. (2000) Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies, *Neoplasia*, **2**, 118–138.
3. Bennett, J.J., Tjuvajev, J., Johnson, P., Doubrovin, M., Akhurst, T., Malholtra, S., Hackman, T., Balatoni, J., Finn, R., Larson, S.M., Federoff, H., Blasberg, R., Fong, Y. (2001) Positron emission tomography imaging for herpes virus infection: Implications for oncolytic viral treatments of cancer, *Nature Medicine*, **7**, 859–863.
4. Bogdanov, A.J., Matuszewski, L., Bremer, C., Petrovsky, A., Weissleder, R. (2002) Oligomerization of paramagnetic substrates results in signal amplification and can be used for MR imaging of molecular targets, *Mol. Imaging*, **1**, 16–23.
5. Law, B., Tung, C.H. (2009) Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, imaging, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1683–1695.
6. Edgington, L., Verdoes, M., Bogyo, M. (2011) Functional imaging of processes: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 798–805.
7. Pogue, B.W., Davis, S.C., Song, X., Brooksby, B.A., Dehghani, H., Paulsen, K.D. (2006) Image analysis methods for diffuse optical tomography, *J. Biomed. Opt.*, **11**, 33001.
8. Troyan, S.L., Kianzad, V., Gibbs-Strauss, S.L., Gioux, S., Matsui, A., Oketokoun, R., Ngo, L., Khamene, A., Azar, F., Frangioni, J.V. (2009) The

- FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping, *Ann. Surg. Oncol.*, **16**, 2943–2952.
9. Hutteman, M., van der Vorst, J.R., Mieog, J.S., Bonsing, B.A., Hartgrink, H.H., Kuppen, P.J., Lowik, C.W., Frangioni, J.V., van de Velde, C.J., Vahrmeijer, A.L. (2011) Near-infrared fluorescence imaging in patients undergoing pancreaticoduodenectomy, *Eur. Surg. Res.*, **47**, 90–97.
  10. Boogerd, L.S., Handgraaf, H.J., Lam, H.D., Huurman, V.A., Farina-Saracqueta, A., Frangioni, J.V., van de Velde, C.J., Braat, A.E., Vahrmeijer, A.L. (2017) Laparoscopic detection and resection of occult liver tumors of multiple cancer types using real-time near-infrared fluorescence guidance, *Surg. Endosc.*, **31**, 952–961.
  11. Mondal, S.B., Gao, S., Zhu, N., Liang, R., Gruev, V., Achilefu, S. (2014) Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery, *Adv. Cancer Res.*, **124**, 171–211.
  12. van der Vorst, J.R., Schaafsma, B.E., Verbeek, F.P., Keereweer, S., Jansen, J.C., van der Velden, L.A., Langeveld, A.P., Hutteman, M., Lowik, C.W., van de Velde, C.J., Frangioni, J.V., Vahrmeijer, A.L. (2013) Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients, *Oral Oncol.*, **49**, 15–19.
  13. Crane, L.M., Themelis, G., Pleijhuis, R.G., Harlaar, N.J., Sarantopoulos, A., Arts, H.J., van der Zee, A.G., Ntzia-christos, V., van Dam, G.M. (2011) Intraoperative multispectral fluorescence imaging for the detection of the sentinel lymph node in cervical cancer: a novel concept, *Mol. Imaging Biol.*, **13**, 1043–1049.
  14. Cataldo, A.M., Nixon, R.A. (1990) Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3861–3865.
  15. Edwards, D.R., Murphy, G. (1998) Cancer. Proteases-invasion and more, *Nature*, **394**, 527–528.
  16. Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G., Moses, M.A. (2000) Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3884–3889.
  17. Murray, G.I., Duncan, M.E., O’Neil, P., Melvin, W.T., Fothergill, J.E. (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer, *Nat. Med.*, **2**, 461–462.
  18. Chambers, A.F., Matrisian, L.M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**, 1260–1270.
  19. Folkman, J. (1999) Angiogenic zip code, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 749.
  20. Davidson, B., Goldberg, I., Kopolovic, J., Lerner-Geva, L., Gotlieb, W.H., Ben-Baruch, G., Reich, R. (1999) MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma—a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization, *Gynecol. Oncol.*, **73**, 372–382.
  21. Kanayama, H., Yokota, K., Kurokawa, Y., Murakami, Y., Nishitani, M., Kagawa, S. (1998) Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer, *Cancer*, **82**, 1359–1366.
  22. Sakakibara, M., Koizumi, S., Saikawa, Y., Wada, H., Ichihara, T., Sato, H., Horita, S., Mugishima, H., Kaneko, Y., Koike, K. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma, *Cancer*, **85**, 231–239.
  23. Shalinsky, D.R., Brekken, J., Zou, H., McDermott, C.D., Forsyth, P., Edwards, D., Margosiak, S., Bender, S., Truitt, G., Wood, A., Varki, N.M., Appelt, K. (1999) Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials, *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **878**, 236–270.



24. Smith, H.W., Marshall, C.J. (2010) Regulation of cell signalling by uPAR, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 23–36.
25. Jedeszko, C., Sloane, B.F. (2004) Cysteine cathepsins in human cancer, *Biol. Chem.*, **385**, 1017–1027.
26. Mohamed, M.M., Sloane, B.F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 764–775.
27. Keppler, D., Sameni, M., Moin, K., Mikkelsen, T., Diglio, C.A., Sloane, B.F. (1996) Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B & Co, *Biochem. Cell Biol.*, **74**, 799–810.
28. Foekens, J.A., Kos, J., Peters, H.A., Krasovec, M., Look, M.P., Cimerman, N., Meijer-van Gelder, M.E., Henzen-Logmans, S.C., van Putten, W.L., Klijn, J.G. (1998) Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, **16**, 1013–1021.
29. Harbeck, N., Alt, U., Berger, U., Kruger, A., Thomssen, C., Janicke, F., Hofler, H., Kates, R.E., Schmitt, M. (2001) Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, cathepsins B, D, L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2757–2764.
30. Jagodic, M., Vrhovec, I., Borstnar, S., Cufer, T. (2005) Prognostic and predictive value of cathepsins D and L in operable breast cancer patients, *Neoplasma*, **52**, 1–9.
31. Garcia, M., Platet, N., Liaudet, E., Laurent, V., Derocq, D., Brouillet, J.P., Rochefort, H. (1996) Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis, *Stem. Cells*, **14**, 642–650.
32. Macphee, C.H., Nelson, J.J., Zalewski, A. (2005) Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy, *Curr. Opin. Lipidol.*, **16**, 442–446.
33. Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C., Heinecke, J.W. (2001) Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase, *J. Biol. Chem.*, **276**, 41279–41287.
34. Orłowski, R.Z. (2004) Bortezomib and its role in the management of patients with multiple myeloma, *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **4**, 171–179.
35. Evans, J.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., Morris, A.D. (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients, *British Medical Journal*, **330**, 1304–1305.
36. Devy, L., Rabbani, S.A., Stochl, M., Ruskowski, M., Mackie, I., Naa, L., Toews, M., van Gool, R., Chen, J., Ley, A., Ladner, R.C., Dransfield, D.T., Henderikx, P. (2007) PEGylated DX-1000: pharmacokinetics and antineoplastic activity of a specific plasmin inhibitor, *Neoplasia*, **9**, 927–937.
37. Devy, L., Huang, L., Naa, L., Yanamandra, N., Pieters, H., Frans, N., Chang, E., Tao, Q., Vanhove, M., Lejeune, A., van Gool, R., Sexton, D. J., Kuang, G., Rank, D., Hogan, S., Pazmany, C., Ma, Y.L., Schoonbroodt, S., Nixon, A.E., Ladner, R.C., Hoet, R., Henderikx, P., Tenhoor, C., Rabbani, S.A., Valentino, M.L., Wood, C.R., Dransfield, D.T. (2009) Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, angiogenesis, *Cancer Res.*, **69**, 1517–1526.
38. Burden, R.E., Gormley, J.A., Jaquin, T.J., Small, D.M., Quinn, D.J., Hegarty, S.M., Ward, C., Walker, B., Johnston, J.A., Olwill, S.A., Scott, C.J. (2009) Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 6042–6051.
39. Elie, B.T., Gocheva, V., Shree, T., Dalrymple, S.A., Holsinger, L.J., Joyce, J.A. (2010) Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model, *Biochimie*, **92**, 1618–1624.
40. Funovics, M., Weissleder, R., Tung, C.H. (2003) Protease sensors for bioimaging, *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 956–963.

41. Leblond, F., Davis, S.C., Valdes, P.A., Pogue, B.W. (2010) Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications, *J. Photochem. Photobiol. B*, **98**, 77–94.
42. Marshall, M.V., Rasmussen, J.C., Tan, I.-C., Aldrich, M.B., Adams, K.E., Wang, X., Fife, C.E., Maus, E.A., Smith, L.A., Sevick-Muraca, E.M. (2010) Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update, *The Open Surgical Oncology Journal*, **2**, 12–25.
43. Sevick-Muraca, E.M. (2012) Translation of near-infrared fluorescence imaging technologies: emerging clinical applications, *Annu. Rev. Med.*, **63**, 217–231.
44. Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J. (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol.*, **7**, 392–401.
45. Feigl, G.C., Ritz, R., Moraes, M., Klein, J., Ramina, K., Gharabaghi, A., Krischek, B., Danz, S., Bornemann, A., Liebsch, M., Tatagiba, M.S. (2010) Resection of malignant brain tumors in eloquent cortical areas: a new multimodal approach combining 5-aminolevulinic acid and intraoperative monitoring, *J. Neurosurg.*, **113**, 352–357.
46. Querol, M., Bogdanov, A., Jr. (2006) Amplification strategies in MR imaging: activation and accumulation of sensing contrast agents (SCAs), *J. Magn. Reson. Imaging*, **24**, 971–982.
47. Wadghiri, Y.Z., Hoang, D.M., Leporati, A., Gounis, M.J., Rodriguez-Rodriguez, A., Mazzanti, M.L., Weaver, J.P., Wakhloo, A.K., Caravan, P., Bogdanov, A.A., Jr. (2018) High-resolution Imaging of Myeloperoxidase Activity Sensors in Human Cerebrovascular Disease, *Sci. Rep.*, **8**, 7687.
48. Lee, J., Bogyo, M. (2010) Development of near-infrared fluorophore (NIRF)-labeled activity-based probes for in vivo imaging of legumain, *ACS Chem. Biol.*, **5**, 233–243.
49. Verdoes, M., Oresic Bender, K., Segal, E., van der Linden, W.A., Syed, S., Withana, N.P., Sanman, L.E., Bogyo, M. (2013) Improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14726–14730.
50. Yim, J.J., Tholen, M., Klaassen, A., Sorger, J., Bogyo, M. (2018) Optimization of a Protease Activated Probe for Optical Surgical Navigation, *Mol. Pharm.*, **15**, 750–758.
51. Maeda, H., Ishida, N., Kawauchi, H., Tsujimura, K. (1969) Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. I. Covalent and non-covalent binding of fluorescein-isothiocyanate and fluorescein to proteins, *J. Biochem.*, **65**, 777–783.
52. French, T., So, P.T., Weaver, D.J., Jr., Coelho-Sampaio, T., Gratton, E., Voss, E.W., Jr., Carrero, J. (1997) Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing, *J. Microsc.*, **185**, 339–353.
53. Horino, K., Kindezelskii, A.L., Elner, V.M., Hughes, B.A., Petty, H.R. (2001) Tumor cell invasion of model 3-dimensional matrices: demonstration of migratory pathways, collagen disruption, intercellular cooperation, *Faseb J.*, **15**, 932–939.
54. Bogdanov, A.J., Mazzanti, M., Castillo, G., Bolotin, E. (2012) Protected graft copolymer (PGC) in imaging and therapy: a platform for the delivery of covalently and non-covalently bound drugs *Theranostics*, **2**, 553–576.
55. Tung, C.H., Bredow, S., Mahmood, U., Weissleder, R. (1999) Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging, *Bioconjug. Chem.*, **10**, 892–896.
56. Sloane, B.F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Cher, M.L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Donescu, J., Moin, K. (2005) Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution

- of the tumor microenvironment, *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 149–157.
57. Zhang, R., Brennan, M.L., Fu, X., Aviles, R.J., Pearce, G.L., Penn, M.S., Topol, E.J., Sprecher, D.L., Hazen, S.L. (2001) Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease, *JAMA*, **286**, 2136–2142.
58. Scherer, R.L., VanSaun, M.N., McIntyre, J.O., Matrisian, L.M. (2008) Optical imaging of matrix metalloproteinase-7 activity in vivo using a proteolytic nanobeacon, *Mol. Imaging*, **7**, 118–131.
59. Hama, Y., Urano, Y., Koyama, Y., Kamiya, M., Bernardo, M., Paik, R.S., Shin, I.S., Paik, C.H., Choyke, P.L., Kobayashi, H. (2007) A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched avidin-rhodamine conjugate, *Cancer Res.*, **67**, 2791–2799.
60. Hama, Y., Urano, Y., Koyama, Y., Gunn, A.J., Choyke, P.L., Kobayashi, H. (2007) A self-quenched galactosamine-serum albumin-rhodamineX conjugate: a «smart» fluorescent molecular imaging probe synthesized with clinically applicable material for detecting peritoneal ovarian cancer metastases, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6335–6343.
61. Kedem, O., Katchalsky, A. (1958) Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 229–246.
62. Goergen, C., Chen, H., Bogdanov, A.J., Sosnovik, D., Kumar, A. (2012) In vivo fluorescence lifetime detection of an activatable probe in infarcted myocardium, *Journal of Biomedical Optics*, **17**, DOI: 10.1117/1.1111. JBO.1117.1115.056001.
63. Kumar, A.T.N., Rice, W.L., López, J.C., Gupta, S., Goergen, C.J., Bogdanov, A.A. Jr. (2016) Substrate-based near-infrared imaging sensors enable fluorescence lifetime contrast via built-in dynamic fluorescence quenching elements., *ACS Sensors*, **1**, 427–436.
64. Olson, E.S., Aguilera, T.A., Jiang, T., Ellies, L.G., Nguyen, Q.T., Wong, E.H., Gross, L.A., Tsien, R. (2009) In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer, *Integr. Biol. (Camb)*, **1**, 382–393.
65. Kato, D., Boatright, K.M., Berger, A.B., Nazif, T., Blum, G., Ryan, C., Chehade, K.A., Salvesen, G.S., Bogyo, M. (2005) Activity-based probes that target diverse cysteine protease families, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 33–38.
66. Blum, G., Mullins, S.R., Keren, K., Fonovic, M., Jedeszko, C., Rice, M.J., Sloane, B.F., Bogyo, M. (2005) Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 203–209.
67. Blum, G., von Degenfeld, G., Merchant, M.J., Blau, H.M., Bogyo, M. (2007) Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 668–677.
68. Blum, G., Weimer, R.M., Edgington, L.E., Adams, W., Bogyo, M. (2009) Comparative assessment of substrates and activity based probes as tools for non-invasive optical imaging of cysteine protease activity, *PLoS One*, **4**, e6374.
69. Bogdanov, A.A., Mazzanti, M.L. (2013) Fluorescent Macromolecular Sensors of Enzymatic Activity for In Vivo Imaging, *Prog. Mol. Biol. Transl.*, **113**, 349–387.
70. Weissleder, R., Tung, C.H., Mahmood, U., Bogdanov, A. (1999) In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nat. biotechnol.*, **17**, 375–378.
71. Bogdanov, A.A., Mazzanti, M., Castillo, G., Bolotin, E. (2012) Protected Graft Copolymer (PGC) in Imaging and Therapy: A Platform for the Delivery of Covalently and Non-Covalently Bound Drugs, *Theranostics*, **2**, 553–576.
72. Bogdanov, A.A., Lin, C.P., Simonova, M., Matuszewski, L., Weissleder, R. (2002) Cellular activation of the self-quenched fluorescent reporter probe in tumor microenvironment, *Neoplasia*, **4**, 228–236.

73. Goergen, C.J., Chen, H.H., Bogdanov, A., Sosnovik, D.E., Kumar, A.T. (2012) In vivo fluorescence lifetime detection of an activatable probe in infarcted myocardium, *J. Biomed. Opt.*, **17**, 056001.