

УДК 615.2

ЦИСТЕИНОВЫЕ КАТЕПСИНЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ*

Обзор

© 2019 А.И. Петушкова¹, Л.В. Савватеева¹,
Д.О. Королев², А.А. Замятнин м.л.^{1,3**}

¹ Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991 Москва, Россия; электронная почта: zamyat@belozersky.msu.ru

² Институт урологии и репродуктивного здоровья человека, Первый Московский
государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2019

После доработки 18.04.2019

Принята к публикации 19.04.2019

Цистеиновые катепсины являются протеолитическими ферментами, обеспечивающими функцию деградации белков в лизосомах и эндосомах. При онкогенезе цистеиновые катепсины выявляют в микроокружении опухолей, где эти ферменты участвуют в процессах пролиферации, инвазии и метастазирования, обеспечивая деградацию внеклеточного матрикса, разрушение межклеточных взаимодействий и стимулируя ангиогенез. В связи с этим катепсины имеют диагностическую значимость и являются перспективными мишенями при разработке противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование этих ферментов. Цистеиновые катепсины также могут быть использованы в качестве активаторов новых противоопухолевых препаратов направленного действия. В данном обзоре собраны современные данные о роли цистеиновых катепсинов в онкогенезе, а также отмечены основные направления развития работ в области диагностики и терапии онкологических заболеваний, использующих цистеиновые катепсины в качестве маркеров, мишеней или активаторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цистеиновые катепсины, онкогенез, противоопухолевая терапия, направленная доставка, протеолиз, диагностика.

DOI: 10.1134/S0320972519070066

Цистеиновые катепсины являются гомологичными протеиназами клана SA цистеиновых пептидаз, экспрессирующимися в различных клетках и тканях многих видов организмов [1]. Методами биоинформатического анализа в геноме человека было идентифицировано 11 цистеиновых катепсинов: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W

и X(Z). Представители цистеиновых катепсинов проявляют разнообразную каталитическую активность: катепсины F, O, S, K, V, L и W представляют собой эндопептидазы с широкой субстратной специфичностью, катепсины H и B обладают как эндо-, так и экзопептидазной активностью, тогда как катепсины C и X являются

Принятые сокращения: APC – антиген-презентирующие клетки; DC – дендритные клетки; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ECM – внеклеточный матрикс; NK – естественные киллеры; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; TAM – макрофаги, ассоциированные с опухолью; MMP – матриксные металлопротеиназы; PGA – поли- γ -глутаминовая кислота; ADC – конъюгаты антител с лекарственным средством; MMAE – монометилауристатин E; ICG – индоцианин зеленый; FRET – ферстеровский перенос энергии.

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (Link.springer.com), том 84, вып. 7, 2019.

** Адресат для корреспонденции.

исключительно амино- и карбоксипептидазой соответственно. Наибольшую активность цистеиновые катепсины проявляют в средах с пониженными значениями pH, вследствие чего изначально считалось, что функционирование этих ферментов ограничивается лизосомами и эндосомами. Однако появляется все больше данных о высокоспецифичной и направленной протеолитической активности катепсинов в других компартментах клеток, таких как секреторные везикулы, цитозоль и ядро, а также вне клеток [2].

Основной функцией катепсинов является низкоспецифичная деградация белков в лизосоме, однако некоторые представители этой группы ферментов выполняют и другие функции. Так, при пермеабиллизации лизосомальной мембраны катепсины В, Н, L, S и К активируют проапоптотический белок семейства Bcl-2 Bid. Получаемый в результате этого процесса усеченный t-Bid способствует олигомеризации белков Bax и Bak [3], запуская процесс апоптоза. Также цистеиновые катепсины могут индуцировать апоптоз, разрушая связанный с X-хромосомой ингибитор апоптоза и антиапоптотические белки, такие как Bcl-2 и Bcl-xL. Кроме того, показано, что цистеиновые катепсины способны активировать каспазу-3, каспазу-7 и каспазу-9 [4]. Катепсин К, ген которого преимущественно экспрессируется в остеокластах, большинстве эпителиальных клеток и в синовиальных фибробластах суставов при ревматоидном артрите, играет существенную роль в резорбции костной ткани [5]. Каталитически активные варианты катепсина L, локализованные в ядре, играют роль в регуляции клеточного цикла и протеолитической обработке N-конца гистона H3 [6]. Катепсин S преимущественно экспрессируется в антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки (DC) и В-клетки, где он совместно с катепсинами F, L и V расщепляет инвариантную цепь с образованием пептидов, необходимых для презентации антигена главным комплексом гистосовместимости (МНС) класса II, который распознается CD4⁺-Т-клетками [7]. Ген катепсина W в основном экспрессируется в CD8⁺-лимфоцитах и естественных киллерах [8]. Таким образом, цистеиновые катепсины выполняют различные функции в клетках и тканях, однако их активность строго регулируется. Преимущественная локализация катепсинов в лизосомах ограничивает область их действия, экспрессия эндогенных ингибиторов предотвращает избыточную активность, а низкие уровни pH необходимы для оптимальной работы катепсинов. Совокупность этих факторов позволяет организму предотвращать

деградацию катепсинами белков цитоплазмы и межклеточного матрикса. Однако повышение уровня экспрессии и активности катепсинов часто связано с развитием различных патологических состояний, таких как неврологические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, ревматоидный артрит и рак.

Исследования механизмов экспрессии, а также функций цистеиновых катепсинов в процессах онкогенеза позволяют открывать новые перспективы в терапии и диагностике рака. Онкогенез является комплексным процессом, в ходе которого опухолевые клетки обеспечивают передачу сигналов пролиферации, уклоняются от действия супрессоров роста и активаторов клеточной смерти, обладают непрерывным репликативным потенциалом, индуцируют ангиогенез, инвазию и метастазирование, проявляют нестабильность генома и подвергаются мутагенезу, вызывают воспалительный ответ, перестраивают энергетический обмен в клетке и подавляют иммунный ответ [9]. Для реализации многих из этих функций опухолевые клетки поддерживают определенное микроокружение, состоящее из внеклеточного матрикса (ЕСМ) и стромальных клеток. Динамическая трехмерная структура ЕСМ образована коллагенами, ламининами, фибронектинами, протеогликанами и гиалуронанами. В ЕСМ также содержатся цитокины, факторы роста, гормоны и ферменты, секретируемые раковыми клетками и клетками, ассоциированными с опухолью. Стромальные клетки представлены фибробластами и миофибробластами, нейроэндокринными клетками, жировыми клетками, иммунными клетками, а также клетками кровеносных и лимфатических сосудов [10].

В нормальных условиях микроокружение способно подавлять рост злокачественных клеток, однако в случае успешного развития опухоли микроокружение начинает работать как аберрантная ткань и играть критическую роль в развитии злокачественного новообразования. Так, ассоциированные с опухолью фибробласты способствуют росту опухоли и опосредуют терапевтическую устойчивость, секретируя провоспалительные цитокины, ангиогенные факторы, которые рекрутируют макрофаги и участвуют в ремоделировании ЕСМ [11]. Эндотелиальные клетки, ассоциированные с опухолью, секретируют ангиокринные факторы, способствуя пролиферации и метастазированию опухоли [12]. Среди иммунных клеток в опухоли различают макрофаги, DC, естественные киллеры, супрессорные клетки миелоидного происхождения и регуляторные Т-клетки. Они характеризуются нарушенным иммунным ответом. Также было

показано, что NK и T-клетки опухоли секретируют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), способствуя ангиогенезу [13].

Ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ) являются наиболее распространенными лейкоцитами в опухолевой строме и выполняют важные функции в разнообразных процессах, имеющих решающее значение для пролиферации и метастазирования опухоли. Повышенное количество ТАМ в опухоли коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания, поэтому в последние годы появляется все больше исследований, посвященных поиску терапевтических препаратов, нацеленных на ТАМ [14]. ТАМ относят к M2-поляризованным макрофагам, также известным как альтернативно активированные макрофаги. M2-поляризации подвергаются резидентные макрофаги и моноциты, рекрутированные в микроокружение опухоли [15] под действием цитокинов Th2, таких как IL-4, IL-10 и IL-13 [16], колониестимулирующих факторов 1 и 2 [17], хемокинов CCL 2, 3, 14 и 20 [18] и других активных веществ, экспрессируемых опухолевыми и стромальными клетками, ассоциированными с опухолью. M2-поляризация макрофагов в микроокружении опухоли характеризуется повышенной экспрессией матриксных металлопротеиназ (ММР) и цистеиновых катепсинов, последние из которых могут функционировать как в лизосоме, так и в качестве секреторируемых ферментов для деградации внеклеточного матрикса [19].

В настоящем обзоре приведены данные о вовлеченности цистеиновых катепсинов в такие онкогенные процессы, как пролиферация, ангиогенез, инвазия, метастазирование и химиорезистентность. Кроме того, рассмотрены примеры использования этих ферментов в качестве маркеров, мишеней и активаторов при создании новых диагностических и терапевтических подходов для эффективного лечения онкологических заболеваний.

ЦИСТЕИНОВЫЕ КАТЕПСИНЫ В ПРОЦЕССАХ ОНКОГЕНЕЗА

В микроокружении опухоли наблюдается избыточная экспрессия и высокая активность определенных катепсинов, имеющих нехарактерную локализацию. Помимо непосредственно опухолевых клеток, катепсины секретируются ассоциированными с опухолью T-клетками, фибробластами, остеокластами, нейтрофилами, тучными клетками, миоэпителиальными клетками и эндотелиальными клетками [20] (табл. 1; в табл. S1 Приложения представлены ссылки на

первоисточники). Считается, что при онкогенезе к секреции катепсинов во внеклеточное пространство может приводить перенос лизосом из перинуклеарного пространства к периферии клетки [21], а подкисленная внеклеточная среда опухоли способствует поддержанию активности ферментов. Еще одной вероятной причиной наличия катепсинов в ЕСМ может являться нарушение молекулярных взаимодействий рецептора инсулиноподобного фактора роста 2 (рецептор маннозо-6-фосфата), который ответственен за перенос белков в лизосомы. Пониженный уровень экспрессии этого рецептора в злокачественных клетках также может способствовать секреции катепсинов [22].

Эндогенные ингибиторы катепсинов, присутствующие в ЕСМ, могут подвергаться гидролизу протеолитическими ферментами. Так, было показано, что наиболее мощный эндогенный ингибитор цистеиновых катепсинов цистатин С расщепляется аспартадной протеиназой прокатепсином D и матриксной металлопротеиназой ММР2. Имеются данные, что ММР могут расщеплять цистатины E и M, увеличивая активность катепсинов [23], а прокатепсин D может активировать прокатепсин B, превращая его в зрелый фермент [24].

Активные катепсины способствуют ангиогенезу, пролиферации и метастазированию опухоли. Считается, что наиболее важный вклад в онкогенез человека вносят цистеиновые катепсины B, S, L и X [25]. Сверхэкспрессия в опухолях и, как следствие, повышенное содержание в сыворотке крови этих ферментов, как правило, связаны с неблагоприятными прогнозами при многих онкологических заболеваниях. При этом значимость отдельных катепсинов может варьироваться в зависимости от типа опухоли и ее локализации.

Роль катепсинов в инвазии и метастазировании. Катепсины способны расщеплять молекулы клеточной адгезии, такие как интегрины и E-кадгеринины, нарушая межклеточные контакты и способствуя отсоединению клеток опухоли [25]. E-кадгеринины гидролизуются преимущественно катепсинами B, L и S, приводя к получению различных продуктов расщепления [20]. Деградация матриксных белков также нарушает взаимодействие между опухолевыми клетками. Было показано, что катепсины B и S гидролизуют коллаген, ламинин, фибронектин и тенасцин C [26]. Кроме того, катепсин B играет важную роль в продвижении и высвобождении содержимого опухолевых экзосом [27]. Катепсины также способны расщеплять базальную мембрану, способствуя инвазии клеток опухоли в кровеносные и лимфатические сосуды, приводя к

Таблица 1. Экспрессия катепсинов в различных типах опухолей

| Катепсин | Опухолевые клетки | Ассоциированные с опухолью клетки | | | |
|------------|---|---|--|---|--|
| | | макрофаги | фибробласты | эндотелиальные клетки | остеокласты |
| Катепсин В | опухоль головного мозга, рак кожи, рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак яичника, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы | опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак поджелудочной железы | рак кожи, рак молочной железы, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы | опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак желудка | рак молочной железы, рак щитовидной железы |
| Катепсин С | рак кожи | н.д. | рак кожи | н.д. | н.д. |
| Катепсин F | рак шейки матки | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Катепсин Н | опухоль головного мозга, рак кожи, рак предстательной железы, колоректальный рак | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Катепсин К | рак кожи, рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак предстательной железы | рак легкого | рак кожи, рак молочной железы | н.д. | опухоль кости, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак почки |
| Катепсин L | опухоль головного мозга, рак кожи, рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак яичника, колоректальный рак, рак поджелудочной железы | рак поджелудочной железы | рак кожи, рак поджелудочной железы | н.д. | н.д. |
| Катепсин S | опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак желудка, рак предстательной железы, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы | рак молочной железы, рак предстательной железы, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома | н.д. | гепатоцеллюлярная карцинома | н.д. |
| Катепсин V | рак щитовидной железы | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Катепсин X | рак желудка, рак предстательной железы, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы | рак желудка, колоректальный рак | н.д. | н.д. | н.д. |

Примечание. Н.д. – нет данных.

метастазированию и опухолеобразованию в других частях организма [28]. Катепсин Н способствует миграции опухолевых клеток через расщепление талина, который регулирует активацию интегрин и адгезию [29]. Существуют данные, что катепсин К расщепляет коллаген I и остеонектин в костях и потому ответственен за остеолит при метастазировании в кости. При этом катепсин К гидролизует белки матрикса после фагоцитоза, а не в ЕСМ [30]. Катепсин S,

как было показано, играет решающую роль при метастазах рака молочной железы в мозг. Он способен расщеплять адгезивные молекулы семейства JAM, в частности JAM-B, что приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера. Этому способствует проявление активности катепсина S при нейтральных уровнях pH в сосудах головного мозга [31].

Катепсин X способствует адгезии, миграции и инвазивности опухолевых клеток через инак-

тивацию опухолевого супрессора профилина 1 в перинуклеарном пространстве и на плазматической мембране [32]. В случае гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что катепсин X участвует в онкогенезе путем активации белков, связанных с ремоделированием ЕСМ (ММР2, ММР3 и ММР9). Катепсин X также может способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу через активацию мезенхимальных маркеров (фибронектин и виментин) и подавление эпителиальных маркеров (Е-кадгерин и α -катенин) [33]. Кроме того, зимоген катепсина X задействован в онкогенезе за счет связывания с интегринами как внутриклеточно, так и в ЕСМ. Это приводит к активации FAK/Src-пути пролиферации и к ремоделированию актинового цитоскелета и инвазивности раковых клеток [34].

При деградации белков ЕСМ катепсинами могут образовываться проангиогенные фрагменты, что, в частности, показано для катепсина S в отношении ламинина 5 [35]. Кроме того, катепсины могут активировать другие ферменты, запуская сигнальные пути, которые приводят к активации факторов роста и цитокинов. Так, катепсин L способен активировать гепараназу, которая регулирует ангиогенез и лимфоангиогенез через высвобождение факторов роста [36]. Было отмечено, что деградация эндогенных тканевых ингибиторов металлопротеиназ катепсином В усиливает проангиогенные функции ММР [37]. Катепсин S способен расщеплять некоторые антиангиогенные факторы, такие как канстатин и аррестин [38]. Напротив, катепсины L и S способны генерировать антиангиогенный пептид эндостатин из коллагена XVIII [39]. При этом было показано, что экспрессия катепсина S в опухолевой среде усиливается в присутствии VEGF [40].

Роль катепсинов в химиорезистентности. Согласно имеющимся данным, катепсины могут играть решающую роль в развитии резистентности опухоли при применении различных видов противоопухолевой терапии. Например, ТАМ, на которые приходится большая часть секретируемых катепсинов [21], способны ингибировать гибель раковых клеток, индуцированную таксоллом, этопозидом и доксорубицином. Более того, после проведения химиотерапии отмечалось привлечение новых макрофагов в опухолевую ткань. В исследовании Shree et al. [41] показано, что ингибирование активности катепсинов макрофагов оказалось достаточным для инициации гибели опухолевых клеток. При этом наиболее значимыми катепсинами в развитии резистентности оказались катепсины В и S. Действие гемцитабина и 5-фторурацила на-

правлено на супрессорные клетки миелоидного происхождения, которые подавляют активацию Т-клеток. Однако в процессе гибели иммуносупрессорных клеток происходит высвобождение катепсина В из лизосом, что запускает целый каскад воспалительных реакций через активацию NLRP3-инфламмосомы, способствуя, в конечном итоге, ангиогенезу и привлечению новых супрессорных клеток [42]. В связи с тем, что активность катепсина В связана с транспортом везикул, содержащих TNF- α , к поверхности макрофагов, резистентность к химиотерапии может быть опосредована также через активацию NF- κ B или через экспрессию IL-6 в неопластических клетках с последующей активацией STAT3 [43]. С другой стороны, было показано, что пермеабиллизация лизосомальной мембраны, вызванная химиотерапией тимохиноном, индуцирует независимый от каспаз путь апоптоза раковых клеток. Высвобождение катепсинов В и D из лизосом и подкисление цитозоля, вызванные пермеабиллизацией, индуцируют передачу сигнала медиаторам гибели клеток [14]. Тем не менее было показано, что ингибиторы катепсинов В и D способны вызывать гибель клеток нейробластомы, индуцированную активацией зависимого от каспаз пути. Поскольку катепсины необходимы для аутофагии, апоптоз, по всей видимости, является результатом ингибирования этого цитопротекторного пути [44].

В случае использования терапии ионизирующим излучением повреждается ДНК, что приводит к индукции интерферона γ . Через регуляторный фактор 1 интерферона он увеличивает экспрессию катепсина S. Катепсин S, в свою очередь, способствует устойчивости опухоли к ионизирующему излучению [45].

ЦИСТЕИНОВЫЕ КАТЕПСИНЫ В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ И АКТИВАТОРОВ

Ингибирование протеолитической активности катепсинов. Избыточная активность катепсинов в опухолевых клетках зачастую вызвана нарушением работы цистатинов — эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ. Поэтому поиск экзогенных ингибиторов катепсинов является перспективным направлением в разработке новых противоопухолевых средств. Использование различных ингибиторов цистеиновых протеиназ (табл. 2) способствует предотвращению процессов ангиогенеза, инвазии и метастазирования опухолевых клеток.

Низкомолекулярные ингибиторы. Низкомолекулярные ингибиторы, применяемые для бло-

Таблица 2. Примеры экзогенных ингибиторов протеиназной активности цистеиновых катепсинов

| Ингибитор | Катепсин | Тип опухоли | Экспериментальная модель | Источник |
|-------------------------------------|--|-------------------------------|---|----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Низкомолекулярные ингибиторы | | | | |
| E-64 | катепсины | рак почки | клеточные линии A498, 786-O | [93] |
| | катепсин B, катепсин L | рак яичника | линия мышей M5076 | [94] |
| | катепсин B, катепсин L | рак печени | клеточная линия H-59 | [95] |
| | катепсин L | рак молочной железы | клеточная линия MDA-MB-231 | [96] |
| JPM-OEt | катепсины | рак молочной железы | линия мышей MMTV-PyMT | [97] |
| | | рак поджелудочной железы | линия мышей RIP1-Tag2 | [47] |
| CATI-1 | катепсины | опухоль шеи | клеточная линия SQ20B | [48] |
| | | рак молочной железы | клеточная линия BT-20 | |
| | | рак предстательной железы | клеточные линии PC-3, DU145 | |
| | | глиобластома | клеточная линия U-373 | |
| | | рак шейки матки | клеточная линия HeLa | |
| | | острый лимфобластный лейкоз | клеточные линии ALL-1, RS4;11, KM3, NALM-6, MOLT-3, JURKAT | [98] |
| | | острый миелоидный лейкоз | клеточные линии HL-60, U937 | |
| | | хронический миелоидный лейкоз | клеточная линия K-562 | |
| | | лимфома Беркитта | клеточные линии DAUDI, RAMOS, RAJI | |
| CA-074 | катепсин B | рак молочной железы | клеточная линия 4T1.2, в т.ч. ксенотрансплантат в мышцах Balb/c | [99] |
| | | рак молочной железы | клеточная линия MDA-MB-231 | [100] |
| | | меланома | клеточная линия MV3 | [101] |
| Нитроксолин и производные | катепсин B | рак молочной железы | клеточная линия MCF-10A-NeoT | [56] |
| | | лейкоз | клеточная линия HL-60 | [54] |
| | | лимфома | клеточные линии Raji, DHL-4 | |
| | | рак поджелудочной железы | клеточная линия Panc-1 | |
| | | рак яичника | клеточная линия A2780 | |
| глиобластома | клеточные линии U-87 MG, U373 | [102] | | |
| фибросаркома | клеточная линия LPB-1, линия мышей C57B1/6 | | | |

Окончание табл. 2

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------|------------|--|--|-------|
| Cq–Ru | катепсин В | рак молочной железы глиобластома | клеточная линия MCF-10A-NeoT клеточная линия U-87 MG | [57] |
| Оданакариб | катепсин К | рак молочной железы | клинические исследования | [58] |
| L-235 | катепсин К | рак молочной железы | ксенотрансплантат MDA-MB-231 в крысах nu/nu | [59] |
| CLIK-148 | катепсин L | меланома | клеточная линия A375 в мышцах | [61] |
| | | колоректальный рак глиобластома | клеточная линия 26 PMF-15 в мышцах клеточная линия U87 | |
| Z-FF-FMK | катепсин L | рак полости рта | клеточные линии 101A, 686Tu | [63] |
| iCL | катепсин L | нейробластома остеогенная саркома | клеточная линия SKN-SH в мышцах CD1 клеточная линия SaOS2 в мышцах CD1 | [64] |
| KGP94 | катепсин L | рак предстательной железы рак молочной железы | клеточная линия PC-3ML клеточная линия MDA-MB-231 | [65] |
| | | рак предстательной железы | ксенотрансплантат PC-3ML в мышцах NCR nu/nu | [66] |
| | | рак молочной железы рак предстательной железы | клеточная линия MDA-MB-231, ксено- трансплантат C3H в мышцах CDF1 клеточная линия DU-145 | [103] |
| | | | | |
| LHVS | катепсин S | глиобластома | клеточные линии U251MG, U87MG | [67] |
| bn, br, bw | катепсин S | рак легкого | клеточная линия CL1-5 | [68] |
| VBY-999 | катепсин S | рак молочной железы | ксенотрансплантат MDA-MB-231 в мышцах athymic/nude | [31] |

Ингибиторы на основе антител

| | | | | | |
|----------------------|------------|--|--|------|------|
| Fsn0503, Fsn0503h | катепсин S | астроцитомы | клеточная линия U251MG | [71] | |
| | | рак предстательной железы рак молочной железы колоректальный рак | клеточная линия PC3 клеточная линия MDA-MB-231 клеточная линия HCT116, в т.ч. ксенотрансплантат в мышцах Balb/c | | |
| | | колоректальный рак | клеточная линия LoVo | | [72] |
| | | | | | |
| 2A2 | катепсин В | рак молочной железы | клеточная линия MCF-10A-NeoT | [74] | |

кирования активности цистеиновых катепсинов, можно разделить на синтетические и природные, обратимые и необратимые. За счет наличия реакционноспособной электрофильной группы необратимые ингибиторы могут связываться с нуклеофильными группами не только катепсинов, приводя к неспецифическому связыванию. Поэтому при разработке ингибиторов цистеиновых катепсинов основное внимание направлено на создание соединений с повышенной селективностью.

Используемые ингибиторы катепсинов представляют собой в основном ингибиторы, взаимодействующие с активным центром фермента. Такие ингибиторы основаны на структурах эпоксисукцинила, винилсульфона или нитрила. Например, E-64 является необратимым ингибитором на основе эпоксисукцинила, обладающим ингибирующей активностью широкого спектра действия в отношении катепсинов и других цистеиновых протеиназ [46]. Сходный по структуре ингибитор JPM-OEt проявляет более специфичную активность в отношении катепсинов и, как было показано на животной модели, усиливает эффективность химиотерапии путем снижения ангиогенеза и инвазии опухолевых клеток по сравнению с контрольной группой [47]. Ингибитор цистеиновых катепсинов Z-Phe-Gly-NHO-Bz (САТI-1 – cathepsins inhibitor I) может вызывать апоптоз при плоскоклеточном раке шеи, аденокарциноме молочной железы, аденокарциноме предстательной железы, глиобластоме и раке шейки матки [48].

Специфические ингибиторы катепсина В, СА-074 и СА074Ме (производное метилового эфира СА-074), были созданы на основе структуры E-64 для улучшения проницаемости в клетки, причем было показано, что СА074Ме также хорошо ингибирует катепсин L [49]. Часто ингибиторы катепсина В представляют собой миметики переходного состояния и содержат электрофильную карбонильную или нитрильную группу. В качестве природных обратимых ингибиторов катепсина В выступают бифлавоны и их производные, проявляя селективность в отношении эндопептидазной активности фермента [50]. Также показано, что соединение DOFA ([2-[2-(2,4-диоксо-1,3-тиазолидин-3-ил)этиламино]-2-оксоэтил]2-(фуран-2-карбониламино)ацетат) в равной степени ингибирует экзо- и эндопептидазную активность катепсина В [51], а 6-замещенные 4-бензилтио-1,3,5-триазин-2(1H)-оны ингибируют его эндопептидазную активность [52]. Интересно, что хинолоновый антибиотик нитроксолин, используемый для лечения инфекций мочевыводящих путей, обратимо ингибирует катепсин В за счет нековалентно-

го связывания с гибкой окклюзионной петлей, которая перемещается в зависимости от изменений pH и определяет субстратную эндопептидазную активность или субстратную активность экзопептидазы [53]. Нитроксолин, как было показано *in vitro*, ингибирует рост раковых клеток и обладает антиангиогенными свойствами [54]. По некоторым данным, при использовании нитроксолина можно наблюдать значительное уменьшение объема опухоли молочной железы, а также ингибирование роста раковых клеток мочевого пузыря *in vivo* на ксенотрансплантате у мышей. Кроме того, использование этого соединения ингибирует образование эндотелиальной трубки в матригеле и уменьшает плотность микрососудов *in vivo* [55]. Значительное снижение деградации ЕСМ и эффективное ингибирование инвазии клеток MCF-10A-neoT были также отмечены при использовании производных нитроксолина, ингибирующих катепсин В [56]. Интересные возможности для ингибирования катепсина В предоставляют комплексы рутения с клиохинолом и хинолоном. В частности, комплекс клиохинол–рутений (Cq–Ru) показал себя как потенциальный противораковый агент за счет способности ингибировать как эндо-, так и экзопептидазную активность катепсина В. Показано, что применение Cq–Ru приводит к значительному снижению инвазии опухолевых клеток при концентрациях, не оказывающих цитотоксического действия [57].

Большинство ингибиторов катепсина К обладают реакционноспособными функциональными группами, такими как нитрил или альдегид, которые способны образовывать ковалентную связь с цистеином активного центра фермента. Оданакатиб, ковалентное производное на основе нитрила, является ингибитором катепсина К для лечения костных метастазов. Он был исследован в фазе II клинических испытаний у пациентов с раком молочной железы. Было доказано, что оданакатиб снижает количество маркера резорбции кости (N-телопептида) в моче. Однако значительный риск развития инсульта, связанного с приемом оданакатиба, вызвал прекращение его исследований [58]. Тем не менее проводится изучение новых ингибиторов катепсина К для лечения метастазов в кости. Так, структурно родственный оданакатибу обратимый ингибитор катепсина К, L-235, как было показано, замедляет рост опухоли и снижает инвазию рака молочной железы [59]. В настоящее время активно изучаются ингибиторы катепсина К, которые активируются под воздействием света. К такому типу ингибиторов относится Tanshinone IIА сульфат натрия (T06), который, как уже показано в исследованиях *in vitro* и

in vivo, проявляет активность в остеокластах человека и мыши, ингибируя резорбцию костной ткани [60].

Для катепсина L, как и для катепсина B, был разработан специфический ингибитор на основе структуры E-64 – CLIK-148. Показано, что применение этого ингибитора может подавлять метастазирование при раке толстой кишки, меланоме и глиобластоме [61, 62]. К снижению инвазивности плоскоклеточного рака полости рта приводит использование селективного ингибитора катепсина L Z-FF-FMK [63]. Обратимый ингибитор iCL демонстрирует сильное подавление устойчивости опухолевых клеток к лекарственным средствам *in vivo* и *in vitro*. Причем показано, что применение iCL, в т.ч. в комбинации с доксорубицином, снижает рост опухоли у мышей с ксенотрансплантатами нейробластомы [64]. Другой ингибитор катепсина L, KGP94, являясь производным тиосемикарбазона, способен угнетать вызванную гипоксией и ацидозом инвазивность клеток рака предстательной и молочной желез [65], а также ангиогенез и резорбцию костной ткани [66].

Для необратимого ингибитора катепсина S, LHVS, была показана способность снижать инвазию и вызывать апоптоз в клетках глиобластомы [67]. Ингибиторы катепсина S на основе α -кетоамидных соединений, такие как бп, бг и бв, продемонстрировали противоопухолевую эффективность на раковых клетках легкого [68]. Противоопухолевая активность селективного ингибитора катепсина S была обнаружена для нитрильного производного, которое инициировало апоптоз, значительно снижало пролиферацию на моделях рака, а также проявляло антиангиогенный эффект *in vitro* [69]. Другим мощным противораковым специфическим ингибитором катепсина S является VBY-999, его использование приводит к уменьшению метастазирования в мозг при применении на ранних стадиях в исследованиях *in vivo* [31].

Для катепсина X был обнаружен ингибитор на основе триазолбензодиоксина. Его действие приводит к снижению миграции опухолевых клеток и увеличению роста аксонов, причем оба процесса находятся под контролем карбокси-пептидазной активности катепсина X [70].

Ингибиторы на основе антител. В настоящее время ингибиторы на основе антител были разработаны для катепсина S и катепсина B, как наиболее активных и распространенных в различных видах опухолей цистеиновых протеиназ и, следовательно, являющихся перспективными мишенями в противоопухолевой терапии.

Согласно исследованиям *in vitro* на клеточных линиях, представляющих основные классы

агрессивных опухолей с высоким уровнем экспрессии катепсина S, моноклональное антитело мыши Fsn0503 связывает катепсин S при pH 4,9–7,5 и нарушает протеолиз желатина и коллагена. Так, снижение инвазивности наблюдалось на линии клеток астроцитомы U251MG, клетках рака предстательной железы PC3 и молочной железы MDA-MB-231. Наиболее существенные эффекты были получены на клеточной линии колоректальной карциномы HCT116, в которой наблюдалось снижение опухолевой инвазии на 64% [71]. Fsn0503 также ингибирует процессы ангиогенеза, приводя к уменьшению образования сосудов до 70% по сравнению с контролем [71]. Более того, эффективность применения Fsn0503 была подтверждена в исследованиях *in vivo* на ксенотрансплантатах HCT116 у мышей. Применение Fsn0503 приводит к значительному угнетению развития опухоли и снижению количества эндотелиального маркера CD34, что свидетельствует о нарушении инфильтрации эндотелиальных клеток и связанной с ней неоваскуляризацией опухоли [71]. В дальнейшем, после обнаружения того, что катепсин S локализован не только в лизосомах и ЕСМ, но также связан с клеточной мембраной, стала очевидной возможность применения катепсина S в роли мишени в антителозависимой клеточной цитотоксичности. Примечательно, что на исследованных клеточных линиях катепсин S локализуется совместно с актином в ограниченных областях клеточной поверхности [72]. При создании аналога антитела Fsn0503 для клинического применения была разработана его специальная форма Fsn0503h, в которой участок связывания антигена был несколько изменен, а в качестве Fc-фрагмента использовался IgG1, но при этом все гипервариабельные домены были сохранены. Результаты исследований на линии LoVo колоректального рака показали, что использование модифицированного антитела Fsn0503h, имеющего сходный с Fsn0503 профиль связывания, способно вызывать гибель > 20% клеток. Кроме того, было показано, что действие Fsn0503h связано с привлечением CD16⁺-клеток, обладающих выраженной цитотоксической активностью [72]. Таким образом, Fsn0503h является перспективным кандидатом в качестве противоопухолевого терапевтического средства.

Катепсин B, как было отмечено выше, проявляет ферментативную активность как эндо- и экзопептидаза. Было показано, что деградация катепсином B белков ЕСМ, необходимая для инвазии и метастазирования опухолевых клеток, осуществляется за счет эндопептидазной активности. Моноклональное антитело 2A2

подкласса IgG2a при связывании катепсина В значительно снижает инвазию опухолевых клеток [73]. Расположение эпитопа 2A2 около гибкой петли протеиназы указывает на то, что связывание 2A2 может изменить конформацию петли и таким образом стабилизировать конформацию экзопептидазы. Эти данные также подтверждают проявление катепсином В экзопептидазной активности по отношению к ортоаминобензойной кислоте и отсутствие эндопептидазной активности по отношению к казеину и коллагену IV в присутствии 2A2 [74]. Эффективность 2A2 подтверждена на клетках MCF-10A NeoT, для которых было показано, что при добавлении антитела значительно снижается деградация коллагена IV как вне, так и внутри клеток. Такой специфический механизм регуляции активности катепсина В может быть применен при разработке терапевтических средств для лечения заболеваний, ассоциированных с действием катепсина В [74].

Направленная доставка. В настоящее время активно изучается возможность использования протеолитической активности катепсинов для повышения специфичности различных химиотерапевтических средств. Разработка способов направленной доставки лекарств с участием катепсинов обусловлена присутствием в больших количествах активных ферментов в микроокружении опухолевых клеток. В то же время невысокий уровень экспрессии катепсинов в здоровых тканях позволяет снизить системную токсичность противоопухолевых препаратов направленного действия, активирующихся под действием протеолитических ферментов. В настоящее время можно выделить три стратегии направленной доставки с участием цистеиновых катепсинов: 1) катепсин-опосредованная активация пролекарств; 2) катепсин-опосредованная активация пролекарств, конъюгированных с антителом; 3) катепсин-опосредованная деградация наночастиц (табл. 3). Такая активация пролекарств осуществляется за счет протеолитически активных катепсинов, локализованных в опухоли, с последующим превращением в свободные лекарственные средства. За счет создания пролекарств можно избежать многих недостатков и побочных эффектов действующих веществ.

Катепсин-опосредованная активация пролекарств. Известно, что аминонуклеозидный антибиотик пуромицин способен ингибировать синтез белка, вызывая нарушение работы рибосом во время трансляции и приводя к цитотоксичности клеток. Однако в составе пролекарства Вос-КАс-Руго пуромицин связан с ацетилированной группой лизина, и в опухолевых

клетках оно последовательно активируется гистондеацетилазой, которая удаляет ацетильную группу, и катепсином L, который отщепляет лизин и высвобождает пуромицин. Активность данного пролекарства была подтверждена *in vivo* на опухолевых ксенотрансплантатах человека [75]. Гемцитабин, характеризующийся коротким периодом полувыведения и серьезными побочными эффектами, в составе синтетического пролекарства с ковалентно связанной аминогруппой и карбоксильной группой холестерил гемисукцината (CHSdFdC – cholesteryl hemisuccinate-gemcitabine) представляет собой амфифильные самособирающиеся в водных средах наночастицы, которые высвобождают гемцитабин только в кислых средах, характерных для лизосом, причем высвобождение гемцитабина значительно увеличивается с участием катепсина В. Кроме того, такие наночастицы лучше и быстрее проникают в клетку по сравнению с гемцитабином [76]. Для флоксуридина, также характеризующегося существенными побочными эффектами, были разработаны два успешных пролекарства путем присоединения фенилаланина и тирозина или глицина с образованием 5'-O-L-фенилаланил-L-тирозил-флоксуридина и 5'-O-L-фенилаланил-L-глицил-флоксуридина соответственно. Обе молекулы активируются катепсинами В и D, поэтому потенциально они могут успешно применяться в терапии опухолей [77]. Кроме того, недавно доклинические испытания прошли пролекарства для направленной доставки доксорубицина: конъюгаты лекарств с пептидами, в которых проникающий в клетку пептид ТАТ ковалентно связан с молекулами доксорубицина через линкер GFLG, и мПЭГилированный дендрон-GFLG-доксорубицин, который способен к самосборке в компактные наночастицы с отрицательно заряженной поверхностью. Последовательность GFLG, как было показано, является наиболее стабильным спейсером в плазме, который при этом эффективно гидролизует в присутствии катепсина В, а количество доксорубицина в конъюгате значительно влияет на его высвобождение и эффективность *in vitro* [78]. Также показано, что дендримерные наночастицы с доксирубицином проявляют повышенную противоопухолевую эффективность и пониженную токсичность по сравнению со свободным доксорубицином [79]. Примером биоразлагаемого конъюгата может служить конъюгат поли-γ-глутаминовой кислоты (PGA) и противоопухолевого средства паклитаксел (PPX – paclitaxel poliglumex; CT-2103) [80], который уже оценен в клинических испытаниях. Конъюгация паклитаксела через сложноэфирную связь с

Таблица 3. Примеры терапевтических препаратов, основанных на протеиназной активности катепсинов

| Название пролекарства | Активирующий фермент | Цитотоксический агент | Тип опухоли | Экспериментальная модель/ стадия исследования | Источник |
|---|----------------------|---------------------------------------|---|---|----------|
| Катепсин-опосредованная активация пролекарств | | | | | |
| Вос-КАс-Руго | катепсин L | пурамицин | колоректальный рак рак поджелудочной железы рак печени рак шейки матки | клеточные линии Сасо-2, GOGA-10, HCA-7, HT29, HCT116 клеточные линии MiaPaca-2, VXPC3 клеточная линия HepG2 клеточная линия HeLa | [75] |
| CHSdFdC | катепсин B | гемцитабин | рак поджелудочной железы | клеточная линия Vxpc-3 | [76] |
| 5'-O-L-фенилаланил-L-тирозил-флюксуридин, 5'-O-L-фенилаланил-L-глицилфлюксуридин | катепсин B | флюксуридин | рак поджелудочной железы | клеточная линия Саран-2 | [77] |
| мПЭГилированный дендрон-GFLG-доксорубицин | катепсин B | доксорубицин | рак молочной железы | клеточная линия 4T1, в т.ч. ксенотрансплантат в мышцах Balb/c | [79] |
| СТ-2103 | катепсин B | паклитаксел | рак легкого | клинические исследования | [80] |
| Катепсин-опосредованная активация пролекарств, конъюгированных с антителом | | | | | |
| ADC брентуксимаб ведотин | катепсин B | мометилауристатин E (ММАЕ, ведотин) | лимфома Ходжкина | клинические исследования | [93] |
| ADC ММАЕ-F16 | катепсин B | мометилауристатин E (ММАЕ, ведотин) | плоскоклеточный рак кожи рак молочной железы глиобластома | ксенотрансплантат A-431 в мышцах Balb/c ксенотрансплантат MDA-MB-231 в мышцах Balb/c ксенотрансплантат U-87MG в мышцах Balb/c | [82] |
| Катепсин-опосредованная деградация наночастиц | | | | | |
| Мезопористые наночастицы кремнезема | катепсин B | доксорубицин | рак шейки матки | клеточная линия HeLa | [83] |
| PGA-наночастицы/индоцианин зеленый | катепсин B | индоцианин зеленый (при ИК-облучении) | плоскоклеточный рак языка | клеточная линия SCC-9 | [85] |
| PLGA наночастицы/цистатин с антителом на цитокератин 8 | катепсин B | цистатин (ингибитор катепсинов) | рак молочной железы | клеточная линия MCF-7 | [86] |

боковыми цепями PGA обеспечивает большую загрузку лекарственного средства, причем РРХ высвобождается из конъюгата за счет расщепления лизосомальным катепсином В основной цепи полимера после поглощения клетками в процессе эндоцитоза.

Катепсин-опосредованная активация пролекарств, конъюгированных с антителом. Для увеличения специфичности противоопухолевых таргетных лекарственных средств также используется широко известный подход – связывание с моноклональными антителами, которые специфически распознают клеточные поверхностные антигены и доставляют лекарственное средство непосредственно к клетке-мишени. Опосредованная антителами доставка в опухолевые клетки может существенно повышать терапевтическую эффективность и уменьшать побочные эффекты химиотерапевтического средства. Конъюгаты антител с лекарственным средством (ADC – antibody–drug conjugate) часто нацелены на мембранные рецепторы, которые после связывания интернализуются и доставляют ADC в кислую, богатую катепсинами эндолизосомальную систему. При этом линкеры, связывающие цитотоксическое вещество и антитело, имеют решающее значение, поскольку они должны предотвращать высвобождение лекарственного средства в крови, но способствовать данному процессу после поглощения опухолевой клеткой. В разработках применительно к противоопухолевой терапии линкеры зачастую нацелены на лизосомальные катепсины. Например, последовательности Val-Cit (цитруллин), Val-Ala или Phe-Lys являются наиболее часто используемыми линкерами, расщепляемые катепсинами. За счет высокой стабильности в плазме и эффективного расщепления катепсином В линкер Val-Cit стал особенно популярен [81]. Так, в клинически утвержденном на рынке ADC Adcetris антитело брентуксимаб нацелено на CD30 – маркер лимфомы Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфомы [82], а лекарственное средство представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ – monomethyl auristatin E, или ведотин), связанный с антителом через дипептид Val-Cit. После того как ADC интернализуется опухолевыми клетками посредством эндоцитоза, катепсин В высвобождает ММАЕ – антимиотическое средство, которое ингибирует деление клеток, блокируя полимеризацию тубулина [82].

Большинство фармацевтических разработок в области ADC направлены на мишени, расположенные на мембране опухолевых клеток, что, с одной стороны, улучшает селективность, однако, с другой стороны, низкий уровень

экспрессии опухолевых антигенов может способствовать формированию иммунологической толерантности к данным антигенам. В связи с этим разработки в данной области распространились на компоненты модифицированного внеклеточного матрикса опухоли, такие как сплайс-изоформы фибронектина и тенасцина-С, являющиеся привлекательными мишенями для доставки из-за их высокой селективной экспрессии в месте опухоли, а также стабильности. Так, недавно было разработано ADC, в состав которого входит антитело F16 типа IgG, специфичное к сплайс-изоформе тенасцина-С, и присоединенный через линкер Val-Cit ММАЕ. Изоформа тенасцина-С, как было показано на трех моделях рака человека (U87, A431, MDA-MB-231) у мышей, селективно локализуется в субэндотелиальном ЕСМ опухоли. Несмотря на то, что в ЕСМ пептидные линкеры расщепляются преимущественно сериновыми протеиназами, цистеиновый катепсин В при pH 6,5 также способен расщеплять Val-Cit. В результате ММАЕ, высвобожденный в ЕСМ опухоли, может диффундировать и впоследствии интернализироваться в опухолевые клетки, эндотелиальные клетки и лейкоциты, где оказывает свое антимиотическое действие [83].

Катепсин-опосредованная деградация наночастиц. Полимерные наночастицы являются многообещающими системами для доставки противоопухолевых агентов, поскольку они накапливаются в опухолях благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания (EPR – enhanced permeability and retention) и попадают в опухолевые клетки посредством эндоцитоза. Кроме того, они могут предотвращать преждевременную деградацию лекарственного средства и осуществлять контролируемое высвобождение молекул в необходимом месте, повышая терапевтическую эффективность и уменьшая нежелательные побочные эффекты. Одним из примеров являются мезопористые наночастицы кремнезема для внутриклеточного контролируемого высвобождения сафранина О (S1-P) или доксорубицина (S2-P) в клетках, экспрессирующих катепсин В. Эти наночастицы содержат «молекулярные ворота», состоящие из распознаваемой катепсином В аминокислотной последовательности. После интернализации наночастиц специфические последовательности расщепляются катепсином В, что приводит к высвобождению цитотоксического агента [84]. В другом исследовании были разработаны и охарактеризованы наночастицы из PGA, содержащие индоцианин зеленый (ICG). Деградация наночастиц катепсином В приводит к поглощению ICG клетками. Обладая минимальной ток-

сичностью в темноте, ICG проявлял значительную цитотоксичность при воздействии излучения ближней инфракрасной области. Эти результаты показывают, что такой терапевтический подход может быть полезным при лечении поверхностных злокачественных новообразований, таких как опухоли головы и шеи [85].

К полимерным наночастицам также присоединяют специфические молекулы распознавания – лиганды (моноклональные антитела к ассоциированным опухолевым антигенам, рецепторы, ферменты, гликопротеины), тем самым увеличивая сродство к опухолевым клеткам [86]. Примером могут служить наночастицы из поли(молочной-со-гликолевой) кислоты, содержащие ингибитор катепсина цистатин внутри и антитела, распознающие эпитоп на внеклеточной части цитокератина 8, на поверхности. Полимерные наночастицы за счет связывания с цитокератином 8, сверхэкспрессирующимся инвазивными клетками опухоли молочной железы, интернализируются опухолевыми клетками и затем расщепляются в эндосомальной и лизосомальной системе, в т.ч. цистеиновыми катепсинами, что приводит к высвобождению ингибитора. Активность катепсина В почти полностью устраняется цистатином, что предотвращает деградацию интернализованного ЕСМ и снижает способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию, не влияя на протеолитические функции в здоровых клетках [86].

Цистеиновые катепсины в диагностике опухолей. Протеолитическая активность катепсина также находит применение в клинической молекулярной диагностике. Данный подход заключается в визуализации опухоли путем использования активируемых флуоресцентных зондов (табл. 4). Принцип их работы основан на том, что зонды флуоресцируют только после от-

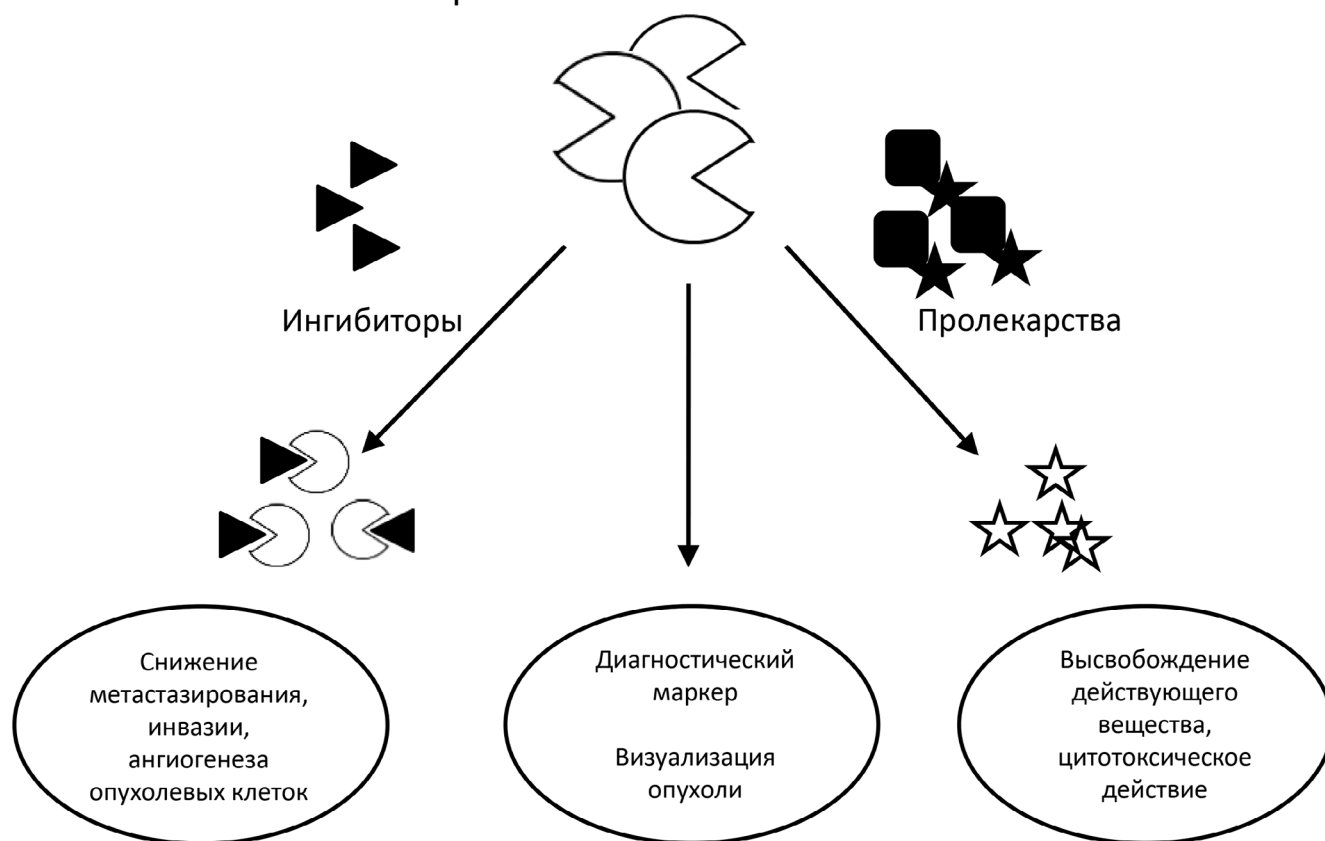
щепления гасителя целевым ферментом, избирательно локализующимся в пораженной ткани, в то время как в интактном препарате флуоресценция гасится ферстеровским переносом энергии (FRET). Применение зондов в хирургии опухолей приводит к детекции флуоресценции в пораженных тканях, способствуя наиболее полному удалению пораженной ткани [87]. В настоящее время на ранних этапах клинических исследований находятся два зонда широкого спектра: LUM015 и ^{68}Ga -BMV101. Зонд LUM015 представляет собой ПЭГилированный субстрат катепсина, флуоресцирующий в ближнем инфракрасном диапазоне. Зонд ^{68}Ga -BMV101, созданный на основе феноксиметилкетона для позитронно-эмиссионной и компьютерной томографии, обеспечивает неинвазивную визуализацию тканей с глубоким проникновением лучей [88]. Кроме того, средства, нацеленные на протеолиз катепсинами, могут также применяться в диагностике методом магнитно-резонансной томографии.

Цистеиновые катепсины часто проявляют перекрывающуюся субстратную специфичность, поэтому разработка зондов для визуализации конкретного фермента представляет собой трудную задачу. Тем не менее на основе данных скрининга различных пептидных последовательностей был разработан высокоселективный маркер MP-cL3 для катепсина L [89]. Еще один специфичный зонд 8h6 на основе сконструированного белка с анкириновым повтором DARPIn направлен на визуализацию катепсина В [90]. Недавно также был разработан флуоресцентный зонд CyA-P-CyB, который помимо визуализации обладает фототоксичностью. В этом случае до расщепления катепсином В флуоресценция CyA гасится CyB посредством FRET. В результате расщепления образуется CyA, который при

Таблица 4. Примеры зондов для визуализации опухоли, основанных на протеиназной активности катепсина

| Маркер | Целевой фермент | Тип опухоли | Стадия исследования/экспериментальная модель | Источник |
|------------|--|---------------------|---|----------|
| LUM015 | катепсин В, катепсин К, катепсин L, катепсин S | рак молочной железы | клинические исследования | [87] |
| MP-cL3 | катепсин L | рак молочной железы | клеточная линия MDA-MB-231 | [89] |
| DARPIn 8h6 | катепсин В | рак молочной железы | клеточная линия РумТ, клеточная линия 4Т1, ксенотрансплантаты у мышей | [90] |
| CyA-P-CyB | катепсин В | рак легкого | ксенотрансплантат у мышей | [91] |
| CPC@MOF | катепсин В | рак шейки матки | клеточная линия HeLa, ксенотрансплантат у мышей | [92] |

Цистеиновые катепсины



Возможности применения цистеиновых катепсинов в диагностике и терапии онкологических заболеваний

облучении при длине волны 650 нм флуоресцирует, что позволяет локализовать опухоль. В то же время высвободившийся CuV в результате химических реакций превращается в Cu-S-Ph-NH_2 , который при облучении при длине волны 808 нм оказывает фототоксический эффект [91]. Препарат со сходными свойствами CPC@MOF использует в качестве флуорофора Ce6 , который закреплен на металлоорганической структуре через линкер, расщепляемый катепсином В. При высвобождении Ce6 способен флуоресцировать, а применение лазерного излучения при длине волны 660 нм приводит к фотооксигенации [92].

Во многих опухолях катепсины выполняют важные для онкогенеза функции и обнаруживаются в больших количествах. Расщепление катепсинами многочисленных и разнообразных субстратов как в лизосомах, так и в межклеточном пространстве обеспечивает инвазивность и ангиогенез, что способствует успешному росту и метастазированию опухоли. Вследствие этого катепсины являются перспективными мишеня-

ми для создания новых эффективных высоко-специфичных противоопухолевых средств (рисунки). Для блокирования работы катепсинов был разработан ряд ингибиторов, многие из которых активно исследуются в доклинических и клинических испытаниях. При этом ингибирование катепсинов не только способствует снижению жизнеспособности опухоли, но также позволяет более тщательно изучить их роль в раковых, а также ассоциированных с опухолью клетках. Кроме того, ингибиторы на основе антител могут приводить к активации цитотоксичности клеток. Другой подход предлагает использование протеиназной активности катепсинов вместо ее ингибирования. Например, химиотерапевтические средства могут быть инактивированы при помощи различных модификаций, что приводит к уменьшению побочных эффектов. Однако в микроокружении опухоли эти модификации снимаются катепсинами, что обеспечивает направленную доставку препарата. Также для ограничения действия химиотерапевтических средств было предложено упаковывать их в наночастицы, которые накапливаются в

опухоли благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания, где деградируют под действием катепсинов. Применение протеиназной активности катепсинов для визуализации опухоли — еще один успешный подход, который можно применить для диагностики и при хирургических вмешательствах. Такие направления катепсин-опосредованной терапии рака отражают многообразие процессов онкогенеза, в которые вовлечены эти цистеиновые протеиназы. Дальнейшие исследования локализации и специфичности цистеиновых катепсинов должны способствовать прогрессу в развитии новых

подходов к диагностике рака и противоопухолевой терапии.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10410).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D624–D632, doi: 10.1093/nar/gkx1134.
- Spira, D., Stypmann, J., Tobin, D.J., Petermann, I., Mayer, C., Hagemann, S., Vasiljeva, O., Gunther, T., Schule, R., Peters, C., and Reinheckel, T. (2007) Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37045–37052, doi: 10.1074/jbc.M703447200.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death, *Oncogene*, **27**, 6434–6451, doi: 10.1038/onc.2008.310.
- Repnik, U., Cesen, M.H., and Turk, B. (2013) The endolysosomal system in cell death and survival, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a008755, doi: 10.1101/cshperspect.a008755.
- Salminen-Mankonen, H., Morko, J., and Vuorio, E. (2007) Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis, *Curr. Drug Targets*, **8**, 315–323, doi: 10.2174/138945007779940188.
- Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2008) Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation, *Cell*, **135**, 284–294, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.055.
- Sadegh-Nasseri, S., and Kim, A. (2015) MHC class II auto-antigen presentation is unconventional, *Front. Immunol.*, **6**, 372, doi: 10.3389/fimmu.2015.00372.
- Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., and Tolosa, E. (2009) Cathepsin W expressed exclusively in CD8⁺ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs, *Exp. Hematol.*, **37**, 266–275, doi: 10.1016/j.exphem.2008.10.011.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646–674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., and Sun, Y. (2015) New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities, *BMC Med.*, **13**, 45, doi: 10.1186/s12916-015-0278-7.
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., and Takeyama, H. (2015) Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth, *Cancers (Basel)*, **7**, 2443–2458, doi: 10.3390/cancers7040902.
- Maishi, N., and Hida, K. (2017) Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis, *Cancer Sci.*, **108**, 1921–1926, doi: 10.1111/cas.13336.
- Bruno, A., Focaccetti, C., Pagani, A., Imperatori, A.S., Spagnoletti, M., Rotolo, N., Cantelmo, A.R., Franzi, F., Capella, C., Ferlazzo, G., Mortara, L., Albini, A., and Noonan, D.M. (2013) The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer, *Neoplasia*, **15**, 133–142, doi: 10.1593/neo.121758.
- Mitchem, J.B., Brennan, D.J., Knolhoff, B.L., Belt, B.A., Zhu, Y., Sanford, D.E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnica-Worms, D., Hewitt, S., Udipi, G.M., Gallagher, W.M., Wegner, C., West, B.L., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, P., Linehan, D.C., and DeNardo, D.G. (2013) Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses, *Cancer Res.*, **73**, 1128–1141, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2731.
- Franklin, R.A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M.V., Bivona, M.R., Liu, K., Pamer, E.G., and Li, M.O. (2014) The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages, *Science*, **344**, 921–925, doi: 10.1126/science.1252510.
- Linde, N., Lederle, W., Depner, S., van Rooijen, N., Gutschalk, C.M., and Mueller, M.M. (2012) Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages, *J. Pathol.*, **227**, 17–28, doi: 10.1002/path.3989.
- Su, S., Liu, Q., Chen, J., Chen, J., Chen, F., He, C., Huang, D., Wu, W., Lin, L., Huang, W., Zhang, J., Cui, X., Zheng, F., Li, H., Yao, H., Su, F., and Song, E. (2014) A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis, *Cancer Cell*, **25**, 605–620, doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.021.
- Li, Y., Zheng, Y., Li, T., Wang, Q., Qian, J., Lu, Y., Zhang, M., Bi, E., Yang, M., Reu, F., Yi, Q., and Cai, Z. (2015) Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma, *Oncotarget*, **6**, 24218–24229, doi: 10.18632/oncotarget.4523.
- Olson, O.C., and Joyce, J.A. (2015) Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 712–729, doi: 10.1038/nrc4027.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010)

- IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion, *Genes Dev.*, **24**, 241–255, doi: 10.1101/gad.1874010.
21. Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sorensen, T., Rafn, B., Bottzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T., and Jaattela, M. (2008) Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2, *Cancer Res.*, **68**, 6623–6633, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0463.
 22. Bannoud, N., Carvelli, F.L., Troncoso, M., Sartor, T., Vargas-Roig, L.M., and Sosa, M. (2018) Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor expression and distribution are influenced by estradiol in MCF-7 breast cancer cells, *PLoS One*, **13**, 1–17, doi: 10.1371/journal.pone.0201844.
 23. Dean, R.A., and Overall, C.M. (2007) Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ™ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 611–623, doi: 10.1074/mcp.M600341-MCP200.
 24. Laurent-Matha, V., Huesgen, P.F., Masson, O., Derocq, D., Prebois, C., Gary-Bobo, M., Lecaillon, F., Rebiere, B., Meurice, G., Olear, C., Hollingsworth, R.E., Abrahamson, M., Lalmanach, G., Overall, C.M., and Liaudet-Coopman, E. (2012) Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment, *FASEB J.*, **26**, 5172–5181, doi: 10.1096/fj.12-205229.
 25. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis, *Genes Dev.*, **20**, 543–556, doi: 10.1101/gad.1407406.
 26. Guinec, N., Dalet-Fumeron, V., and Pagano, M. (1993) «In vitro» study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L, *Biol. Chem.*, **374**, 1135–1146, doi: 10.1515/bchm3.1993.374.7-12.1135.
 27. Giusti, I., D'Ascenzo, S., Millimaggi, D., Tarabozetti, G., Carta, G., Franceschini, N., Pavan, A., and Dolo, V. (2008) Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles, *Neoplasia*, **10**, 481–488, doi: 10.1593/neo.08178.
 28. Chang, S., Kanasaki, K., Gocheva, V., Blum, G., Harper, J., Moses, A., Shih, S., Nagy, J.A., Joyce, J., Bogyo, M., and Dvorak, H.F. (2009) VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin- cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation, *Cancer Res.*, **69**, 4537–4544, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4539.VEGF-A.
 29. Jevnikar, Z., Rojnik, M., Jamnik, P., Doljak, B., Fonovic, U.P., and Kos, J. (2013) Cathepsin H mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 2201–2209, doi: 10.1074/jbc.M112.436394.
 30. Quintanilla-Dieck, M.J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J., and Runger, T.M. (2008) Cathepsin K in melanoma invasion, *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 2281–2288, doi: 10.1038/jid.2008.63.
 31. Sevenich, L., Bowman, R.L., Mason, S.D., Quail, D.F., Elie, B.T., Brogi, E., Brastianos, P.K., Hahn, W.C., Holsinger, L.J., Massague, J., Leslie, C.S., and Joyce, J.A. (2014) Analysis of tumor- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain metastasis-promoting role for cathepsin S, *Nat. Cell Biol.*, **16**, 876–888, doi: 10.1038/ncb3011.Analysis.
 32. Pecar Fonovic, U., Jevnikar, Z., Rojnik, M., Doljak, B., Fonovic, M., Jamnik, P., and Kos, J. (2013) Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells, *PLoS One*, **8**, e53918, doi: 10.1371/journal.pone.0053918.
 33. Wang, J., Chen, L., Li, Y., and Guan, X.-Y. (2011) Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, **6**, e24967, doi: 10.1371/journal.pone.0024967.
 34. Akkari, L., Gocheva, V., Kester, J.C., Hunter, K.E., Quick, M.L., Sevenich, L., Wang, H.-W., Peters, C., Tang, L.H., Klimstra, D.S., Reinheckel, T., and Joyce, J.A. (2014) Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix, *Genes Dev.*, **28**, 2134–2150, doi: 10.1101/gad.249599.114.
 35. Small, D.M., Burden, R.E., Jaworski, J., Hegarty, S.M., Spence, S., Burrows, J.F., McFarlane, C., Kissenpfennig, A., McCarthy, H.O., Johnston, J.A., Walker, B., and Scott, C.J. (2013) Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization, *Int. J. Cancer*, **133**, 2102–2112, doi: 10.1002/ijc.28238.
 36. Abboud-Jarrou, G., Atzmon, R., Peretz, T., Palermo, C., Gadea, B.B., Joyce, J.A., and Vlodaysky, I. (2008) Cathepsin L is responsible for processing and activation of proheparanase through multiple cleavages of a linker segment, *J. Biol. Chem.*, **283**, 18167–18176, doi: 10.1074/jbc.M801327200.
 37. Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H., and Baici, A. (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, *FEBS Lett.*, **455**, 286–290, doi: S0014-5793(99)00897-2.
 38. Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., Kalluri, R., and Shi, G.P. (2006) Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6020–6029, doi: 10.1074/jbc.M509134200.
 39. Veillard, F., Saidi, A., Burden, R.E., Scott, C.J., Gillet, L., Lecaillon, F., and Lalmanach, G. (2011) Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin, *J. Biol. Chem.*, **286**, 37158–37167, doi: 10.1074/jbc.M111.284869.
 40. Ryschich, E., Lizdenis, P., Itrich, C., Benner, A., Stahl, S., Hamann, A., Schmidt, J., Knolle, P., Arnold, B., Hammerling, G.J., and Ganss, R. (2006) Molecular fingerprinting and autocrine growth regulation of endothelial cells in a murine model of hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.*, **66**, 198–211, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1636.
 41. Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., Kester, J.C., Garfall, A.L., Simpson, K., Bell-McGuinn, K.M., Zabor, E.C., Brogi, E., and Joyce, J.A. (2011) Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer, *Genes Dev.*, **25**, 2465–2479, doi: 10.1101/gad.180331.111.
 42. Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végan, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., Kanellopoulos, J., Martin, F., Rebe, C., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2013) Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth, *Nat. Med.*, **19**, 57–64, doi: 10.1038/nm.2999.
 43. Mori, T., Miyamoto, T., Yoshida, H., Asakawa, M., Kawasumi, M., Kobayashi, T., Morioka, H., Chiba, K., Toyama, Y., and Yoshimura, A. (2011) IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis, *Int. Immunol.*, **23**, 701–712, doi: 10.1093/intimm/dxr077.
 44. Castino, R., Pace, D., Demoz, M., Gargiulo, M., Ariatta, C., Raiteri, E., and Isidoro, C. (2002) Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death

- in human neuroblastomas, *Int. J. Cancer*, **97**, 775–779, doi: 10.1002/ijc.10139.
45. Storm van's Gravesande, K., Layne, M.D., Ye, Q., Le, L., Baron, R.M., Perrella, M.A., Santambrogio, L., Silverman, E.S., and Riese, R.J. (2002) IFN regulatory factor-1 regulates IFN- γ -dependent cathepsin S expression, *J. Immunol.*, **168**, 4488–4494, doi: 10.4049/jimmunol.168.9.4488.
 46. Matsumoto, K., Mizoue, K., Kitamura, K., Tse, W.C., Huber, C.P., and Ishida, T. (1999) Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives, *Biopolymers*, **51**, 99–107, doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1999)51:1<99::AID-BIP11>3.0.CO;2-R.
 47. Bell-McGuinn, K.M., Garfall, A.L., Bogyo, M., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2007) Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer, *Cancer Res.*, **67**, 7378–7385, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0602.
 48. Zhu, D.M., and Uckun, F.M. (2000) Z-Phe-Gly-NHO-Bz, an inhibitor of cysteine cathepsins, induces apoptosis in human cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2064–2069.
 49. Mihalik, R., Imre, G., Petak, I., Szende, B., and Kopper, L. (2004) Cathepsin B-independent abrogation of cell death by CA-074-OME upstream of lysosomal breakdown, *Cell Death Differ.*, **11**, 1357–1360, doi: 10.1038/sj.cdd.4401493.
 50. Zeng, G.-Z., Pan, X.-L., Tan, N.-H., Xiong, J., and Zhang, Y.-M. (2006) Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K, *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 1247–1252, doi: 10.1016/j.ejmech.2006.06.002.
 51. Schenker, P., Alfarano, P., Kolb, P., Caflisch, A., and Baici, A. (2008) A double-headed cathepsin B inhibitor devoid of warhead, *Protein Sci.*, **17**, 2145–2155, doi: 10.1110/ps.037341.108.
 52. Sobic, I., Mirkovic, B., Turk, S., Stefane, B., Kos, J., and Gobec, S. (2011) Discovery and kinetic evaluation of 6-substituted 4-benzylthio-1,3,5-triazin-2(1H)-ones as inhibitors of cathepsin B, *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 4648–4656, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.08.005.
 53. Mirkovic, B., Renko, M., Turk, S., Sobic, I., Jevnikar, Z., Obermajer, N., Turk, D., Gobec, S., and Kos, J. (2011) Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds, *ChemMedChem*, **6**, 1351–1356, doi: 10.1002/cmde.201100098.
 54. Jiang, H., Taggart, J.E., Zhang, X., Benbrook, D.M., Lind, S.E., and Ding, W.-Q. (2011) Nitroxoline (8-hydroxy-5-nitroquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline), *Cancer Lett.*, **312**, 11–17, doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.032.
 55. Shim, J.S., Matsui, Y., Bhat, S., Nacev, B.A., Xu, J., Bhang, H.C., Dhara, S., Han, K.C., Chong, C.R., Pomper, M.G., So, A., and Liu, J.O. (2010) Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **102**, 1855–1873, doi: 10.1093/jnci/djq457.
 56. Sobic, I., Mirkovic, B., Arenz, K., Stefane, B., Kos, J., and Gobec, S. (2013) Development of new cathepsin B inhibitors: combining bioisosteric replacements and structure-based design to explore the structure–activity relationships of nitroxoline derivatives, *J. Med. Chem.*, **56**, 521–533, doi: 10.1021/jm301544x.
 57. Mitrovic, A., Kljun, J., Sobic, I., Gobec, S., Turel, I., and Kos, J. (2016) Clioquinol–ruthenium complex impairs tumour cell invasion by inhibiting cathepsin B activity, *Dalt. Trans.*, **45**, 16913–16921, doi: 10.1039/C6DT02369J.
 58. Jensen, A.B., Wynne, C., Ramirez, G., He, W., Song, Y., Berd, Y., Wang, H., Mehta, A., and Lombardi, A. (2010) The cathepsin K inhibitor odanacatib suppresses bone resorption in women with breast cancer and established bone metastases: results of a 4-week, double-blind, randomized, controlled trial, *Clin. Breast Cancer*, **10**, 452–458, doi: 10.3816/CBC.2010.n.059.
 59. Duong, L.T., Wesolowski, G.A., Leung, P., Oballa, R., and Pickarski, M. (2014) Efficacy of a cathepsin K inhibitor in a preclinical model for prevention and treatment of breast cancer bone metastasis, *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 2898–2909, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0253.
 60. Panwar, P., Xue, L., Soe, K., Srivastava, K., Law, S., Delaisse, J.-M., and Bromme, D. (2017) An ectosteric inhibitor of cathepsin K inhibits bone resorption in ovariectomized mice, *J. Bone Miner. Res.*, **32**, 2415–2430, doi: 10.1002/jbmr.3227.
 61. Katunuma, N., Tsuge, H., Nukatsuka, M., Asao, T., and Fukushima, M. (2002) Structure-based design of specific cathepsin inhibitors and their application to protection of bone metastases of cancer cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 305–311, doi: 10.1006/abbi.2001.2709.
 62. Zajc, I., Hreljac, I., and Lah, T. (2006) Cathepsin L affects apoptosis of glioblastoma cells: a potential implication in the design of cancer therapeutics, *Anticancer Res.*, **26**, 3357–3364.
 63. Nagaraj, N.S., and Zacharias, W. (2007) Cigarette smoke condensate increases cathepsin-mediated invasiveness of oral carcinoma cells, *Toxicol. Lett.*, **170**, 134–145, doi: 10.1016/j.toxlet.2007.02.014.
 64. Zheng, X., Chu, F., Chou, P.M., Gallati, C., Dier, U., Mirkin, B.L., Mousa, S.A., and Rebbaa, A. (2009) Cathepsin L inhibition suppresses drug resistance *in vitro* and *in vivo*: a putative mechanism, *Am. J. Physiol. Physiol.*, **296**, C65–C74, doi: 10.1152/ajpcell.00082.2008.
 65. Sudhan, D.R., and Siemann, D.W. (2013) Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells, *Clin. Exp. Metastasis*, **30**, 891–902, doi: 10.1007/s10585-013-9590-9.
 66. Sudhan, D.R., Pampo, C., Rice, L., and Siemann, D.W. (2016) Cathepsin L inactivation leads to multimodal inhibition of prostate cancer cell dissemination in a preclinical bone metastasis model, *Int. J. Cancer*, **138**, 2665–2677, doi: 10.1002/ijc.29992.
 67. Zhang, L., Wang, H., Xu, J., Zhu, J., and Ding, K. (2014) Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways, *Toxicol. Lett.*, **228**, 248–259, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.05.015.
 68. Chen, J.-C., Uang, B.-J., Lyu, P.-C., Chang, J.-Y., Liu, K.-J., Kuo, C.-C., Hsieh, H.-P., Wang, H.-C., Cheng, C.-S., Chang, Y.-H., Chang, M.D.-T., Chang, W.-S.W., and Lin, C.-C. (2010) Design and synthesis of α -ketoamides as cathepsin S inhibitors with potential applications against tumor invasion and angiogenesis, *J. Med. Chem.*, **53**, 4545–4549, doi: 10.1021/jm100089e.
 69. Wilkinson, R.D.A., Young, A., Burden, R.E., Williams, R., and Scott, C.J. (2016) A bioavailable cathepsin S nitrile inhibitor abrogates tumor development, *Mol. Cancer*, **15**, 29, doi: 10.1186/s12943-016-0513-7.
 70. Fonovic, U.P., Mitrovic, A., Knez, D., Jakos, T., Pisljar, A., Brus, B., Doljak, B., Stojan, J., Zakelj, S., Trontelj, J., Gobec, S., and Kos, J. (2017) Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors, *Sci. Rep.*, **7**, 11459, doi: 10.1038/s41598-017-11935-1.
 71. 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., and Scott, C.J. (2009) Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colo-

- rectal tumor invasion and angiogenesis, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 6042–6051, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1262.
72. Kwok, H.F., Buick, R.J., Kuehn, D., Gormley, J.A., Doherty, D., Jaquin, T.J., McClurg, A., Ward, C., Byrne, T., Jaworski, J., Leung, K.L., Snoddy, P., McAnally, C., Burden, R.E., Gray, B., Lowry, J., Sermadiras, I., Gruszka, N., Courtenay-Luck, N., Kissenpennig, A., Scott, C.J., Johnston, J.A., and Olwill, S.A. (2011) Antibody targeting of cathepsin S induces antibody-dependent cellular cytotoxicity, *Mol. Cancer*, **10**, 147, doi: 10.1186/1476-4598-10-147.
 73. Premzl, A., Zavalnik-Bergant, V., Turk, V., and Kos, J. (2003) Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neo T cells through reconstituted extracellular matrix *in vitro*, *Exp. Cell Res.*, **283**, 206–214, doi: 10.1016/S0014-4827(02)00055-1.
 74. Mirkovic, B., Premzl, A., Hodnik, V., Doljak, B., Jevnikar, Z., Anderluh, G., and Kos, J. (2009) Regulation of cathepsin B activity by 2A2 monoclonal antibody, *FEBS J.*, **276**, 4739–4751, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07171.x.
 75. Ueki, N., Lee, S., Sampson, N.S., and Hayman, M.J. (2013) Selective cancer targeting with prodrugs activated by histone deacetylases and a tumour-associated protease, *Nat. Commun.*, **4**, 2735, doi: 10.1038/ncomms3735.
 76. Xu, Y., Geng, J., An, P., Xu, Y., Huang, J., Lu, W., Liu, S., and Yu, J. (2015) Cathepsin B-sensitive cholesteryl hemisuccinate-gemcitabine prodrug nanoparticles: enhanced cellular uptake and intracellular drug controlled release, *RSC Adv.*, **5**, 6985–6992, doi: 10.1039/C4RA13870H.
 77. Tsume, Y., and Amidon, G.L. (2012) The feasibility of enzyme targeted activation for amino acid/dipeptide monoester prodrugs of floxuridine; cathepsin D as a potential targeted enzyme, *Molecules*, **17**, 3672–3689, doi: 10.3390/molecules17043672.
 78. Chen, Z., Zhang, P., Cheetham, A.G., Moon, J.H., Moxley, J.W., Lin, Y., and Cui, H. (2014) Controlled release of free doxorubicin from peptide–drug conjugates by drug loading, *J. Control. Release*, **191**, 123–130, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.051.
 79. Li, N., Li, N., Yi, Q., Luo, K., Guo, C., Pan, D., and Gu, Z. (2014) Amphiphilic peptide dendritic copolymer-doxorubicin nanoscale conjugate self-assembled to enzyme-responsive anti-cancer agent, *Biomaterials*, **35**, 9529–9545, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.059.
 80. Chipman, S.D., Oldham, F.B., Pezzoni, G., and Singer, J.W. (2006) Biological and clinical characterization of paclitaxel polyglumex (PPX, CT-2103), a macromolecular polymer–drug conjugate, *Int. J. Nanomedicine*, **1**, 375–383, doi: 10.2147/nano.2006.1.4.375.
 81. Kern, J.C., Dooney, D., Zhang, R., Liang, L., Brandish, P.E., Cheng, M., Feng, G., Beck, A., Bresson, D., Firdos, J., Gately, D., Knudsen, N., Manibusan, A., Sun, Y., and Garbaccio, R.M. (2016) Novel phosphate modified cathepsin B linkers: improving aqueous solubility and enhancing payload scope of ADCs, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 2081–2088, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00337.
 82. Scott, L.J. (2017) Brentuximab vedotin: a review in CD30-positive Hodgkin lymphoma, *Drugs*, **77**, 435–445, doi: 10.1007/s40265-017-0705-5.
 83. Gebleux, R., Stringhini, M., Casanova, R., Soltermann, A., and Neri, D. (2017) Non-internalizing antibody–drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix, *Int. J. Cancer*, **140**, 1670–1679, doi: 10.1002/ijc.30569.
 84. de la Torre, C., Mondragon, L., Coll, C., Sancenon, F., Marcos, M.D., Martinez-Manez, R., Amoros, P., Perez-Paya, E., and Orzaez, M. (2014) Cathepsin-B induced controlled release from peptide-capped mesoporous silica nanoparticles, *Chemistry*, **20**, 15309–15314, doi: 10.1002/chem.201404382.
 85. Tarassoli, S.P., de Pinillos Bayona, A.M., Pye, H., Mosse, C.A., Callan, J.F., MacRobert, A., McHale, A.P., and Nomikou, N. (2017) Cathepsin B-degradable, NIR-responsive nanoparticulate platform for target-specific cancer therapy, *Nanotechnology*, **28**, 055101, doi: 10.1088/1361-6528/28/5/055101.
 86. Kos, J., Obermajer, N., Doljak, B., Kocbek, P., and Kristl, J. (2009) Inactivation of harmful tumour-associated proteolysis by nanoparticulate system, *Int. J. Pharm.*, **381**, 106–112, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.037.
 87. Whitley, M.J., Cardona, D.M., Lazarides, A.L., Spasojevic, I., Ferrer, J.M., Cahill, J., Lee, C.-L., Snuderl, M., Blazer, D.G., Hwang, E.S., Greenup, R.A., Mosca, P.J., Mito, J.K., Cuneo, K.C., Larrier, N.A., O'Reilly, E.K., Riedel, R.F., Eward, W.C., Strasfeld, D.B., Fukumura, D., Jain, R.K., Lee, W.D., Griffith, L.G., Bawendi, M.G., Kirsch, D.G., and Brigman, B.E. (2016) A mouse-human phase I co-clinical trial of a protease-activated fluorescent probe for imaging cancer, *Sci. Transl. Med.*, **8**, 320ra4, doi: 10.1126/scitranslmed.aad0293.
 88. Withana, N.P., Ma, X., McGuire, H.M., Verdoes, M., van der Linden, W.A., Ofori, L.O., Zhang, R., Li, H., Sanman, L.E., Wei, K., Yao, S., Wu, P., Li, F., Huang, H., Xu, Z., Wolters, P.J., Rosen, G.D., Collard, H.R., Zhu, Z., Cheng, Z., and Bogyo, M. (2016) Non-invasive imaging of idiopathic pulmonary fibrosis using cathepsin protease probes, *Sci. Rep.*, **6**, 19755, doi: 10.1038/srep19755.
 89. Poreba, M., Rut, W., Vizovisek, M., Groborz, K., Kasperkiewicz, P., Finlay, D., Vuori, K., Turk, D., Turk, B., Salvesen, G., and Drag, M. (2018) Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes, *Chem. Sci.*, **9**, 2113–2129, doi: 10.1039/c7sc04303a.
 90. Kramer, L., Renko, M., Završnik, J., Turk, D., Seeger, M., Vasiljeva, O., Grutter, M., Turk, V., and Turk, B. (2017) Non-invasive *in vivo* imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPIn, *Theranostics*, **7**, 2806–2821, doi: 10.7150/thno.19081.
 91. Chen, X., Lee, D., Yu, S., Kim, G., Lee, S., Cho, Y., Jeong, H., Nam, K.T., and Yoon, J. (2017) *In vivo* near-infrared imaging and phototherapy of tumors using a cathepsin B-activated fluorescent probe, *Biomaterials*, **122**, 130–140, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.020.
 92. Liu, J., Zhang, L., Lei, J., Shen, H., and Ju, H. (2016) Multifunctional metal–organic framework nanoprobe for cathepsin B-activated cancer cell imaging and chemo-photodynamic therapy multifunctional cathepsin metal–organic framework cell nanoprobe imaging for and B-activated cancer chemo-photodynamic therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 2150–2158, doi: 10.1021/acsami.6b14446.
 93. Yin, P., Jia, J., Li, J., Song, Y., Zhang, Y., and Chen, F. (2016) ABT-737, a Bcl-2 selective inhibitor, and chloroquine synergistically kill renal cancer cells, *Oncol. Res.*, **24**, 65–72, doi: 10.3727/096504016X14587366983838.
 94. Leto, G., Pizzolanti, G., Tumminello, F.M., and Gebbia, N. (1994) Effects of E-64 (cysteine-proteinase inhibitor) and pepstatin (aspartyl-proteinase inhibitor) on metastasis formation in mice with mammary and ovarian tumors, *In Vivo*, **8**, 231–236.
 95. Navab, R., Mort, J., and Brodt, P. (1997) Inhibition of carcinoma cell invasion and liver metastases formation by the cysteine proteinase inhibitor E-64, *Clin. Exp. Metastasis*, **15**, 121–129, doi: 10.1023/A:1018496625936.
 96. Wilder, C.L., Walton, C., Watson, V., Stewart, F.A.A., Johnson, J., Peyton, S.R., Payne, C.K., Odero-Marah, V., and Platt, M.O. (2016) Differential cathepsin responses to inhibitor-induced feedback: E-64 and cystatin C elevate

- active cathepsin S and suppress active cathepsin L in breast cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **79**, 199–208, doi: 10.1016/j.biocel.2016.08.030.
97. Schurigt, U., Sevenich, L., Vannier, C., Gajda, M., Schwinde, A., Werner, F., Stahl, A., von Elverfeldt, D., Becker, A.-K., Bogyo, M., Peters, C., and Reinheckel, T. (2008) Trial of the cysteine cathepsin inhibitor JPM-OEt on early and advanced mammary cancer stages in the MMTV-PyMT-transgenic mouse model, *Biol. Chem.*, **389**, 1067–1074, doi: 10.1515/BC.2008.115.
98. Zhu, D.-M., and Uckun, F.M. (2000) Cathepsin inhibition induces apoptotic death in human leukemia and lymphoma cells, *Leuk. Lymphoma*, **39**, 343–354, doi: 10.3109/10428190009065834.
99. Withana, N.P., Blum, G., Sameni, M., Slaney, C., Anbalagan, A., Olive, M.B., Bidwell, B.N., Edgington, L., Wang, L., Moin, K., Sloane, B.F., Anderson, R.L., Bogyo, M.S., and Parker, B.S. (2012) Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer, *Cancer Res.*, **72**, 1199–1209, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2759.
100. Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bournoux, P., Lalmanach, G., and Le Guennec, J.-Y. (2009) Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8680–8691, doi: 10.1074/jbc.M806891200.
101. Klose, A., Zigrino, P., Denhofer, R., Mauch, C., and Hunzelmann, N. (2006) Identification and discrimination of extracellularly active cathepsins B and L in high-invasive melanoma cells, *Anal. Biochem.*, **353**, 57–62, doi: 10.1016/j.ab.2006.01.037.
102. Mitrovic, A., Susic, I., Kos, S., Tratar, U.L., Breznic, B., Kranjc, S., Mirkovic, B., Gobec, S., Lah, T., Sersa, G., and Kos, J. (2017) Addition of 2-(ethylamino)acetonitrile group to nitroxoline results in significantly improved anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*, *Oncotarget*, **8**, 59136–59147, doi: 10.18632/oncotarget.19296.
103. Chavarria, G.E., Horsman, M.R., Arispe, W.M., Kumar, G.D.K., Chen, S.-E., Strecker, T.E., Parker, E.N., Chaplin, D.J., Pinney, K.G., and Trawick, M.L. (2012) Initial evaluation of the antitumor activity of KGP94, a functionalized benzophenone thiosemicarbazone inhibitor of cathepsin L, *Eur. J. Med. Chem.*, **58**, 568–572, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.039.

CYSTEINE CATHEPSINS: PROSPECTS FOR THEIR USE IN DIAGNOSTICS AND THERAPY OF MALIGNANT TUMORS

A. I. Petushkova¹, L. V. Savvateeva¹, D. O. Korolev², and A. A. Zamyatnin, Jr.^{1,3*}

¹ Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia; E-mail: zamyat@belozersky.msu.ru

² Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Urology and Human Reproductive Health, 119991 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

Received March 28, 2019

Revised April 18, 2019

Accepted April 19, 2019

Cysteine cathepsins represent proteolytic enzymes executing protein degradation in lysosomes and endosomes. Cysteine cathepsins are also detected in tumor microenvironment during carcinogenesis. These enzymes are implicated in proliferation, invasion and metastasis through the degradation of extracellular matrix and of intercellular interactions, thus promoting angiogenesis. Therefore, the cathepsins have a diagnostic value and represent promising targets for antitumor drugs inhibiting these enzymes. Moreover, cysteine cathepsins can be used as activators in targeted therapy assays. This review summarizes the recent data on the role of cysteine cathepsins in carcinogenesis and the recent trends in cancer therapy and diagnostics utilizing cysteine cathepsins as markers, targets or activators.

Keywords: cysteine cathepsins, carcinogenesis, antitumor therapy, targeted drug delivery, proteolysis, diagnostics