

Інгібітори лізосомних цистеїнових протеїназ

В. І. Чорна, О. Л. Лянна¹

Дніпропетровський державний аграрний університет
Вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ, Україна, 49600

¹Дніпропетровська державна медична академія
Вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, Україна, 49044

olga_313@mail.ru

Огляд присвячено інгібіторам цистеїнових протеїназ, відомих своїм важливим значенням для багатьох біохімічних процесів, які відбуваються в живому організмі. Вони також беруть участь у виникненні та розвитку значної кількості захворювань, спричинених, серед іншого, аномальним білковим кругообігом. Одним із головних регуляторів активності зазначених протеїназ є їхні специфічні інгібітори – цистатіни. Мета даного огляду полягає у висвітленні сучасних уявлень щодо ендогенних інгібіторів лізосомних цистеїнових протеїназ та їхніх синтетичних аналогів.

Ключові слова: цистатіни, стефіни, кініногени, цистеїнові катепсини, синтетичні інгібітори.

Вступ. Тривалий час цистеїнові катепсини вважали відповідальними лише за внутрішньоклітинну деградацію білків у лізосомах, але останніми роками уявлення про роль цих ферментів в організмі суттєво змінилися [1, 2]. За даними авторів [3], у геномі людини нараховується приблизно 500–600 протеїназ. Згідно з дослідженням [4], близько 60 протеїназ є лізосомними, вони включають до свого складу групу з 11 папаїноподібних лізосомних цистеїнових пептидаз, які мають назву «катепсини» (табл. 1). Відомо, що протеїнази поділяють на п'ять типів відповідно до природи їхнього каталітичного центра: серинові, цистеїнові, аспартильні, треонінові та металопротеїнази [5]. Цистеїнові протеїнази для розщеплення пептидного зв'язку в активному центрі як нуклеофіл використовують амінокислотний залишок цистеїну [5]. Вивчення лізосомних цистеїнових катепсинів набуло нової сили, коли з'ясувалося, що ці ферменти виконують не лише функції «прибиральників», а й певні метаболічні та/або регуляторні функції [1, 2, 6].

Значною кількістю досліджень встановлено, що ці ферменти беруть участь в обмеженому протеолізі [7], кістковій реконструкції [8], антигенній презентації [9], репродуктивній функції [10] та апоптозі [11], тобто стають перспективними мішенями для розробки нових терапевтичних засобів.

Відомо, що цистеїнові протеїнази представляють собою потенційно небезпечні ферменти, активність яких потрібно ретельно контролювати та стримувати в межах відповідного компартмента. Звільнення протеолітичних ферментів з їхніх природних компартментів може призвести до небажаної деградації білків і розвитку патологічних станів [2, 6]. Порушення механізмів біологічного контролю протеолітичної активності спричиняє розвиток багатьох захворювань, до яких відносять онкологічні [12], ревматоїдний артрит [13] та остеоартрит [14], хворобу Альцгеймера [15], множинний склероз [16] та ін. [17]. Отже, регуляція протеолітичної активності та баланс між пептидазами і їхніми інгібіторами є життєво важливим фактором для підтримання здоров'я і забезпечення адекватної та доцільної відповіді організму на захворювання.

Таблиця 1
Цистеїнові катепсини людини

Катепсин	Ендо-пептидаза	Екзопептидаза		Хромосомна локалізація
		Карбокси-пептидаза	Аміно-пептидаза	
B	+	+	-	8q22-23
H	+	-	+	15q24-25
L	+	-	-	9q21
C	-	-	Дипептидаза	11q14
K	+	-	-	1q21
F	+	-	-	11q13
X	-	+	-	20q13
W	Невідома	Невідома	Невідома	11q13
S	+	-	-	1q21
V	+	-	-	9q21
Q	Невідома	Невідома	Невідома	4q31-32

Біологічні тканини і рідини містять велику кількість білкових інгібіторів пептидаз. Відомо, що приблизно 10 % білків лише в плазмі крові людини представлені інгібіторами, які мають назву серпіни, та інактивують серинові, цистеїнові пептидази, а також металопротеїнази [18]. Інформації про існування специфічних інгібіторів аспартильних пептидаз немає. Але є припущення, що цю функцію виконують α_2 -макроглобуліни [2, 18].

Цистатінова суперродина. Катепсини в активному стані набувають величезної руйнівної сили. Їхня загальна концентрація у лізосомах може перевищувати 1 мМ. Вважають, що за таких умов невідповідна дія пептидаз контролюється вже не несприятливими значеннями рН [19], а цистатінами – ендогенними білковими інгібіторами лізосомних цистеїнових протеїназ [1, 2, 18] (табл. 2). Головною функцією цистатінів є захист організму від ендогенних пептидаз, звільнених з лізосом, та від мікроорганізмів і паразитів, які використовують цистеїнові пептидази для свого проникнення до організму.

У тканинах і сироватці крові ссавців знайдено інгібітори цистеїнових протеїназ, значення молекулярних мас яких дуже відрізняються (від 11 до 175 кДа) [20].

На сьогодні виділено і досліджено значну кількість існуючих природних білкових інгібіторів цистеїнових протеїназ [1, 20, 21]. Встановлено, що вони діють як у внутрішньоклітинному, так і в екстрацелюлярному середовищі, де формують комплекси з ферментами-мішенями [20, 21].

На основі амінокислотної гомології цистатіни поділяють на стефіни, цистатіни та кініногени. Стефіни є внутрішньоклітинними інгібіторами, а цистатіни й кініногени – екстрацелюлярними білками [22].

Стефіни. До цієї родини належать стефіни А, В людини [23] та їхні аналоги з тканин щура [24], бика [25], свині [26] і деяких рослин [27]. Первинна послідовність цих білків налічує близько 100 амінокислотних залишків (а. з.) ($M_r \sim 11$ кДа). До амінокислотного складу стефіну В входять залишки цистеїну; за їхньою допомогою утворюється внутрішньомолекулярний дисульфідний зв'язок ($-Cys^3-Cys^3-$), що призводить до формування неактивного димеру, який за відновлювальних умов легко знову перетворюється на активні мономери [28].

Згідно з імуногістохімічними дослідженнями, локалізацію стефіну А (pI 4,5–5,0) визначено в епітеліальній тканині та нейтрофільних гранулоцитах [20], тоді як стефін В (pI 6,0–6,6) виявлено майже в усіх клітинах і тканинах [29]. У невеликій концентрації стефіни А та В ідентифіковано в усіх біологічних рідинах людини [29]. Відомо, що з тимусу бика виділено третій член цієї родини – стефін С [30], але питання про існування гомолога цього білка в тканинах або рідинах людини досі залишається відкритим.

Цистатіни. Молекулярна маса цистатінів становить 12–13 кДа, їхня амінокислотна послідовність нараховує 110–120 а. з. Вони не містять вуглеводних компонентів (за винятком цистатіну С щура [31]), але включають два дисульфідних зв'язки з С-кінця. Відомо, що ці білки синтезуються як пробілки, до складу яких входить сигнальний пептид (20 а. з.). Зараз до цієї родини відносять цистатіни С, D, S, SN і SA, E, F.

Засновником родини цистатінів є курячий цистатін [33].

Цистатін С людини (пост- γ -глобулін, пост- γ -протеїн) став першим цистатіном, для якого роз-

Таблиця 2
Властивості цистеїнових катепсинів людини та їхніх інгібіторів

Родина	Катепсин або інгібітор	Деталі
<i>Цистеїнові катепсини</i>		
Папаїнова підродина пептидаз С1А	Катепсин Н	Переважає амінопептидаза з обмеженою ендопептидазною активністю
	Катепсин Х	Карбоксимонопептидаза
Ендопептидази з екзопептидазними властивостями	Катепсин В	Карбоксидипептидаза за кислих значень рН та ендопептидаза – за нейтральних
	Катепсин С	Олігомерна амінодипептидаза, також відома як дипептидилпептидаза І
<i>Ендогенні інгібітори цистеїнових катепсинів</i>		
Тип І	Цистатіни або стефіни А та В	Цитоплазматичні
Тип ІІ	Цистатіни С, D, E/M, F, S, SA, SN	Усі є секретованими; цистатин С інгібує легумен, лізосомну аспартильну ендопептидазу, завдяки наявності другого реактивного сайту; цистатин F знайдено у лізосомах промоноцитів
Тип ІІІ	Кініногени	Інтравакулярні; один із цистатінових доменів у структурі кініногену також пригнічує кальпаїни, які є кальцій-залежними цистеїновими протеїназами

шифровано амінокислотну послідовність [34]. Даний білок знаний як найважливіший екстрацелюлярний цистатин людини у фізіологічному розумінні. Він утворюється після відщеплення 26-залишкового сигнального пептиду і являє собою білок зі 120 а. з. та молекулярною масою 13,4 кДа [34]. На відміну від інших членів цієї родини, цистатин С людини є основним білком (рІ 9,3) [35]. Він поширений в екстрацелюлярному просторі та деяких клітинах, наприклад, в кортикальних нейронах, панкреатичних відособлених клітинах, клітинах щитоподібної та привушної залоз [18]. Локалізацію даного білка встановлено в усіх біологічних рідинах. Найвищу концентрацію цистатину С виявлено в сім'яній (50 мг/л) [36] та цереброспінальній рідинах, значно нижчу його концентрацію визначено в сльозах, приплідній рідині, слині, молоці та плазмі крові [37, 38]. Базуючись на тому, що концентрація цього білка відносно вища у спинномозковій рідині, ніж у плазмі крові, припускають, що його синтез відбувається в ЦНС [22]. Концентрація згаданого інгібітора в плазмі крові за норми дорівнює 0,8–2,5 мг/л [38].

Відомо, що рівень сироваткового цистатину С використовують як ендогенний маркер функціону-

вання нирок [38]. Цистатин С людини є ефективним зворотним інгібітором відносно катепсинів В, Н, К, L та S [33, 36].

Цистатіни S, SA та SN (S-тип цистатинів) складаються зі 121 а. з. (M_r 14,2–14,4 кДа) і мають високий ступінь гомології за первинною структурою (90 %). Встановлено, що посттрансляційне фосфорилювання цистатинів S та SA призводить до утворення декількох ізоформ [39]. Експресія цих інгібіторів обмежена: цистатин SN виявлено в слині та сльозах, цистатіни S і SA – у сім'яній рідині [39].

Цистатин D також знайдено переважно у слині та сльозах. Цілоком активний цистатин D, сформований після видалення 20-залишкового сигнального пептиду, складається зі 122 а. з. та має молекулярну масу близько 13,8 кДа. Цей білок існує у двох поліморфних формах: [Cys²⁶] цистатину D людини та [Arg²⁶] цистатину D людини, які мають ідентичні активність, стабільність і розповсюдження. Досить низький ступінь гомології з іншими цистатінами (51–55 %) дозволяє припустити, що у філогенетичному розумінні цистатин D розташований між цистатінами S та C [40, 41].

Цистатіни людини E [42] (цистатин M [43]) та F (лейкоцистатин [44]) звільнюються з відповідних

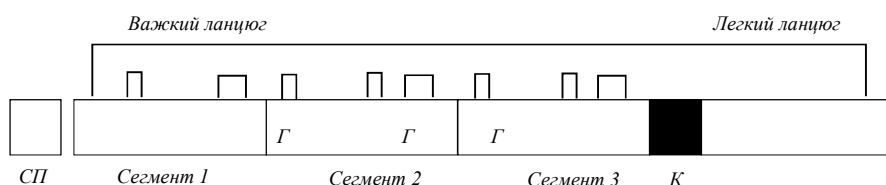


Рис. 1. Структура кініногену: СП – сигнальний пептид; К – кінін; Г – глікозилюваність; прямокутниками позначено дисульфідні зв’язки [46]

пробілоків, які також містять сигнальні пептиди. Цистатіни Е та F являють собою глікопротеїни, побудовані зі 122 і 126 а. з. відповідно. Їхні структури мають низький ступінь гомології з родиною цистатінів: 26–34 % для цистатіну Е та 30–34 % – для цистатіну F людини. На відміну від інших членів цієї родини, цистатін F людини вміщує додатковий (третій) дисульфідний зв’язок, який стабілізує N-кінцевий фрагмент даного білка. Дослідження поширеності зазначених білків у тканинах організму показало, що найвища концентрація цистатіну Е людини спостерігається в рудиментарній матці та печінці [42], а цистатіну F людини – у селезінці та лейкоцитах [44].

Кініногени представляють собою групу високомолекулярних інгібіторів цистеїнових протеїназ. Розрізняють високо- (120 кДа) та відносно низькомолекулярний (50–80 кДа) кініногени [45].

Кініногени складаються з трьох доменів, кожний з яких відповідає поліпептидним ланцюгам цистатінів другого типу (рис. 1) [20, 46]. Ці три домени разом з 10 а. з., формують N-кінцевий важкий ланцюг, ідентичний обом типам кініногенів, від якого після трансляції відщеплюється сигнальний пептид з 18 а. з. [47]. С-кінцеві легкі ланцюги значно різняться як за первинною структурою, так і за розміром. На додаток до двох дисульфідних зв’язків у кожному сегменті обидва домени (2 і 3) мають дисульфідні зв’язки з N-кінців. Дев’ятий дисульфідний зв’язок з’єднує сегмент 1 і легкий ланцюг. Кожна молекула кініногену включає три вуглеводних компоненти.

Окрім властивостей, притаманних інгібіторам цистеїнових протеїназ, ці білки є попередниками вазодилаторних пептидів брадикініну та калідину. Калікреїн відщеплює сигнальні пептиди від кініногенів, надаючи можливість важкому та легкому ланцюгам з’єднуватися одним дисульфідним зв’язком. Плазматичний калікреїн вивільняє брадикінін,

тканинний калікреїн – калідин. Встановлено, що високомолекулярний кініноген залучений до каскаду реакцій згортання крові: активації прокалікреїну та факторів XI і XII.

Кініногени можуть існувати як моно- або олігомери [47]. Найвищу концентрацію кініногенів виявлено в плазмі крові та синовіальній рідині [22].

T-кініноген є єдиним білком, концентрація якого суттєво зростає під час запалення (головний білок гострої фази запалення) [18]. T-кініноген щура має молекулярну масу 68 кДа, але відповідного гомолога цього білка в тканинах і рідинах людини не знайдено [20, 45, 47]. І хоча в сучасній літературі представлено досить докладні відомості щодо інгібіторів лізосомних цистеїнових катепсинів, багато питань залишається відкритими, зокрема, чи обмежується відомими інгібіторами захисний потенціал організму проти досліджуваних ферментів, або яку конкретну роль відіграють інгібітори катепсинів при патогенезі?

Інші цистатіни або цистатіноподібні білки. Відомо, що існують білки, які, незважаючи на високу гомологію за амінокислотною послідовністю, мають чіткі відмінності у структурі й біологічній активності порівняно з цистатінами. Прикладами таких цистатіноподібних білків є збагачені гістидином глікопротеїни (ГЗГ) та фегуїни [48], які не пригнічують цистеїнових протеїназ. Виявлено також білки на зразок надзвичайно солодкого рослинного білка монеліна, у якого за низької амінокислотної гомології та відсутності інгібіторної функції зафіксовано цистатіноподібну тривимірну структуру [49].

Дослідження структурних особливостей цистатінової активності. Цистатіни містять три сегменти, відповідальні за взаємодію з цистеїновими протеїназами: N-кінцевий фрагмент і так звані перша й друга петлі, які утворюються з одного боку молекули інгібітора та безпосередньо зв’язуються з

каталітичною щільною цистеїнових протеїназ. Встановлено, що розщеплення пептидного зв'язку Gly¹¹-Gly¹² на три порядки зменшує спорідненість цистатину С людини до папаїну [36]. Важливість N-кінцевого фрагмента цистатину С людини для взаємодії з цистеїновими протеїназами підтверджено дослідженнями швидкості гідролізу відповідних синтетичних пептидів. Усі фрагменти, які мали Gly⁴-Glu²¹, Arg⁸-Asp¹⁵ та Arg⁸-Gly¹², повністю розщеплювалися папаїном на ділянці зв'язку Gly¹¹-Gly¹² менш ніж за 60 с, тоді як відповідний зв'язок цього пептиду із залишками Gly¹¹-Asp¹⁵ зберігався інтактним навіть після 15 год інкубації [50]. Внаслідок цього зроблено припущення, що N-кінцевий фрагмент цистатину С людини причетний до взаємодії з ферментом і забезпечує головний внесок до загальної спорідненості зв'язування амінокислотних залишків Arg⁸, Leu⁹ і Val¹⁰ інгібітора із субстратними субсайтами S₄, S₃ і S₂ відповідно [50]. Частина ланцюга, яка містить Val¹⁰, є ділянкою, яка чинить найсуттєвіший вплив на спорідненість N-кінцевого фрагмента цистатину С людини до катепсинів. Показано, що Leu⁹ є найважливішим амінокислотним залишком для селективного зв'язування цистатину С людини з катепсинами В, Н, L та S [51]. Заміна Gly¹¹ на будь-який інший залишок призводить до різкого падіння інгібіторної активності. Останнє свідчить на користь того, що ця амінокислота, можливо, є стрижнем між конформаційно пластичним N-кінцевим сегментом та рештою молекули [52].

Співвідношення між структурою і активністю для ще двох зв'язувальних сегментів цистатину С людини (Gln⁵⁵-Gly⁵⁹ та Pro¹⁰⁵-Trp¹⁰⁶) вивчали менш ретельно, але з'ясовано, що заміщення Trp¹⁰⁶ на Gly¹⁰⁶ знижує спорідненість до катепсинів В та Н приблизно на три порядки [52]. Заміна Trp¹⁰⁶ на Gly¹⁰⁶ разом із змінами в N-кінцевій послідовності цистатину С людини спричиняє подальше різке падіння інгібіторної потужності [53].

Низькомолекулярні синтетичні інгібітори цистеїнових протеїназ. Діазометилкетони. Невдовзі після з'ясування того факту, що N-кінцевий фрагмент Arg⁸-Leu⁹-Val¹⁰-Gly¹¹ цистатину С людини взаємодіє з відповідними підцентрами цистеїнових протеїназ, на основі даного фрагмента було синте-

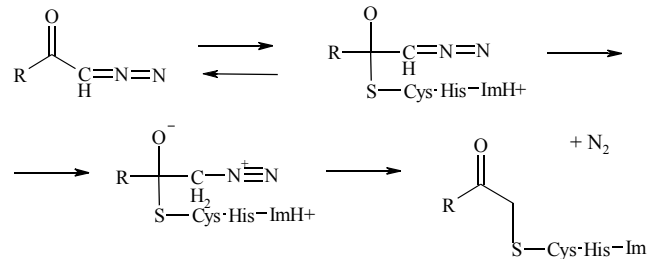


Рис. 2. Механізм пригнічення цистеїнових протеїназ діазометилкетонами

зовано низку пептидилдіазометилкетонів [50]. Створення цих сполук базувалося на спостереженні, що азосерин, який є антибіотиком, пригнічує ріст клітини завдяки алкілуванню тіолової групи амідотрансферази [54]. Встановлено також, що діазометилкетони, які використовують для синтезу хлорометилкетонів, не проявляють інгібіторної активності відносно серинових протеїназ. Таким чином, діазометилкетони зручно застосовувати як потенційні селективні інгібітори цистеїнових протеїназ. Відомо, що серинові протеїнази не інгібуються цими сполуками, які в свою чергу не реагують з простими тіолами на зразок меркаптоетанолу та/або дитіотреїтолу. Це дає змогу синтезувати велику кількість похідних, з-поміж яких деякі мають достатню селективність стосовно низки цистеїнових протеїназ [55]. Точний механізм пригнічення невідомий. Але існує припущення, що карбонільний вуглець зазнає нуклеофільної атаки з боку тіолату з утворенням гемітіокеталу. Далі атом вуглецю діазометильної групи протонується імідазольним іоном гістидину, що визначає швидкість перебігу реакції, а потім формується кінцевий тіоетер з одночасним відщепленням молекули азоту (рис. 2).

Варто зазначити, що діазометилкетони більш ефективні при слабкокислих значеннях рН. Завдяки своїй селективності та неактивності по відношенню до простих тіолів, які є важливими у дослідженні цистеїнових протеїназ, діазометилкетони використовують у дослідях на культурах клітин [56, 57]. Застосування діазометилкетонів як лікарських засобів все ще залишається сумнівним через нестабільність, хімічну реактивність та їхню можливу токсичність. Діазометилкетони Boc-Val-Gly-CHN₂ (Boc-VG-DAM) і Z-Leu-Val-Gly-CHN₂ (Z-LVG-

DAM) пригнічують активність папаїну, катепсину В та стрептококової протеїнази [50]. Останню сполуку перевіряли *in vitro* та *in vivo* на антибактеріальну активність стосовно великої кількості бактеріальних штамів різних видів [58]. У результаті мишей, інфікованих смертельною дозою стрептококів групи А, виживували лише однією ін'єкцією 0,2 мг Z-LVG-DAM. Дози, які в 10 разів перевищували вищезгадану, не проявляли токсичного ефекту [58]. E-64, інгібітор очищеної стрептококової протеїнази, завдяки своїй низькій ліпофільності є неактивним у клітинній культурі та *in vivo* [58]. Але, згідно з останніми дослідженнями, діазометилкетони є ембріотоксичними [59].

Епоксисукцинілові похідні. У 1978 р. автори роботи [60] виділили з екстракту культури *Aspergillus japonicus* високоактивний, незворотний інгібітор папаїну. Цю речовину визначили як 1-[N-(L-3-транс-карбоксоксиран-2-карбоніл)-L-лейцил]аміно]-4-гуанідино-бутан, E-64 (рис. 3). Перший інгібітор, що містить оксиран, структура якого подібна до структури N-кінцевого сегмента цистатіну С людини, описано у публікації [50]. Він проявляв лише слабку зворотну інгібіторну дію. За даними літератури, епоксисукцинілові пептиди пригнічують дію лише цистеїнових протеїназ [61]. Згідно зі спектроскопічними дослідженнями, тіолат активного центра руйнує оксиранове кільце у положенні C-2 (рис. 3), при цьому епоксидне кільце розкривається з інверсією конфігурації на цій ділянці [62]. Відомо, що ефіри епоксibuрштинової кислоти також проявляють значну активність, особливо це стосується бензильового ефіру. У зв'язку з цим зроблено припущення, що пептидна частина інгібітора взаємодіє із сайтом S₁-S₂ ферменту, як і інші інгібітори, а не з сайтом S' і, таким чином, бензольне кільце зв'язується із сайтом S₂, спорідненим з гідروفобними ароматичними амінокислотами [60]. Але рентгеноструктурний аналіз комплексів папаїн-E-64 і папаїн-E-64c, у якому залишок агматину E-64 заміщений ізоаміламіном, показав, що вищезгадане припущення хибне, принаймні, для цього ферменту [63]. Епоксидний залишок взаємодіє із сайтом S₁, лейцин – із сайтом S₂, тобто пептидний ланцюг інгібітора зв'язується у напрямку, протилежному порівняно з субстратом. Але зв'язування з

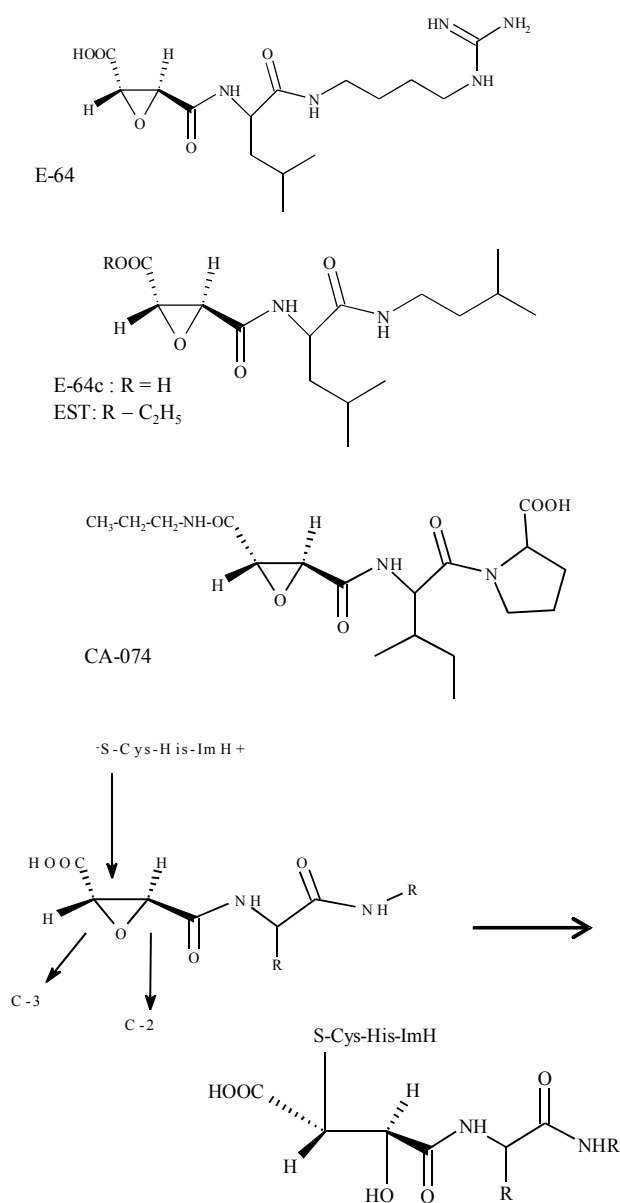


Рис. 3. Пригнічення цистеїнових протеїназ епоксисукциніловими похідними

S'-сайтом виявили при інгібуванні катепсину В похідними епоксисукциніл-(ізо)лейцилпроліну [64]. Ці похідні пригнічують катепсин В відносно селективно, в основному, у разі неестерифікованого S-кінцевого проліну [65]. Встановлено, що існує можливість взаємодії C-кінцевого карбоксилату із залишками гістидину 110 та 111, відповідальними за екзопептидазну активність цього ферменту [65].

Похідні R-Eps-Ile(Leu)-Pro синтезують з різними амідними та ефірними замісниками (R) в епо-

кислородному кільці [65]. З-поміж них СА-074 (рис. 3) є найселективнішим інгібітором катепсину В. Цей інгібітор, який здатний селективно зв'язуватися з S-субсайтом зазначеного ферменту, був створений раніше, ніж розшифрували тривимірну структуру катепсину В [66].

На сьогодні розроблено вже досить велику кількість інгібіторів цистеїнових протеїназ – похідних E-64 [67–69]. Завдяки вибірковості їхньої дії стосовно цистеїнових протеїназ та хімічній інактивності ці речовини продовжують використовувати як хімічні реактиви при дослідженні цистеїнових протеїназ [70, 71]. Зважаючи на вищу, ніж у діазометилкетонів, стабільність у розчинах, їх застосовують як найзручніші сполуки і при створенні фармацевтичних препаратів [72].

Відомо, що здатність цих інгібіторів проникати в клітину можна покращити заміщенням позитивно зарядженої гуанідинової функції на незаряджені замісники [71]. Естерифіковані похідні карбоксильних залишків епоксидного кільця, які мають у 100–1000 разів нижчу активність *in vitro*, краще резорбуються за умов *in vivo* через підвищену ліпофільність [68].

Механізм інгібування цистеїнових протеїназ.

Для з'ясування механізму пригнічення цистеїнових протеїназ цистатинами проведено значну кількість спектроскопічних, кінетичних і кристалографічних досліджень. Встановлено, що процес зв'язування інгібітора з ферментом є одноетапним, простим, зворотним та описується рівняннями другого порядку. Крім того, ці дослідження показали, що ферменти з блокованим активним центром все ще здатні зв'язуватися з цистатинами, хоча й з меншою афінністю [20, 29]. Все це засвідчує, що взаємодія цистеїнових протеїназ з цистатинами ґрунтується не на простій реакції з каталітичним цистеїновим залишком цього ферменту, а на гідрофобних взаємодіях між зв'язувальними ділянками цистатинів та відповідними залишками, які формують сайт для зв'язування ферменту. Незважаючи на їхню структурну гомологію та подібний спосіб інгібування, у цистатинів ступінь афінності до ферментів значно різниться.

Усі інгібітори цистеїнових протеїназ пригнічують лише цистеїнові протеїнази, включно з екзо-

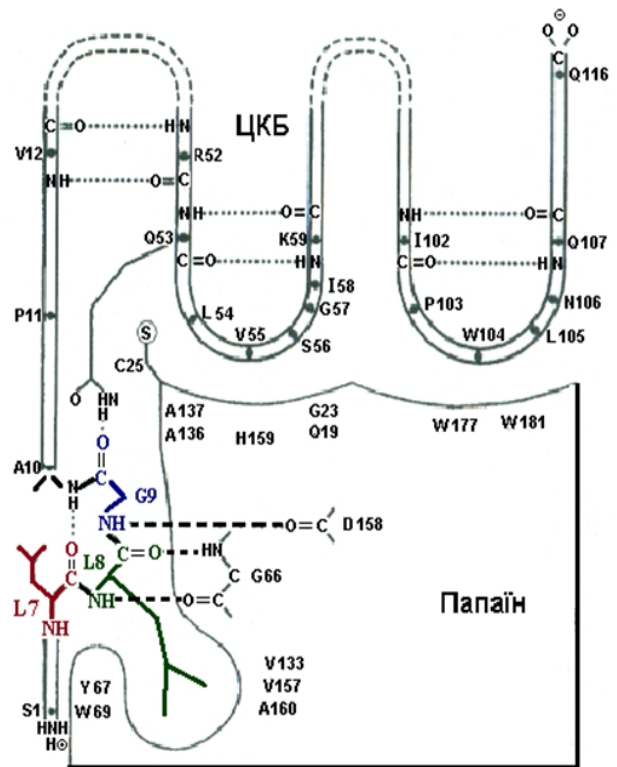


Рис. 4. Взаємодія між цистатином курячого білка та папаїном [22]

пептидазою катепсину С [73]. Винятками є бромелайн [73] та гліцилендопептидаза [74], дію яких не інгібує жодний з вищезгаданих білків. Кальпаїни пригнічуються кініногенами; за цей процес відповідає сегмент 2. Клострипаїн та протеїназа поліомієлітного вірусу – єдині ферменти, які не належать до суперродини папаїнових, але пригнічуються цистатинами [45].

Як нуклеофіл в активному центрі цистеїнових протеїназ функціонує залишок цистеїну, а як донор протонів – просторово зближений залишок гістидину [22]. Під час пептидного гідролізу формується ферментно-субстратний тіоловий ефір (фаза ацилювання), при цьому С-кінцева частина субстрату звільняється. Надалі тіоефір гідролізується за присутності молекул води та розщеплюється на вільний фермент і N-кінцеву частину розщепленого субстрата (фаза деацилювання) (рис. 4).

Синтезовані сполуки взаємодіють з ділянкою зв'язування цистеїнових протеїназ-мішеней за механізмом конкурентного нековалентного, конкурентного ковалентного, але зворотного, та/або незворотного ковалентного інгібування.

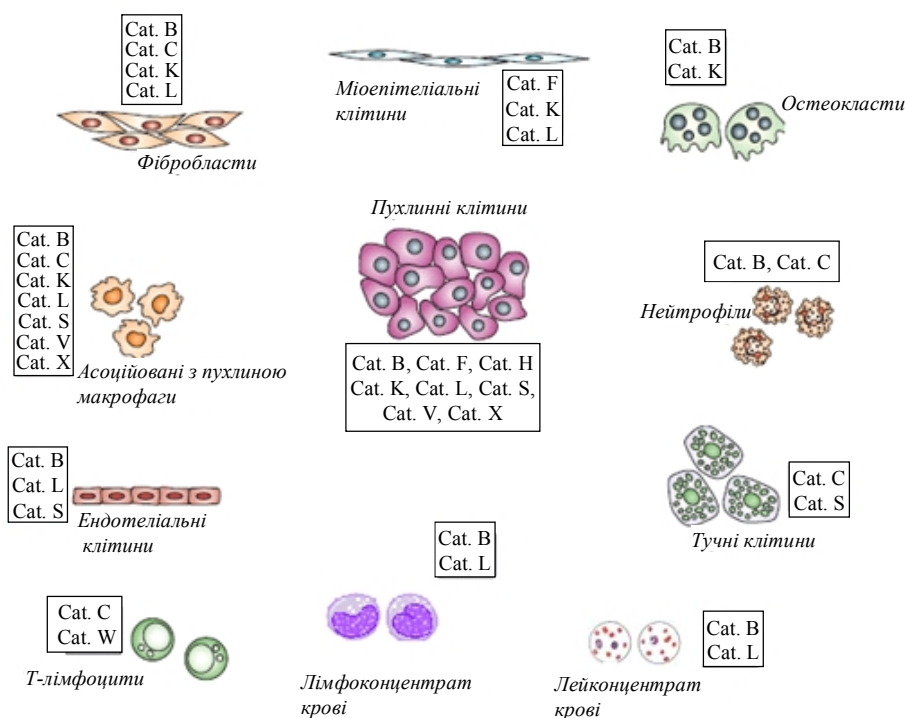


Рис. 5. Цистеїнові катепсини, які експресуються у пухлинних та в асоційованих з пухлинами клітинах і залучені до неопластичної прогресії [1]

При дослідженні інгібіторної здатності цистатину С виявлено, що N-кінцевий фрагмент, який містить 11 а. з., є важливим для прояву інгібіторної активності цього білка [36]. Вивчаючи синтетичні пептиди, аналогічні N-кінцевій амінокислотній послідовності цистатину С людини, встановлено, що вони являють собою субстрати для папаїну, а розщеплення відбувається на ділянці пептидного зв'язку Gly¹¹-Gly¹². З'ясовано також, що Arg⁸, Leu⁹ і Val¹⁰ з N-кінцевого сегмента цистатину С взаємодіють з субсайтами S₄, S₃ та S₂ субстратної кишені папаїну відповідно [50]. Це підтверджує аналіз тривимірної структури цистатинів. На рис. 4 наведено модель [75], розроблену на основі просторової структури курячого цистатину. Вона ілюструє зв'язування папаїну з даним інгібітором. Згідно з представленою моделлю, N-кінець інгібітора, який містить залишок Gly⁹, присутній у всіх цистатинах (нумерація як для курячого цистатину), взаємодіє з активним центром та сайтами S₁-S₃ ферменту. У цей час дві шпилькоподібні петлі з послідовностями QVVAG і Pro-Tgr зв'язуються з S₁'-S₂'-сайтами. Сегмент 1 кініногенів, який не має цих послідовностей, не проявляє інгібіторної активності на відмі-

ну від інших двох доменів. Дану модель підтверджено рентгеноструктурним аналізом ферментно-інгібіторного комплексу папаїну з рекомбінантним стефіном В [20]. Інактивація цистеїнових протеїназ відбувається конкурентним, нековалентним, зворотним інгібуванням. На відміну від інгібіторів серинових протеїназ, інгібітори цистеїнових протеїназ формують також комплекси з цистеїновими протеїназами, активні центри яких реагують з реактивами, що блокують тіол.

Висока афінність цистатину С, концентрація якого в біологічних рідинах знаходиться в межах 0,1–1 μМ, до цистеїнових протеїназ людини вказує на те, що він є, очевидно, головним фізіологічним регулятором активності цистеїнових протеїназ (особливо катепсину В) у ссавців [21]. Відомо, що цистатини та цистеїнові протеїнази поряд з іншими медіаторами деградації білків беруть участь у комплексних системах, здатних генерувати різкі зміни протеолізу – так звані протеолітичні вибухи [18].

Цистатини та рак. Значну кількість досліджень присвячено вивченню ролі цистеїнових протеїназ та їхніх інгібіторів при онкологічних захворюваннях [76–78]. Згідно з даними літератури, при канце-

рогенезі різної нозології активність інгібіторів цистеїнових протеїназ може бути збільшеною, зменшеною або незмінною у порівнянні з нормою. Переважним чином активність цих білків визначається в гомогенатах, тканинних або клітинних екстрактах, а також у культурах клітин (рис. 5). Але існують роботи з вивчення активності та властивостей виділених і очищених інгібіторів цистеїнових протеїназ [79, 80].

Встановлено, що визначення цих білків в екстрацелюлярних рідинах може розширити їхнє застосування при постановці первинного діагнозу [77, 78], оцінці відповіді на обрану терапію [80, 81] та моніторингу перебігу онкологічного захворювання. Показано, що стефіни А та В є інформативними показниками метаболічних змін в асцитній рідині пацієнтів, хворих на карциному яєчників, та в бронхоальвеолярній рідині хворих на рак легень [17]. Підвищений рівень стефіну А у сироватці крові хворих на гепатоцелюлярну карциному та цироз печінки корелював із розміром пухлини та кількістю неопластичних пошкоджень [78]. При меланомі, колоректальному раку та раку легень концентрація цистатину С корелює з прогресією злоякісності захворювання. Стефін А, стефін В та цистатин С запропоновано використовувати як значні прогностичні маркери у сироватці хворих на колоректальний рак [78]. Високий рівень цих трьох інгібіторів корелює із коротким терміном тривалості життя онкологічних хворих, хоча для стефіну А ці дані статистично не підтвержені. Стефін В є значно важливішим прогностичним маркером і разом з високим рівнем активності катепсину В посилює ризик смертності пацієнтів.

У сироватці хворих із злоякісними пухлинами легень рівень комплексу катепсин В/цистатин С є значно меншим, ніж при доброякісних новоутвореннях легень та за норми [81]. Подібну кореляцію спостерігали і при захворюванні на колоректальний рак: цей рівень виявився значно меншим на пізніх стадіях зазначеної патології порівняно з ранніми стадіями. Згадана інверсна кореляція між злоякісною прогресією та стабільністю комплексу катепсин В/цистатин С свідчить на користь гіпотези про зменшення активності інгібіторів цистеїнових протеїназ за ракової прогресії [82].

Висновки. Таким чином, останнім часом досягнуто значного прогресу у розумінні біологічної ролі інгібіторів цистеїнових протеїназ та особливостей молекулярної структури, яка відповідає за реалізацію їхніх властивостей. Успіхи відмічено у розробці методів створення синтетичних терапевтично важливих аналогів даних білків. Зокрема продемонстровано, що інгібітори цистеїнових протеїназ можуть бути зручними фармацевтичними засобами лікування онкологічних, запальних захворювань, патологічних процесів, які характеризуються підвищеною деградацією кісткової або м'язової тканин, та хвороб, пов'язаних із ураженням організму вірусами і бактеріальними інфекціями. Незважаючи на суттєві досягнення, у фармацевтичній галузі залишається ще досить багато відкритих питань щодо селективності та зниження хімічної реактивності, необхідних для зменшення токсичності синтетичних інгібіторів цистеїнових протеїназ.

V. I. Chorna, O. L. Lyanna¹

Inhibitors of lysosomal cysteine proteases

Dnipropetrovs'k State Agrarian University
25, Voroshylova St., Dnipropetrovs'k, 49600

¹Dnipropetrovs'k State Medical Academy
9, Dzerzhynskoho St., Dnipropetrovs'k, 49044

Summary

The review is devoted to the inhibitors of cysteine proteinases which are believed to be very important in many biochemical processes of living organisms. They participate in the development and progression of numerous diseases that involve abnormal protein turnover. One of the main regulators of these proteinases is their specific inhibitors: cystatins. The aim of this review was to present current knowledge about endogenous inhibitors of lysosomal cysteine proteases and their synthetic analogs.

Keywords: cystatins, stefins, kininogens, cysteine cathepsins, synthetic inhibitors.

В. И. Черная, О. Л. Лянна

Ингибиторы лизосомных цистеиновых протеиназ

Резюме

Обзор посвящен ингибиторам цистеиновых протеиназ, имеющих, как известно, существенное значение для многих биохимических процессов, протекающих в живом организме. Они участвуют в образовании и развитии большого количества заболеваний, связанных с аномальным белковым обменом. Одними из главных регуляторов активности этих протеиназ являются их специфические ингибиторы – цистатины. Цель данного обзора

состоит в освещении современных представлений об эндогенных ингибиторах лизосомных цистеиновых протеиназ и их синтетических аналогах.

Ключевые слова: цистатины, стефины, кининогены, цистеиновые катепсины, синтетические ингибиторы.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Turk V., Turk B. Lysosomal cysteine proteases and their protein inhibitors: recent developments // *Acta Chim.*—2008.—**55**, N 4.—P. 727–738.
2. Dickinson D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissue in health and disease // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*—2002.—**13**, N 3.—P. 238–275.
3. Lopez-Otin C., Overall C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*—2002.—**3**, N 7.—P. 509–519.
4. Mason R. W. Lysosomal metabolism of proteins // *Subcell. Biochem.*—1996.—**27**.—P. 159–190.
5. Barrett A. J. Classification of peptidases // *Meth. Enzymol.*—1994.—**244**.—P. 1–15.
6. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers // *Biochim. Biophys. Acta.*—2000.—**1477**, N 1–2.—P. 98–111.
7. Lazure C., Seidah N. G., Pelaprat D., Chretien M. Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review // *Can. J. Biochem. Cell Biol.*—1983.—**61**, N 7.—P. 501–515.
8. Chapman H. A. Jr., Munger J. S., Shi G. P. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*—1994.—**150**, N 6.—P. S155–159.
9. Riese R. J., Chapman H. A. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation // *Curr. Opin. Immunol.*—2000.—**12**, N 1.—P. 107–113.
10. Hamilton R. T., Bruns K. A., Delgado M. A., Shim J. K., Fang Y., Denhardt D. T., Nilsen-Hamilton M. Developmental expression of cathepsin L and *c-ras^{Hla}* in the mouse placenta // *Mol. Reprod. Dev.*—1991.—**30**, N 4.—P. 285–292.
11. Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J. Lysosomes in cell death // *Oncogene.*—2004.—**23**, N 16.—P. 2881–2890.
12. Jedeszko C., Sloane B. F. Cysteine cathepsins in human cancer // *Biol. Chem.*—2004.—**385**, N 11.—P. 1017–1027.
13. Hansen T., Petrow P. K., Gaumann A., Keyszer G. M., Eysel P., Eckardt A., Brauer R., Kriegsmann J. Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium // *J. Rheumatol.*—2000.—**27**, N 4.—P. 859–865.
14. Lang A., Horler D., Baici A. The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis // *J. Rheumatol.*—2000.—**27**, N 8.—P. 1970–1979.
15. Bernstein H. G., Kirschke H., Wiederanders B., Pollak K. H., Zipress A., Rinne A. The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease: a review // *Mol. Chem. Neurobiol.*—1996.—**27**, N 3.—P. 225–247.
16. Nagai A., Murakawa Y., Terashima M., Shimode K., Umegae N., Takeuchi H., Kobayashi S. Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases // *Neurology.*—2000.—**55**, N 12.—P. 1828–1832.
17. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers // *Clin. Chim. Acta.*—2004.—**342**, N 1–2.—P. 41–69.
18. Dickinson D. P. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making – but to what purpose? // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*—2002.—**13**, N 6.—P. 485–508.
19. Turk B., Bieth J. G., Bjork I., Dolenc I., Turk D., Cimerman N., Kos J., Colic A., Stoka V., Turk V. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*—1995.—**376**, N 4.—P. 225–230.
20. Otto H. H., Schirmeister T. Cysteine proteases and their inhibitors // *Chem. Rev.*—1997.—**97**, N 1.—P. 133–172.
21. Grzonka Z., Jankowska E., Kasprzykowski F., Kasprzykowska R., Lankiewicz L., Wiczak W., Wiczerzak., Ciarkowski J., Drabik P., Janowski R., Kozak M., Jaskolski M., Grubb A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors // *Acta Biochim. Pol.*—2001.—**48**, N 1.—P. 1–20.
22. Turk V., Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases // *FEBS Lett.*—1991.—**285**, N 2.—P. 213–219.
23. Green G. D., Kembhavi A. A., Davies M. E., Barrett A. J. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver // *Biochem. J.*—1998.—**218**, N 3.—P. 939–946.
24. Takeda A., Kobayashi S., Samejima T. Isolation and characterization of two thiol proteinase inhibitors of low molecular weight from newborn rat epidermis // *J. Biochem.*—1983.—**94**, N 3.—P. 811–820.
25. Turk B., Kriaj I., Turk V. Isolation and characterization of bovine stefin B // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*—1992.—**373**, N 7.—P. 441–446.
26. Lenarcic B., Ritonja A., Dolenc L., Stoka V., Berbic S., Pungercar J., Strukelj B., Turk V. Pig leukocyte cysteine proteinase inhibitor (PLCPI), a new member of the stefin family // *FEBS Lett.*—1993.—**336**, N 2.—P. 289–292.
27. Kondo H., Ijiri S., Abe K., Maeda H., Arai S. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected Vero cells // *FEBS Lett.*—1992.—**299**, N 1.—P. 48–50.
28. Lenarcic B., Kriaj I., Zunec P., Turk V. Differences in specificity for the interactions of stefins A, B and D with cysteine proteinases // *FEBS Lett.*—1996.—**395**, N 2–3.—P. 113–118.
29. Abrahamson M. Cystatins: protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases // *Ciencia e Cultura.*—1993.—**45**, N 5.—P. 299–304.
30. Turk B., Kriaj I., Kralj B., Dolenc I., Popovic T., Bieth J. G., Turk V. Bovine stefin C, a new member of the stefin family // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 10.—P. 7323–7329.
31. Esnard F., Esnard A., Faucher D., Capony J.P., Derancourt J., Brillard M., Gauthier F. Rat cystatin C: the complete amino acid sequence reveals a site for N-glycosylation // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*—1990.—**371**, suppl.—P. 161–166.
32. Freije J. P., Pendas A. M., Velasco G., Roca A., Abrahamson M., Lopez-Otin C. Localization of the human cystatin D gene (CST5) to chromosome 20p11.21 by *in situ* hybridization // *Cytogen. Cell. Genet.*—1993.—**62**, N 1.—P. 29–31.
33. Fossum K., Whitaker J. R. Ficin and papain inhibitor from chicken egg white // *Arch. Biochem. Biophys.*—1968.—**125**, N 1.—P. 367–375.
34. Grubb A., Lofberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenophysis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1982.—**79**, N 9.—P. 3024–3027.
35. Abrahamson M. Cystatins // *Meth. Enzymol.*—1994.—**244**.—P. 685–700.
36. Abrahamson M., Ritonja A., Brown M. A., Grubb A., Machleidt W., Barrett A. J. Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin // *J. Biol. Chem.*—1987.—**262**, N 20.—P. 9688–9694.
37. Grubb A. O., Weiber H., Lofberg H. The gamma-trace concentration of normal human seminal plasma is thirty-six times that of normal human blood plasma // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*—1983.—**43**, N 5.—P. 421–425.

38. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids // *Clin. Nephrol.*—1992.—**38**, Suppl 1.—P. S20–S27.
39. Isemura S., Saitoh E., Sanada K., Minakata K. Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (cystatin SN, cystatin SA, cystatin S, and two phosphorylated forms of cystatin S) in human whole saliva and determination of phosphorylation sites of cystatin S // *J. Biochem.*—1991.—**110**, N 4.—P. 648–654.
40. Balbin M., Freije J. P., Abrahamson M., Velasco G., Grubb A., Lopez-Otin C. A sequence variation in the human cystatin D gene resulting in an amino acid (Cys/Arg) polymorphism at the protein level // *Hum. Genet.*—1993.—**90**, N 6.—P. 668–669.
41. Freije J. P., Balbin M., Abrahamson M., Velasco G., Dalboge H., Grubb A., Lopez-Otin C. Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the *Escherichia coli* expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 21.—P. 15737–15744.
42. Ni J., Abrahamson M., Zhang M., Fernandez M. A., Grubb A., Su J., Yu G. L., Li Y., Parmelee D., Xing L., Coleman T. A., Gentz S., Thotakura R., Nguyen N., Hesselberg M., Gentz R. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**, N 16.—P. 10853–10858.
43. Sotiropoulou G., Anisowicz A., Sager R. Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**, N 2.—P. 903–910.
44. Ni J., Fernandez M. A., Danielsson L., Chillakuru R. A., Zhang J., Grubb A., Su J., Gentz R., Abrahamson M. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor // *J. Biol. Chem.*—1998.—**273**, N 38.—P. 24797–24804.
45. Lalmanach G., Naudin C., Lecaille F., Fritz H. Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors // *Biochimie.*—2010.—**92**, N 11.—P. 1568–1579.
46. Zhang J. C., Claffey K., Sakthivel R., Darzynkiewicz Z., Shaw D. E., Leal J., Wang Y. C., Lu F. M., McCrae K. R. Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5 // *FASEB J.*—2000.—**14**, N 15.—P. 2589–2600.
47. DeLa Cadena R. A., Colman R. W. Structure and functions of human kininogens // *Trends Pharmacol. Sci.*—1991.—**12**, N 7.—P. 272–275.
48. Brown W. M., Dziegielewska K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily – new members and their evolution // *Protein Sci.*—1997.—**6**, N 1.—P. 5–12.
49. Murzin A. Sweet-tasting protein monellin is related to the cystatin family of thiol proteinase inhibitors // *J. Mol. Biol.*—1993.—**230**, N 2.—P. 689–694.
50. Grubb A., Abrahamson M., Olafsson I., Trojnar J., Kasprzykowska R., Kasprzykowski F., Grzonka Z. Synthesis of cysteine proteinase inhibitors structurally based on the proteinase interacting N-terminal region of human cystatin C // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*—1990.—**371**, suppl.—P. 137–144.
51. Hall A., Dalboge H., Grubb A., Abrahamson M. Importance of the evolutionarily conserved glycine residue in the N-terminal region of human cystatin C (Gly-11) for cysteine endopeptidase inhibition // *Biochem. J.*—1993.—**291**, Pt 1.—P. 123–129.
52. Hall A., Ekiel I., Mason R. W., Kasprzykowski F., Grubb A., Abrahamson M. Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D // *Biochemistry.*—1998.—**37**, N 12.—P. 4071–4079.
53. Hall A., Hakansson K., Mason R. W., Grubb A., Abrahamson M. Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases // *J. Biol. Chem.*—1995.—**270**, N 10.—P. 5115–5121.
54. Buchanan J. M. The amidotransferases // *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*—1973.—**39**.—P. 91–183.
55. Crawford C., Mason R. W., Wikstrom P., Shaw E. The design of peptidyl diazomethane inhibitors to distinguish between the cysteine proteinases calpain II, cathepsin L and cathepsin B // *Biochem. J.*—1988.—**253**, N 3.—P. 751–758.
56. Wilcox D., Mason R. W. Labelling of cysteine proteinases in purified lysosomes // *Biochem. Soc. Trans.*—1989.—**17**, N 6.—P. 1080–1081.
57. Wilk S., Friedman T. C., Kline T. B. Pyroglutamyl diazomethyl ketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1985.—**130**, N 2.—P. 662–668.
58. Bjorck L., Akesson P., Bohus M., Trojnar J., Abrahamson M., Olafsson I., Grubb A. Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor // *Nature.*—1989.—**337**, N 6205.—P. 385–386.
59. Ambroso J. L., Harris C. *In vitro* embryotoxicity of the cysteine proteinase inhibitors benzyloxycarbonyl-phenylalanine-alanine-diazomethane (Z-Phe-Ala-CHN₂) and benzyloxycarbonyl-phenylalanine-phenylalanine-diazomethane (Z-Phe-Phe-CHN₂) // *Teratology.*—1994.—**50**, N 3.—P. 214–228.
60. Hanada K., Tamai M., Yamagishi M., Ohmura S., Sawada J., Tanaka I. Isolation and characterization of E 64, a new thiol protease inhibitor // *Agr. Biol. Chem.*—1978.—**42**, N 3.—P. 523–528.
61. Barrett A. J., Kembhavi A. A., Brown M. A., Kirschke H., Knight C. G., Tamai M., Hanada K. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L // *Biochem. J.*—1982.—**201**, N 1.—P. 189–198.
62. Schaschke N., Assfalg-Machleidt I., Machleidt W., Turk D., Moroder L. E-64 analogues as inhibitors of cathepsin B. On the role of the absolute configuration of the epoxysuccinyl group // *Bioorg. Med. Chem.*—1997.—**5**, N 9.—P. 1789–1797.
63. Matsumoto K., Yamamoto D., Ohishi H., Tomoo K., Ishida T., Inoue M., Sadatome T., Kitamura K., Mizuno H. Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex // *FEBS Lett.*—1989.—**245**, N 1–2.—P. 177–180.
64. Turk D., Podobnik M., Popovic T., Katunuma N., Bode W., Huber R., Turk V. Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: a basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors // *Biochemistry.*—1995.—**34**, N 14.—P. 4791–4797.
65. Murata M., Miyashita S., Yokoo C., Tamai M., Hanada K., Hatayama K., Towatari T., Nikawa T., Katunuma N. Novel epoxy-succinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, *in vitro* // *FEBS Lett.*—1991.—**280**, N 2.—P. 307–310.
66. Sumiya S., Yoneda T., Kitamura K., Murata M., Yokoo C., Tamai M., Yamamoto A., Inoue M., Ishida T. Molecular design of potent inhibitor specific for cathepsin B based on the tertiary structure prediction // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*—1992.—**40**, N 2.—P. 299–303.
67. Gour-Salin B. J., Lachance P., Plouffe C., Storer A. C., Menard R. Epoxysuccinyl dipeptides as selective inhibitors of cathepsin B // *J. Med. Chem.*—1993.—**36**, N 6.—P. 720–725.
68. Tamai M., Matsumoto K., Omura S., Koyama I., Ozawa Y., Hanada K. *In vitro* and *in vivo* inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64 // *J. Pharmacobiodyn.*—1986.—**9**, N 8.—P. 672–677.

69. Huang Z., McGowan E. B., Detwiler T. C. Ester and amide derivatives of E64c as inhibitors of platelet calpains // *J. Med. Chem.*—1992.—**35**, N 11.—P. 2048–2054.
70. McGowan E. B., Becker E., Detwiler T. C. Inhibition of calpain in intact platelets by the thiol protease inhibitor E-64d // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1989.—**158**, N 2.—P. 432–435.
71. Noda T., Isogai K., Katunuma N., Tarumoto Y., Ohzeki M. Effects of cathepsin B, H, and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (line 413) of *in vivo* administration of E-64-c (N-[N-(L-3-transcarboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methylbutylamine) // *J. Biochem.*—1981.—**90**, N 3.—P. 893–896.
72. Bromme D., Kaleta J. Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design // *Curr. Pharm. Des.*—2002.—**8**, N 18.—P. 1639–1658.
73. *Handbook of proteolytic enzymes* / Eds A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner.—New York: Acad. press, 1998.—1666 p.
74. Buttle D. J., Ritonja A., Dando P. M., Abrahamson M., Shaw E. N., Wikstrom P., Turk V., Barrett A. J. Interactions of papaya proteinase IV with inhibitors // *FEBS Lett.*—1990.—**262**, N 1.—P. 58–60.
75. Bode W., Engh R., Musil D., Thiele U., Huber R., Karshikov A., Brzin J., Kos J., Turk V. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases // *EMBO J.*—1988.—**7**, N 8.—P. 2593–2599.
76. Kos J., Schweiger A. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer // *Radiol. Oncol.*—2002.—**36**, N 2.—P. 176–179.
77. Chorna V. I., Kakadiy O. L. Lysosomal cystein proteinases in malignant growth // *Oncology.*—2004.—**6**, N 2.—P. 84–89.
78. Kos J., Werle B., Lah T., Brunner N. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer // *Int. J. Biol. Markers.*—2000.—**15**, N 1.—P. 84–89.
79. Lyanna O.L., Chorna V.I. Endogenous inhibitor of cysteine cathepsin L from human brain // *Med. Chem.*—2004.—**6**, N 3.—P. 107–109.
80. Kos J., Krasovec M., Cimernan N., Nielsen H. J., Christensen I. J., Brunner N. Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis // *Clin. Cancer. Res.*—2000.—**6**, N 2.—P. 505–511.
81. Luthgens K., Ebert W., Trefz G., Gabrijelcic D., Turk V., Lah T. Cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients // *Cancer Detect. Prev.*—1993.—**17**, N 3.—P. 387–397.
82. Lerner U. H., Johansson L., Ranjso M., Rosenquist J. B., Reinholdt F. P., Grubb A. Cystatin C, and inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts // *Acta Physiol. Scand.*—1997.—**161**, N 1.—P. 81–92.

UDC 577.151.042
Received 21.09.10