

Dókus Endre Levente

**Peptidmimetikum kalpain inhibitorok szintézise
és vizsgálata
Doktori értekezés tézisei**

Témavezető:

***Dr. Bánóczy Zoltán egyetemi adjunktus
ELTE TTK Kémiai Intézet***



ELTE Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Császár Attila egyetemi tanár

***Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia
programvezető: Dr. Perczel András egyetemi tanár***

**MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Budapest
2017**

1. Bevezetés

A különböző proteáz típusú enzimek kiemelt jelentőséggel bírnak az élő szervezetek működésében, mivel aktivitásuk lehetővé teszi számos biológiailag aktív fehérje működésének közvetlen, pontos és irreverzibilis szabályozását (1). A kalpainok a Ca^{2+} -ion függő intracelluláris cisztein-proteázok családjába tartoznak. Napjainkig az enzimesalád 15 különböző tagját azonosították. (2). Közülük a μ - és m-kalpain (kalpain 1 és 2) az emlősök minden szövetében előfordul. Elnevezésüket az aktiválódásukhoz szükséges kalcium-ion koncentrációnak (μM -os vagy mM -os) megfelelően kapták (3). A kalpainok az élő szervezetben szabályzási és jelátviteli folyamatokban vesznek részt. (4). Működésük (5) vagy expressziójuk (6) gátlásával mind *in vivo*, mind *in vitro* modellekben sikerült különböző funkciójukat felderíteni. A számos fiziológias szerepükből következik, hogy működési rendellenességeik patológiás elváltozást okozhatnak. Több idegszövetet érintő elváltozásban feltételezik részvételüket, jól tanulmányozott például a neurodegeneratív elváltozásokban (7), úgymint szklerózis multiplexben, Parkinson- és Huntington-betegségben való szerep. Számos kutatási eredmény szerint a kalpainok kulcsszerepet játszhathatnak a rákos megbetegedések kialakulásában is (8). A kalpain enzimek több mint 100 természetes szubsztrátját azonosították, köztük membrán receptorokat, citoskeletális és strukturális fehérjéket és enzimeket (9). A kalpainok működésének felderítésében és esetleges terápiás célra történő felhasználása esetén fontos szerep jut a kellően specifikus és hatékony inhibitoroknak, ezért e vegyületek előállítása napjainkban is aktuális kutatási terület. A kalpain egyetlen, természetes és specifikus inhibitora a kalpasztatin fehérje (10), azonban mérete miatt vizsgálatokra csak korlátozottan alkalmazható, ezért nagyszámú kutatás folyik szintetikus előállított specifikus inhibitorok után. A jelenleg ismert inhibitorok legfőbb hátránya, hogy nem elég szelektívek más proteázokkal szemben.

A sejtpenetráló peptidek szakirodalma alapján kijelenthető, hogy e vegyületcsalád alkalmas hatóanyagok sejtbejuttatására. Megfigyelték, hogy a sejtpenetráló tulajdonság erős függést mutat a szekvenciában található pozitív töltést hordozó aminosavak számától. Ennek alapján tervezték meg az oligoarginineket (11). Az oligoargininek esetén a peptid effektív internalizációjához minimum 6 argininre van szükség, a lánc hosszának növelése a sejtpenetráló tulajdonság javulását eredményezi, azonban ez 8-9 aminosavnál hosszabb peptidek esetében már nem olyan jelentős (12).

2. Célkitűzések

Doktori munkám során célom olyan peptidmimetikum típusú inhibitorok tervezése, előállítása és izolált enzimekkel szembeni gátlóképességük vizsgálata volt, melyek a P_1 hasítási pozícióban reaktív csoportot tartalmaznak és mind a P_n , mind a P_n' helyeken tartalmaznak

aminosavakat. Az egyes pozíciókba az aminosavakat a preferencia mátrix adatai alapján kívántam kiválasztani (13). Terveztem továbbá olyan a kalpasztatin szekvenciáján alapuló inhibitorokat, melyek a P₂ és P₁' pozíciók közé építve GERDD vagy GKREV láncrészletet tartalmaznak. Ezek a részletek várhatóan hurok szerkezetet vesznek fel a peptid kötődésekor, így a kalpain hasítási helyével szemben elhelyezkedve meggátolják az enzimátikus hasítást.

1) Azaaminosavat tartalmazó kalpain inhibitorok esetén azaglicint (Agly) terveztem a P₁-es pozícióba építeni (pl.: *Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂*). Vizsgálni kívántam a P₃, P₂, P₁' és P₂' pozíciókban lévő aminosavak hatását a gátlóképességre.

2) Epoxid-gyűrűt tartalmazó peptid-származékok felépítése során a reaktív oxirán-gyűrűt epoxiszukcinil-csoportban terveztem beépíteni. Vizsgálni kívántam az epoxiborostyánkősav konfigurációjának hatását az enzimgátló képességre (*cisz*-, valamint D- és L-*transz*-származékok; (pl.: *NH₂-Thr→Pro→Leu→(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂* és *NH₂-Thr→Pro→Leu→(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂*),. Terveztem továbbá a hatékony epoxiszukcinil-inhibitorok sejtpenetráló peptiddel (oktaarginin) alkotott konjugátumainak (pl.: *H₂N-Thr→Pro→Leu→(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)₈-NH₂*) szintézisét és enzimgátló hatásának vizsgálatát. Az internalizációs képesség vizsgálata céljából fluoreszcensen jelölt konjugátumok előállítását is terveztem (pl.: *H₂N-Thr→Pro→Leu→(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)₈-Lys(Cf)-NH₂*) mely utóbbiak sejtbejutás mértékét áramlási citométerrel kívántam meghatározni.

3) Olyan vegyületek előállítását is terveztem, melyek a P₁ pozícióban található -CO-NH-peptidkötés helyett egy ketometilén-csoportot (-CO-CH₂-) tartalmaznak. E származék esetén vizsgálni kívántam a P_n pozíciókba kerülő, a preferencia-mátrix alapján kiválasztott aminosavak hatását a gátló képességre.

4) Kalpasztatin szekvenciáján alapuló inhibitorokat úgy terveztem felépíteni, hogy a szakirodalomban leírt, a kalpasztatinban található, az enzim aktív centrumánál elhelyezkedő inhibitor hatásért felelős hurkot (GKREV és GERDD szekvencia) a legjobb azapeptid inhibitorunkban található (*Ac-Thr-Ser-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂*) P₄-P₂ és P₁'-P₅' szegmensek közé illeszttem be. Emellett olyan származékok szintézisét is terveztem, melyek az N-terminálison lévő *Ac*-TSL szegmens megtartása mellett a C-terminálison a kalpasztatinban megtalálható TIPPEYR szegmenst tartalmazzák (pl.: *Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂* és *Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Thr-Ile-Pro-Pro-Glu-Tyr-Arg-NH₂*).

Valamennyi inhibitor gátló hatását először izolált μ - és m-kalpain enzimen, pozitív eredmény esetén katepszin B és L enzimeken kívántam jellemezni.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. Szilárd fázisú peptidszintézis

A tervezett peptidek és peptidszármazékok előállítását szilárd fázisú peptidszintézissel valósítottam meg. Az azapeptidek szintézisét Boc/Bzl technikával végeztem, míg a további inhibitorok peptid-részleteit Fmoc/^tBu technikával állítottam elő.

3.2. Fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (RP-HPLC)

Az előállított peptidek és peptid-származékok homogenitását analitikai RP-HPLC-val vizsgáltam Agilent Zorbax SB-C18 4.6mm x150mm, 100Å oszlopon, lineáris gradiens elúciót alkalmazva. Gradiens: 0 perc-0% B, 2 perc-0% B, 22 perc-90% B; eluensek: 0,1 V/V% TFA/H₂O (A); 0,1 V/V% TFA/80V/V% acetonitril/20 V/V% H₂O (B); Áramlási sebesség: 1ml/perc; $\lambda_{det}=220$ nm. A vegyületek tisztítása fordított fázisú szemipreparatív HPLC oszlopon történt. A tisztítások során alkalmazott gradiens elúciót is az analitikai RP-HPLC vizsgálatoknál használt eluensekkel állítottam elő. Az áramlási sebesség minden esetben 4 ml/perc, valamint a detektálást $\lambda_{det}=220$ nm-en végeztem.

3.3. Aminosav-analízis

14 előállított epoxiszukcinil-peptid származék aminosav összetételét aminosav analízis módszerével igazoltam. A peptidek hidrolízise 6 mol/dm³ koncentrációjú HCl-oldattal történt evakuált üveg ampullában 110°C-os hőmérsékleten, 24 órás reakcióidő alkalmazásával. A detektálásuk oszlop utáni ninhidrines származékképzéssel valósult meg.

3.4. Tömegspektrometria

Az előállított vegyületek kvalitatív jellemzését elektronspray ionizációs tömegspektrometriás analízissel végeztem. A spektrumokat pozitív üzemmódban, 50-2500 m/z tartományban vettem fel. A vizsgálni kívánt mintákat 0,1 térfogat % ecetsavat tartalmazó acetonitril-víz (50:50, V/V) elegyben oldottam.

3.5. Spektrofluorimetriás mérések

A peptid-származékok enzimgátló képességét spektrofluorimetriás módszerrel vizsgáltam, izolált m- és μ -kalpain, katepszin B és katepszin L- enzimeken. A méréseket 96 lyukú lemezen, 37 °C-on végeztem. Az m- és μ -kalpainnal végzett mérések kalpain-pufferben (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM), míg a katepszin B és L enzimekkel végzett vizsgálatok MES-pufferben (0,25 mM-os MES, pH=5) zajlottak.

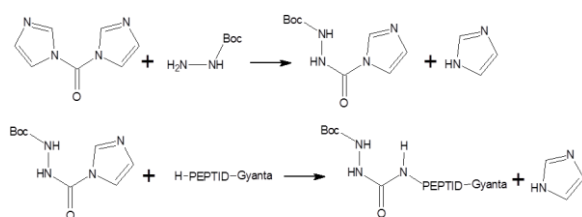
3.6. Enzimgátlás mértékének meghatározása

Az m- és μ -kalpainok esetén Suc-LY-Amc (Amc: 7-amino-4-metil-kumarin) míg a Katepszin B és L enzimekkel történő mérések során Z-Arg-Arg-Amc dipeptid szubsztrátot használtam. Az állandó koncentrációban alkalmazott enzim, szubsztrát és CaCl_2 (kalpain enzimeknél) mellett az inhibitorokat különböző koncentrációban alkalmaztam. A mérést az enzimoldat adagolásával indítottam és a fluoreszcencia intenzitást 1 percre rögzítettem. A reverzibilis gátlásnál (azapeptidek) a vegyületeket jellemző K_i értékek kiszámításához a Lineweaver-Burk ábrázolást (14) alkalmaztam. Az irreverzibilis gátlás esetén a K_i -t szakirodalmi analógia (15) alapján számítottam ki. Az adatok kiértékeléséhez mindkét esetben Origin 6.5 szoftvert használtam.

4. Eredmények és konklúziók

4.1. Azapeptidek

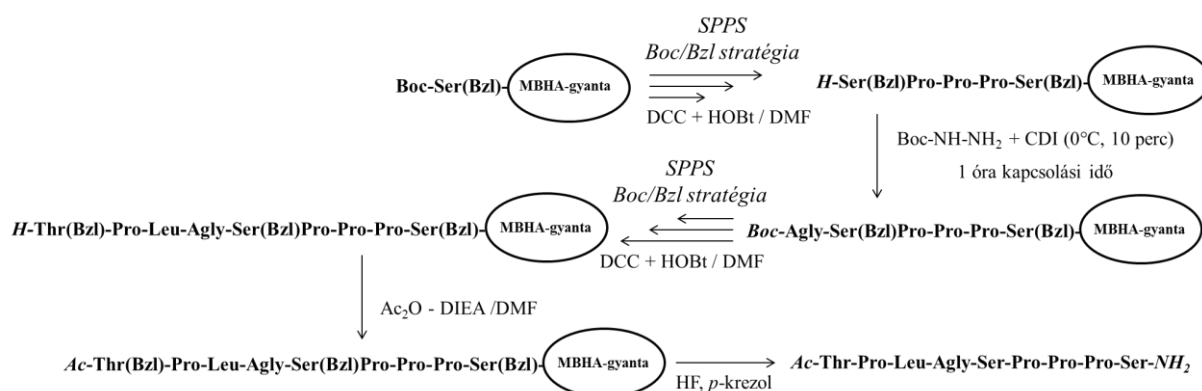
P_1 pozícióban azaglicint, P_3 , P_2 , P_1' és P_2' pozíciókban a preferencia mátrixban az első, második és harmadik legnagyobb preferencia értékkel rendelkező aminosavat tartalmazó azapeptid származékokat állítottam elő (1. táblázat).



1. Ábra

4.1.1. Az azapeptidek szintézise

Kilenc különböző azaglicint állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézissel, Boc/Bzl technika alkalmazásával (1. ábra). Az azaglicint a gyantán *in situ* kémiai reakcióval alakítottam ki (2. ábra).



2. Ábra

4.1.2. Az azapeptidek enzimgátló hatása

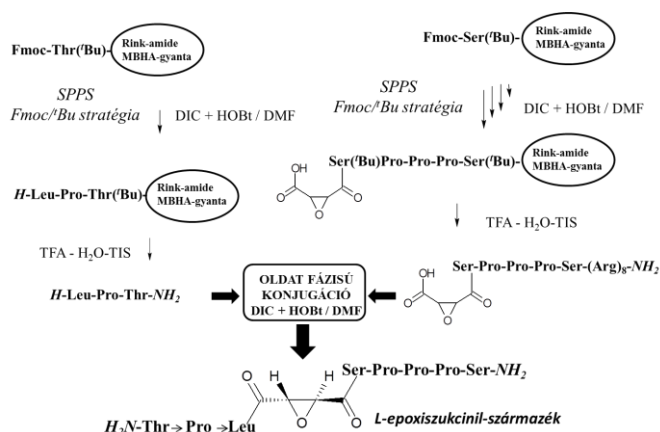
1. Táblázat

Azapeptidek		$K_i(\mu\text{M})$ m-kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ μ -kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ katepszin B
1	Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	8,7(0,1)	16,0(7,8)	57,0(8,5)
2	Ac-Thr-Trp-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	5,8(0,4)	3,9(1,9)	42,9(13,5)
3	Ac-Thr-Ser-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	3,5(0,1)	14,0(5,3)	69,9(20,5)
4	Ac-Thr-Pro-Thr-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért
5	Ac-Thr-Pro-Val-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért
6	Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért
7	Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért
8	Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Ser-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért
9	Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Gln-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>50	nem mért	nem mért

Az előállított azapeptidek gátló hatását izolált m-kalpain enzimen vizsgáltam (1. táblázat). A P₃ pozícióban a három legjobb preferenciával rendelkező aminosavat tartalmazó származékok (**1** /K_i(m-kalpain)=8,7 μM/, **2** /K_i(m-kalpain)=5,8 μM /, **3** /K_i(m-kalpain)=3,5 μM/ gátolták az enzim működését. Szelektivitásuk jellemzése céljából μ-kalpain és katepszin B enzimekre gyakorolt inhibitor hatásukat is vizsgáltam. Mindhárom vegyület a μ-kalpain jó inhibitora is (**1** /K_i(μ-kalpain)=16,0 μM/, **2** /K_i(μ-kalpain)=3,9 μM/, **3** /K_i(μ-kalpain)=14,0 μM/). Említett peptidszármazékok lényegesen gyengébb katepszin B inhibitorok (K_i =43-70 μM). A vizsgálat további módosításokkal kapott eredményekből látható, hogy míg a P₃ pozícióban történő módosítás nem jár a gátló hatás elvesztésével, bármely más pozícióban történő aminosav csere az inhibitor hatás elvesztését okozza. A hatékony kalpain inhibitoroként viselkedő azapeptidek szelektívek katepszin B enzimmel szemben.

4.2. Epoxiszukcinil-peptid származékok

4.2.1. Az epoxiszukcinil-peptid származékok előállítása



3. Ábra

Összesen 9 D- és 9 L-transz-epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó új peptidszármazékot állítottam elő. A reaktív csoportot a P₁ helyre építettem be, míg a P₃, P₂, P₁' és P₂' pozíciókban az első, második és harmadik legpreferáltabb aminosavakat tartalmazták. Fmoc/Bu technika alkalmazásával előállítottam a vegyületek epoxiszukcinil-pentapeptid és tripeptid-szegmenseit, majd ezek oldatfázisú kapcsolásával kialakítottam a P₁ pozícióban epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó peptidszármazékokat (3. ábra).

4.2.2. Az epoxiszukcinil-peptid származékok enzimgátló képessége

Az előállított epoxiszukcinil-peptid származékok enzimgátló hatását izolált m- és μ -kalpain enzimeken, illetve - szelektivitásuk vizsgálatára - katepszin B és L enzimeken mértem (2. táblázat).

2. Táblázat

Epoxiszukcinil-peptidek		$K_i(\mu\text{M})$ m-kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ μ -kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ katepszin B	$K_i(\mu\text{M})$ katepszin L
10	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	21,8(1,1)	2,95(0,6)	4,45(1,8)	2,3(1,9)
11	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Val}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	>50
12	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Ser}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	39,1(1,1)	>50	6,3(5,3)
13	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Thr}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	>50
14	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	3,4(2,7)
15	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	4,2(1,9)	>50	>50	10,9(9,1)
16	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	41,9(1,4)	>50	0,5(0,4)
17	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Gln-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	>50
18	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Ser-Ser-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	4,5(3,8)
19	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	4,05(2,1)	14,9(3,3)	6,63(2,1)	0,4(0,3)
20	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Val}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	29,2(5,0)	>50	>50	35,9(28,3)
21	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Ser}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	14,3(2,7)	21,9(1,3)	>50	7,0(4,5)
22	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Thr}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	>50
23	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	12,5(3,5)	>50	8,1(6,2)
24	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	8,38(0,1)	12,07(3,0)	1,3(0,8)
25	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	40,9(2,5)	23,7(7,3)	>50	1,59(1,2)
26	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Gln-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	13,7(11,5)
27	$\text{NH}_2\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Ser-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>50	>50	>50	5,4(2,8)
28	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	1,9(1,18)	3,6(3,1)	1,5(0,8)	>100
29	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	2,9(2,1)	2,2(1,8)	0,8(0,6)	0,3(0,2)
30	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Val}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Arg-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	5,6(2,6)	3,7(4,9)	56,9(7,7)	0,5(0,2)
31	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	2,4(1,9)	nem mért	>50	17,7(18,6)
32	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{cisz-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>100	>100	>100	>100
33	$\text{H}_2\text{N-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{cisz-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH}_2$	>100	>100	>100	>100

Az L-epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó származékok esetében a legpreferáltabb aminosavakat tartalmazó származék csak μ -kalpainra gyakorolt mérsékelt gátló hatást ($K_i(\mu\text{-kalpain})=12,5 \mu\text{M}$), m-kalpainnal szemben nem viselkedett inhibitorként. A P_3 módosítás gátló hatás javulást okoz, ami triptofán beépítésekor erőteljesebben tapasztalható: (**19** $K_i(\text{m-kalpain})=4,05$; $K_i(\mu\text{-kalpain})=14,9 \mu\text{M}$, míg **21** $K_i(\text{m-kalpain})=14,3$; $K_i(\mu\text{-kalpain})=21,9 \mu\text{M}$). P_2 aminosav csere során treonin alkalmazása esetén inhibitor hatás vesztés történik (**22**), azonban a P_2 valint tartalmazó L-epoxi vegyület (**20**) gyenge m-kalpain inhibitorként viselkedik. A P_1 módosítás szelektív μ -kalpain inhibitor létrejöttéhez vezet treonin beépítésével (**24** / $K_i(\mu\text{-kalpain})=8,38 \mu\text{M}$ /), azonban arginin jelenléte mérsékelt gátló hatás kialakulását eredményezi m-

és μ -kalpainra nézve egyaránt: (**25** vegyület esetén, $1/K_{i(m\text{-kalpain})}=40,9 \mu\text{M}$; $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=23,7 \mu\text{M}$). Bármilyen P_2' módosítás gátló hatás veszteséget okoz (**26, 27**).

A reaktív csoport konfigurációja inhibitor tulajdonságra gyakorolt hatásának vizsgálatára előállított D-epoxiszukcinil-peptid származékok közül a legpreferáltabb aminosavakat tartalmazó vegyület kalpain inhibitor hatást nem mutat (**10**). A P_3 pozícióban triptofánt tartalmazó származék az L-izomerhez hasonlóan m- és μ -kalpainra is inhibitor hatást fejtett ki (**11** $K_{i(m\text{-kalpain})}=21,8$; $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=2,95 \mu\text{M}$), míg szerin jelenléte ebben a pozícióban mérsékelt μ -kalpain gátló hatást eredményez (**12** $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=39,1 \mu\text{M}$). P_2 aminosav csere során treonin és valin alkalmazása esetén egyaránt inhibitor hatás veszteség történik (**11, 13**). A P_1' módosítás szelektív m-kalpain inhibitor létrejöttéhez vezet treonin beépítésével (**15** $K_{i(m\text{-kalpain})}=4,2 \mu\text{M}$), azonban arginin jelenléte gyenge μ -kalpain inhibitor létrejöttét eredményezi (**25** $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=41,9 \mu\text{M}$). Bármilyen P_2' módosítás gátló hatás veszteséget okoz (**17, 18**).

Az epoxiszukcinil-peptidek szelektivitását katepszin B és L-enzimeken jellemezve megállapítható, hogy az L-izomerek esetében a **19** és **24**, míg a D-analógok közül csupán a **10** vegyület fejt ki katepszin B gátló hatást. Az eredmények alapján ugyanakkor látható, hogy minden kalpain inhibitorként viselkedő epoxiszukcinil-peptid származék katepszin L inhibitorként is viselkedik.

Összességében az azeptideknél tapasztaltakkal részlegesen megegyező eredményeket kaptunk. Az azeptidekhez hasonlóan a P_3 módosítás itt is gátló hatás javulást okozott, míg a P_2 módosítás itt is inhibitor hatás veszteséget eredményezett. Azonos aminosav összetételű D- és L- epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó származékok eltérő gátló hatást fejtenek ki az m- és μ -kalpainra (pl.: **14** $K_{i(\mu\text{-kalpain})}>50 \mu\text{M}$ ellentétben: **23** $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=12,5 \mu\text{M}$) sőt megfigyelhető, hogy fordított izoforma szelektivitást mutatnak m- és μ -kalpainokra: **15** $K_{i(m\text{-kalpain})}=4,2 \mu\text{M}$; $K_{i(\mu\text{-kalpain})}>50 \mu\text{M}$, **24** $K_{i(m\text{-kalpain})}>50 \mu\text{M}$; $K_{i(\mu\text{-kalpain})}=8,4 \mu\text{M}$. Ellentétben az azeptidekkel a P_2 módosítás egy esetben nem okozott gátló hatás veszteséget, továbbá a P_1' módosítás gátló hatás javulást eredményezett.

Katepszin B és L enzimekkel szembeni szelektivitás egyszerre semelyik kalpain-gátlószerként viselkedő vegyület esetében sem tapasztalható. Megállapítható továbbá, hogy a P_3 pozícióba épített triptofán rontja a katepszin B-vel szembeni szelektivitást, illetve minden hatékony kalpain inhibitor hasonlóan hatékony katepszin L gátlószerként viselkedik.

Előbbi tapasztalatok alapján új, várhatóan hatékony inhibitor epoxiszukcinil-peptideket terveztem. Előállítottam P_3 pozícióban triptofánt és P_1' pozícióban treonint tartalmazó D- és L-epoxiszukcinil-peptid származékot (**28, 29**), valamint P_3 triptofán, P_2 valin és P_1' arginin kombinálásával tervezett L-epoxiszukcinil-peptidet (**30**). A **19** vegyület P_1' pozícióban glicint tartalmazó analógját is előállítottam annak vizsgálatára, hogy e módosítás a gátló hatás megtartottságát okozza-e. Ezt az információt a ketometilén peptidek tervezésénél használtam fel, mivel itt P_1' pozícióba glicin elhelyezését terveztem. A reaktív csoport konfigurációjának inhibitor tulajdonságra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából a két leghatékonyabb m-

kalpain inhibitorként viselkedő származék *cisz*-epoxiszukcinil-csoportot tartalmazó változatát állítottam elő (**32**, **33**).

A P₃ triptofán és P₁' treonin kombinálásával nyert D- és L-epoxiszukcinil-peptidek egyaránt hatékony kalpain inhibitorként viselkedtek (**28** K_{i(m-kalpain)}=1,9; K_{i(μ-kalpain)}=3,6 μM; **29** K_{i(m-kalpain)}=2,9; K_{i(μ-kalpain)}=2,2 μM). A P₃ triptofán, P₂ valin és P₁' arginin kombinációjával előállított L-epoxiszukcinil-peptid ugyancsak hatékony kalpain gátló szer, ahogy ez a P₁' helyen glicint tartalmazó származék m-kalpainra gyakorolt inhibitor tulajdonságával kapcsolatban is elmondható: (**30** K_{i(m-kalpain)}=5,6; K_{i(μ-kalpain)}=3,4 μM; **31** K_{i(m-kalpain)}=2,7). Végül az eredmények alapján látható, hogy az epoxiszukcinil-csoport *cisz*-konfigurációja minden esetben gátló hatás veszteséget okozott kalpainokra és katepszinokra egyaránt.

Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a két pozícióban egyszerre módosított származékok kalpain gátló hatása megtartott, azonban a tervezés alapjául szolgáló vegyületekre jellemző izoforma szelektivitás ez esetekben nem tapasztalható (**28**, **29**). E vegyületek ugyancsak nem szelektívek katepszin B-vel szemben, ami a P₃ pozíciójú triptofán előzőekben is megfigyelt hatására következhet be, azonban az egyik (**28**) vegyület esetében katepszin L-szelektivitás alakul ki. Az egyszerre három pozícióban történő aminosav módosítás (**30**) az alap vegyületeknél hatékonyabb kalpain gátló hatást eredményez, valamint a P₃ triptofán jelenléte ellenére katepszin B szelektivitás jelentkezik, ugyanakkor katepszin L szelektivitás nem tapasztalható. Megfigyelhető, hogy a **19** vegyület P₁' szerinjének glicinre történő cseréje az inhibitor hatás megtartottságát eredményezi. A *cisz*-epoxiszukcinil-csoport beépítése az inhibitor hatás veszteséget eredményez a vizsgált *cisz*-tein proteázok mindegyikével szemben.

4.3. Sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid származékok

Ahhoz, hogy az intracelluláris kalpainra kifejtett hatásukat vizsgálni lehessen, a hatékonyak bizonyuló epoxiszukcinil-peptid származékok oktaargininnel képzett sejtpenetráló konjugátumait állítottam elő.

4.3.1. A sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid konjugátumok előállítása

Az oktaarginin részletet a származékok C-terminálisára építettem be. A konjugátumok szintézise során az epoxiszukcinil-peptid származékok előállításánál alkalmazott stratégiát használtam azzal a különbséggel, hogy a vegyületek felépítését a C-terminális részen elhelyezkedő oktaarginin szegmens kialakításával kezdtem.

4.3.2. A sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid konjugátumok inhibitor hatása

3. Táblázat

Sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid származékok	$K_i(\mu\text{M})$ m- kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ μ - kalpain	$K_i(\mu\text{M})$ katepszin B	$K_i(\text{nM})$ katepszin L
42 $H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-NH}_2$	0,9(0,2)	0,7(0,5)	3,3(2,6)	3(1)
43 $H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-NH}_2$	1,0(0,5)	5,0(4,1)	11,1(4,6)	2(0,8)
44 $H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-NH}_2$	0,2(0,1)	0,6(0,6)	0,4(0,1)	3(0,5)
45 $H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-NH}_2$	>100	>100	>100	>100

Az előállított epoxiszukcinil-peptid konjugátumok enzimgátló hatását izolált m- és μ -kalpainon, illetve - szelektivitásuk vizsgálatára - katepszin B és L enzimeken vizsgáltam (3. táblázat). Megállapítható, hogy az oktaarginin jelenléte legalább egy nagyságrenddel javítja a kalpain inhibitor hatást, ugyanakkor az izoforma szelektivitást csökkenti. Egy származék (45) esetén nem mértem cisztein proteáz inhibitor hatást. A hatékony kalpain gátlószerként viselkedő konjugátumok mindegyike effektív katepszin B inhibitornak bizonyult. Még drasztikusabban változott a gátló hatás mértéke Katepszin L enzimen. Ezt az enzimet a konjugátumok két nagyságrenddel hatékonyabban gátolják a kalpainokhoz képest. Valószínűsíthető, hogy az oktaarginin szegmens növeli a kalpain és a katepszinek kötő felületéhez való affinitást (a katepszin L esetében radikálisan), ugyanakkor olyan kedvezőtlen térszerkezetet is eredményezhet, ami az inhibitor hatás elvesztést okozhatja.

4.4. Fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid származékok

A konjugátumok sejtbjutási képességének vizsgálata céljából előállítottam a két leghatékonyabb m-kalpain inhibitor hatással rendelkező epoxiszukcinil-peptid származék fluoreszcensen jelölt oktaarginin konjugátumát.

4.4.1. Fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid konjugátumok előállítása

A fluoreszcensen jelölt konjugátumok C-terminálisára egy lizin aminosavat építettem be. A jelölésre használt 5(6)-karboxifluoreszceint e lizin ϵ -aminocsoportjához kapcsoltam még a gyantán. Az így jelölt lizin beépítése után a szintézist az oktaarginin szegmens, majd az epoxiszukcinil-pentapeptid felépítésével folytattam. A peptidszármazékot a gyantáról hasítottam, majd a megfelelő tripeptiddel oldatfázisban konjugáltam.

4.4.2. Fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid konjugátumok internalizációjának vizsgálata

A fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló epoxiszukcinil-peptid konjugátumok internalizációs képességét HL-60 humán leukémia sejteken, áramlási citometriával vizsgáltuk. Az eredmények alapján elmondható, hogy mindkét konjugátum ($H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Trp}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{L-Eps})\text{-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-Lys(Cf)-NH}_2$, $H_2N\text{-Thr}\rightarrow\text{Pro}\rightarrow\text{Leu}\rightarrow(\text{D-Eps})\text{-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)}_8\text{-Lys(Cf)-NH}_2$) hatékony sejtbjutási képességgel rendelkezik. A sejtbjutás mértékét nagymértékben

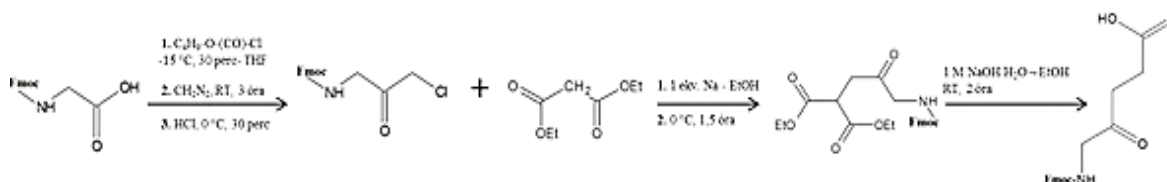
fokozta a triptofán P₃ pozícióban történő jelenléte a *H₂N-Thr→Trp→Leu→(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-(Arg)₈-Lys(Cf)-NH₂* konjugátumban.

4.5. Ketometilén-csoportot tartalmazó peptid származékok

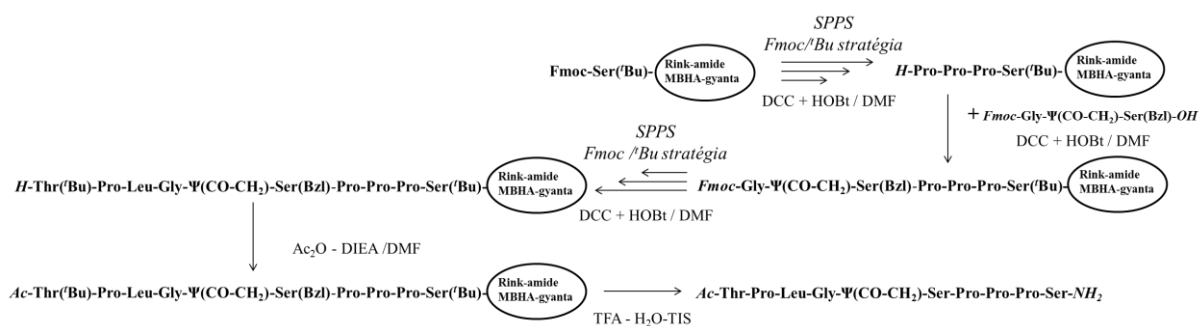
Olyan peptid származékokat állítottam elő melyek a P₁ pozícióban lévő aminosavat követő amid-kötés helyén ketometilén csoportot (-CO-CH₂-) tartalmaznak. A ketometilén-csoportot tartalmazó peptidszármazékok P₃ és P₂ pozícióiban az első, második és harmadik legpreferáltabb aminosavakat tartalmazták.

4.5.1. A ketometilén-csoportot tartalmazó peptid származékok előállítása

4 új ketometilén-csoportot tartalmazó peptid származékot állítottam elő. A peptidszármazékok szintézisét Fmoc/^tBu technikával valósítottam meg. A szintézis során a P₂' pozícióban lévő szerin után az általam előállított, a szintézis technikájával kompatibilis Fmoc-Gly-Ψ(CO-CH₂)-Gly-OH építő elemet kapcsoltam (4. ábra). Majd tovább folytattam a peptid felépítését a gyantán (5. ábra).



4. Ábra



5. Ábra

4.5.2. A ketometilén-csoportot tartalmazó peptid származékok inhibitor hatása

4. Táblázat

Pszedo-peptid-származékok		K _i (μM)	K _i (μM)
34	<i>Ac-Thr-Pro-Leu-Gly-Ψ(CO-CH₂)-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</i>	>100	>100
35	<i>Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Ψ(CO-CH₂)-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</i>	>100	>100
36	<i>Ac-Thr-Trp-Leu-Gly-Ψ(CO-CH₂)-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</i>	>100	>100
37	<i>Ac-Thr-Pro-Val-Gly-Ψ(CO-CH₂)-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</i>	>100	>100

Az előállított ketometilén-csoportot tartalmazó peptid származékok enzimgátló hatását izolált m- és μ -kalpainon vizsgáltam. A vizsgált származékok egyike sem fejtett ki inhibitor hatást a kalpainokkal szemben (4. táblázat). Valószínűsíthető, hogy a ketometilén-csoport jelenléte csökkenti a peptid származékok kalpain kötőhelyéhez való affinitását, például kedvezőtlen térszerkezet kialakításával.

4.6. A kalpasztatin szekvenciáján alapuló inhibitorok

4 új inhibitor peptidet állítottam elő, melyek felépítését a következő megfontolások alapján terveztem. A P₄P₂ helyzetbe a leghatékonyabb azapeptid inhibitorban található aminosavakat raktam (Ac-TSL). Míg a P₁' pozíciótól az azapeptidek és epoxiszukcinil-peptidek esetén sikerrel alkalmazott SPPPS részletet, vagy a kalpasztatinban található konzervált TIPPEYR részletet építettem ki. A két szakasz közzé illesztettem be szakirodalmi analógia alapján a GKREV vagy a GERDD pentapeptidet. E peptidszakaszok a kalpain aktív centrumával szemben elhelyezkedve hurok struktúrát vesznek fel, így gátolva meg az enzimátikus hasítást.

4.6.1. A kalpasztatin szekvenciáján alapuló peptidek előállítása

A kalpasztatin szekvenciáján alapuló inhibitor peptidek előállítását szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc/^tBu technika alkalmazásával valósítottam meg.

4.6.2. A kalpasztatin szekvenciáján alapuló peptidek inhibitor hatása

5. Táblázat

Kalpasztatin szekvenciáján alapuló peptidek		K _i (μ M)
38	Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100
39	Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Glu-Arg-Asp-Asp-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH ₂	>100
40	Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Thr-Ile-Pro-Pro-Glu-Tyr-Arg-NH ₂	>100
41	Ac-Thr-Ser-Leu-Gly-Glu-Arg-Asp-Asp-Thr-Ile-Pro-Pro-Glu-Tyr-Arg-NH ₂	>100

Az előállított kalpasztatin szerkezetén alapuló inhibitor peptidek enzimgátló hatását izolált μ -kalpainon vizsgáltam. A vizsgált vegyületek egyike sem fejtett ki inhibitor hatást a kalpainokkal szemben (5. táblázat). Valószínű, hogy az inhibitor hatás hiánya a megváltozott összetétel okán kialakult, kötőhelyhez történő megváltozott affinitás eredménye, ami a kötődésért felelős részletek nem megfelelő elhelyezkedéséből eredhet, vagy a megfelelő szekvencia részletek nem vettek fel hurok szerkezetet a peptidek kötődése során, így előidézhetik a kötődésért felelős részletek előbb feltételezett kedvezőtlen elhelyezkedését, illetve a peptidek a kalpain által hasíthatóvá válhatnak.

5. Összegzés

1. Doktori munkám során kilenc azapeptid származékot állítottam elő. Megállapítottam, hogy a P₃ módosítást tartalmazó 3 vegyület az m- és μ -kalpain hatékony inhibitorai. Bármely más pozícióban történő módosítás a gátló hatás elvesztését okozza. Az inhibitor hatású azapeptidek szelektivitást mutatnak katepszin B-vel szemben.

2. Előállítottam 9 új D- és 9 új L-epoxiszukcinil-peptid származékot, melyek közül 10 kalpain inhibitorként viselkedik és 3 kalpain izoforma szelektivitást mutat. A **23** és **24** vegyületek a μ -kalpain, míg **15** vegyület az m-kalpain gátolják szelektíven. A vegyületek szelektivitását katepszin B és L enzimekkel jellemeztem. A fenti tapasztalatokat felhasználva új, hatékonyabb inhibitornak bizonyuló epoxiszukcinil-peptid származékokat állítottam elő.

3. A hatékony epoxiszukcinil-peptid inhibitorok felhasználásával 4 új, oktaarginint tartalmazó sejtpenetráló konjugátumot állítottam elő. A konjugátumok nem csak megőrizték az epoxiszukcinil peptid származékok m- és μ -kalpain gátló képességét, hanem az oktaarginin jelenléte jelentősen növelte azt, kivéve a **45** konjugátumot, mely egyik enzimre sem fejtett ki gátló hatást. Ez a javulás a katepszinekkal szemben is fellépett, mely a velük szembeni szelektivitás jelentős romlását eredményezte. Valószínűleg az oktaarginin láncrészlet okozhatja a gátló hatás javulását, fokozva a konjugátumoknak az enzim kötő felületéhez való affinitását.

4. Hatékony kalpain inhibitornak bizonyult epoxiszukcinil-peptid származékok fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló oktaarginin konjugátumait állítottam elő az internalizációs képesség jellemzésére. Mindkét konjugátum hatékony internalizációs képességgel rendelkezik. Megfigyelhető, hogy a triptofán jelenléte a P₃ pozícióban jelentősen fokozza az internalizációs képességet.

5. Ketometilén-csoportot tartalmazó peptidszármazékokat terveztem és állítottam elő. A pszeuropeptidek m- és μ -kalpainra nem gyakorolnak gátló hatást. Ennek oka valószínűleg a ketometilén-csoport által kiváltott, az enzim kötő felületével szembeni affinitás csökkenése, amit előnytelen térszerkezet is okozhat.

6. Szakirodalmi analógia és az aza- illetve epoxiszukcinil-peptid származékok tapasztalatának ötvözésével kalpasztatin szekvenciáján alapuló inhibitor peptideket állítottam elő. Megállapítottam, hogy a vegyületek egyike sem rendelkezik kalpain inhibitor hatással. A peptidek valószínűleg alacsony affinitást mutatnak a kalpain kötő felületéhez, ami a kötődésért felelős szakaszok kedvezőtlen elhelyezkedéséből eredhet. Számolhatunk továbbá azzal a hatással is, hogy a GKREV illetve GERDD részletek nem vesznek fel a gátló hatás kialakulásához szükséges hurok szerkezetet, így a peptidek a kalpain által hasíthatók lehetnek, vagy okozhatják a kötődésért felelős részletek kedvezőtlen elhelyezkedését.

6. Irodalomjegyzék

1. Hiroyuki, S., Shoichi I., Koichi S. (1997) *Biochem. J.* **328**, 721-732.
2. Ravulapalli, R. (2009) Ph.D. Thesis, Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Canada 622.
3. Mellgren, S. I. (1980) *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **100**, 1355-1356.
4. Dutt, P., Arthur, J. S., Croall, D. E., Elce, J. S. (1998) *FEBS Lett.* **436**, 367-371.
5. Kwak, K. B., Kambayashi, J. I., Kang, M. S., Ha, D.B., Chung, C. H. (1993) *FEBS Lett.* **323**, 151-154.
6. Arthur, J. S. C., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K., Greer, P. A. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4474-4481.

7. Liu, J., Liu, M. C., Wang, K. K. (2008) *Sci. Signal.* **1**(14), re1.
8. Leloup, L., Wells, A. (2011) *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 309–323.
9. Wang, K. K., Villalobo, A., Roufogalis, B. D. (1989) *Biochem. J.* **262**, 693–706.
10. Mellgren, R. L., Carr, T. C. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 779–786.
11. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840.
12. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., Rothbard, J. B. (2000) *J. Pept. Res.* **56**, 318–325.
13. Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, Á., Farkas, A., Szilágyi, A., Bánóczy, Z., Hudecz, F., Friedrich, P. (2004) *O J. Biol. Chem.* **279**, 20775-20785.
14. Lineweaver, H., Burk, D. (1934) *Journal of the American Chemical Society.* **56** (3), 658–666.
15. Morrison, J. F. (1982) *Trends in biochem. sci.* **7** (3), 102-105.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények listája

- s1. Banóczy, Z., Tantos, A., Farkas, A., Majer, Zs., Dókus, E. L., Tompa, P., Hudecz, F. (2013) New calpain substrate-based azapeptide inhibitors. *J. Pept. Sci.* **19**, 370-376.
- s2. Dókus, E. L., Menyhárd, K. D., Tantos, Á., Hudecz, F., Bánóczy, Z. (2014) Probing of primed and unprimed sites of calpains: design, synthesis and evaluation of epoxysuccinyl-peptide derivatives as selective inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **82**, 274-280.

A dolgozat témájában megjelent további publikációk jegyzéke

1. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Hudecz, F. Modulation and analysis of intracellular calpain activity by peptide conjugates. In: *Peptide Science 2010*, Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium, (Ed.: Fujii, N., Kiso, Y.), The Japanese Peptide Society, 2011, 39-39.
2. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Farkas, A., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. Novel calpain inhibitors. In: *Peptides 2010*, Proceedings of 31st European Peptide Symposium, (Eds.: Lebl, M., Meldal, M., Jensen, K.J., Hoeg-Jensen, T.), European Peptide Society, 2010, 606-607.
3. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Tőke, O., Majer, Zs., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. Azapeptide and epoxysuccinyl-peptide analogues as new calpain inhibitors. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, Hungary, 31 August-3 September, 2011
4. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Farkas, A., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. Novel calpain inhibitors. 31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark 5-9 September, 2010
5. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Majer, Zs., Tőke, O., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. Új kalpain inhibitorok: aktivitás és szerkezet. MKE 1. Nemzeti Konferencia Sopron, 2011.május 22-25.
6. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. Azapeptide calpain inhibitors. In: Kokotos G, Constantinou-Kokotou V, Matsoukas J (szerk.) *Peptides 2012: Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium* Athen: University of Athens, Laboratory of Organic Chemistry, 2012. pp. 100-101 (ISBN:978-960-466-121-3)
7. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, A., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F. New azapeptide calpain inhibitors *J. Pept. Sci.* **18**:(S1) p. S47. (2012)
8. Dókus, E. L., Tantos, Á., Bánóczy, Z., Hudecz, F. Epoxysuccinyl based calpain inhibitors: Structure and activity In: 5th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Abstract Book p. 101 Barcelona, Spain, 10-12 June, 2013.
9. Dókus, E. L., Tantos, A., Szabo, I., Hudecz, F., Banóczy, Z. (2014) Cell-Penetrating Conjugates of Calpain Inhibitor Peptide Derivatives With Epoxysuccinyl Moiety. *J. Pept. Sci.* **20**(1) , S164.
10. Bánóczy, Z., Dókus, E. L., Tantos, Á., Hudecz, F. Giancarlo Morelli, Paolo Grieco, Michele saviano (szerk.) *Cell-penetrating conjugates of calpain inhibitors*, Edizioni Ziino, 2014. 14th Naples Workshop on Bioactive Peptides, Naples, Italy, 12-14 June, 2014.
11. Dókus, E. L., Tantos, Á., Szabó, I., Hudecz, F., Bánóczy, Z. Cell-penetrating conjugates of calpain inhibitor peptide derivatives with epoxysuccinyl moiety In: Naydenova E, Pajpanova T, Danalev D (szerk.) *Peptides 2014: Proceedings of the Thirty-Third European Peptide Symposium*. Sofia: Bulgarian Peptide Society, 2015. pp. 132-133.