

BÁNÓCZI ZOLTÁN

# Enzimgátló peptidek mint gyógyszermolekulák

Az enzimek szervezetünk motorjai. A táplálék felvételétől az energia-termelésen át a szervezetet alkotó több ezer molekulaféleség felépítéséig mindenhol szerepet játszanak. Ezért nagyon fontos, hogy működésük a lehető legjobban szabályozva legyen. Ha az enzimek működésében zavar támad, akkor kóros folyamatokat, elváltozásokat okozhatnak.

A proteázok az enzimek azon családját alkotják, melyek más fehérjéket hasítanak, tehát a fehérjék gerincének kialakításában szerepet játszó peptidkötés hidrolízisét katalizálják. Egyes tagjaik szerepe a táplálékfelvétele során az abban található fehérjék építőelemekig – aminosavakig – történő lebontása (pl. tripszin, kimotripszin), míg mások csak korlátozott helyen hasítják el szubsztrát-fehérjéiket, és csak azokat, így szabályozva azok működését. A proteázokat – aszerint, hogy az aktív centrumban milyen aminosav oldallánca vesz részt a peptid-kötés hidrolízisében – szerin-, cisztein- és treoninproteázokra osztjuk.

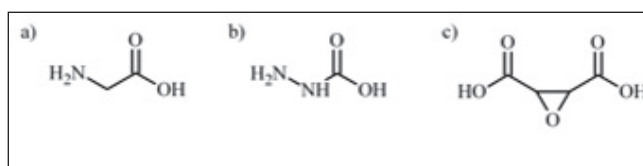
A kalpainok intracelluláris – sejtben belül található – cisztein-proteázok, melyek működéséhez  $\text{Ca}^{2+}$ -ion szükséges. A családnak jelenleg 15 tagját ismerjük emlőskben. A két legrégebben ismert és valamennyi szövetben megtalálható enzim az  $m$ - és  $\mu$ -kalpain. A két enzim nevét az aktiválódásukhoz szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -ion-koncentrációról kapta. Az enzimes család többi tagja csak bizonyos szövetekben jelenik meg. A sejtben bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$ -ionkoncentráció növekedése aktiválja a kalpainokat. A  $\text{Ca}^{2+}$  enzimhez kötődés olyan szerkezeti változást indukál az enzimen, mely hatására az addig egymástól távol lévő és a katalízisben szerepet játszó aminosavak térben megfelelő közelségbe kerülnek. Ugyanis az enzim működéséhez a katalitikus triádnak (három aminosav: cisztein, hisztidin, aszparagin) a megfelelő helyzetben kell lenni, hogy az enzim működőképes legyen. Az aktivált enzim ezután a szubsztrátfehérjéket csak meghatározott helyen hasítja el, ezáltal beindítva vagy gátolva azok működését. E

szabályozási funkción keresztül számos fiziológiás folyamatban játszanak szerepet, pl. sejtmozgás, sejtosztódás és differenciálódás, apoptózis (irányított sejthalál) [1]. Ha a kalpain működésének szabályozása felborul, akkor a fokozott vagy csökkent kalpainaktivitás betegségek kialakulásához vezethet. A túlaktiválódott kalpain több fehérjét hasít el, fokozva azok működését, és így többek között szerepet játszik neurodegeneratív betegségekben, mint az Alzheimer-, a Huntington-kór, de ez áll a háttérben a traumás agy- és gerincvelő-sérülés hatására bekövetkező idegsejtpusztulásnak is [2,3].

A kalpain-enzimmel kapcsolatban számos kutatás irányul egyre hatékonyabb és szelektívebb inhibitorok (gátló anyagok) előállítására [4]. Annál hatékonyabb egy inhibitor, minél kisebb koncentrációban képes gátolni az enzim működését. Mivel számos hasonló enzim található a szervezetben más-más szubsztrátfehérjével és szabályozási funkciókkal, ezért fontos, hogy az inhibitor csak a megcélzott enzimet gátolja és nem vagy alig legyen hatása más enzimekre, azaz szelektív legyen. A kalpainok szabályozására a természet kifejlesztette a saját, nagyon szelektív és hatékony inhibitorát, a kalpasztatin fehérjét. Sajnos, méretéből adódóan ez a peptid nem alkalmazható mint külső inhibitor.

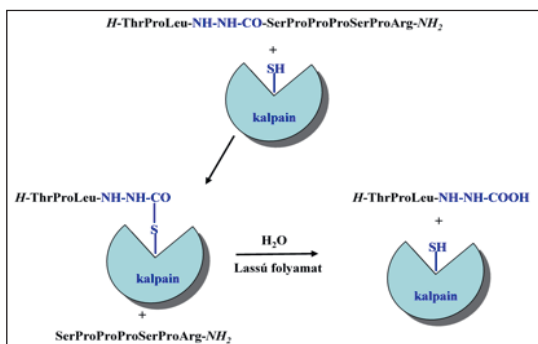
A kalpain-inhibitorok felhasználhatóak a kalpain-enzim funkciójának vizsgálatában. Ha szelektíven gátoljuk az enzim működését, akkor megállapíthatjuk, hogy részt vesz-e valamely biológiai folyamatban, vagy az adott folyamatban milyen szerepe van. Ezáltal jobban megérthetjük a sejtek életében betöltött szerepét. Ezen vizsgálatok mellett az inhibitorok kiindulópontjai lehetnek olyan gyógyszermolekulák kifejlesztésének, melyek kalpain-túlaktiválódás okozta betegségek kezelésében használható-

ak. Az OTKA által támogatott kutatásunk során egy újfajta megközelítés alkalmazásával kívántunk minél hatékonyabb és szelektívebb kalpain-inhibitorokat előállítani. Az általunk korábban felállított preferencia mátrix felhasználásával terveztük meg az inhibitor-molekulákat [5]. Ez a mátrix a szubsztrátok  $\text{P}_4\text{-P}_7$  helyeinek aminosav-preferenciáját adja meg egy-egy pontszámmal. Számos kalpainhasítási hely aminosav-összetételét vizsgálva kaptuk ezeket a preferencia-értékeket. Az enzim a  $\text{P}_1\text{-P}_1$  helyen lévő aminosavak között hasítja el a peptidkötést. Az enzim felületén található egy aktív centrum számos kötőhellyel, melyekbe a szubsztrát-fehérjék egymást követő aminosavai bekötődnek. Ezeket a kötőhelyeket jelöljük  $\text{S}_n$  és  $\text{S}'_n$  módon, míg a kötőhelynek megfelelő pozíciót a szekvenciában  $\text{P}_n$  és  $\text{P}'_n$ . Minél nagyobb a mátrixban kapott pontszám, annál kedvezőbb az aminosav az adott helyen, azaz annál gyakrabban fordul ott elő. A legnagyobb pontszámú aminosavak a  $\text{T}^1\text{PLKSPPPSPR}^{11}$  szekvenciájú szubsztrát-peptidet eredményezték. Egy jó szubsztrát-peptid szelektíven és erősen képes az enzimhez kötődni, ahol megtörténik a peptidkötés hasítása. Ezután a szubsztrátból képződött két kisebb peptid elhagyja az enzim felszínét, átadva a helyet a következő ha-



1. ábra. a) glicin, b) azaglicin, c) epoxiborostyánkősav

sítandó molekulának. A megközelítésünk az volt, hogy használjuk fel a szubsztrát-molekulát az ideális kölcsönhatás kialakításához, de módosítsuk úgy, hogy az eredetileg szubsztrát-molekula gátolja az enzim működését. Ehhez olyan módosítást – azaglicin (Agly), epoxiszukcinilcsoport (Eps) (1. ábra) – terveztünk beépíteni a  $\text{P}_1$  pozícióban található lizin (Lys) helyett, mely erős, de felbontható



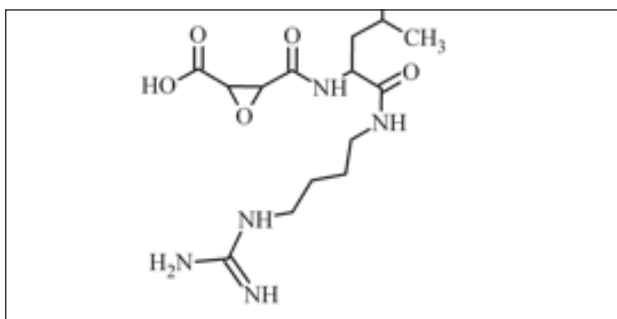
2. ábra. Azapeptid enzimgátlásának mechanizmusa

(reverzibilis gátlás) vagy felbonthatatlan (irreverzibilis gátlás) kötést alakít ki az enzim aktív centrumában található cisztein tiol (-SH) csoportjával, és megengedi, hogy mind a P mind a P' helyeken lévő aminosavakat beépíthessük az inhibitor-molekulánkba. Reverzibilis gátlás esetén az inhibitor-molekula egy idő után leválik az enzimről és az újra aktív lesz, míg irreverzibilis gátlás esetén ez nem történik meg és az enzim véglegesen elveszti működőképességét.

Ha egy azaaminosavat építünk be a szekvenciába, akkor a szénatom nitrogénatomra cserélése olyan változásokat eredményez mind az elektroneloszlásban, mind a térszerkezetben, hogy az eredetileg szubsztrát-peptid gátolni fogja (reverzibilisen) az enzimet (2. ábra).

Az azaaminosav oldalláncának térállása eltérhet a természetes aminosav térállásától, ami gátolhatja a molekula enzimhez kötődését. Ezt elkerülendő, első lépésben azaglicin beépítését terveztük a molekulákba, melynek nincs oldallánca [6]. Még egy előnyös tulajdonsága van ennek a származékknak, hogy egyszerűen kialakítható a peptidláncban. Az azaglicintartalmú azapeptideket szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő. Ekkor a növekvő peptidlánc egy szilárd hordozóhoz (gyanta) van kötve és az aminosavakat egyesével, lépésenként építjük be a peptidláncba. Az azaglicin kialakítása is a gyantához kötött peptiden történik. A felépített peptidet savval reagáltatva tudjuk lehasítani a gyantáról. A szubsztrát-peptidből kiindulva láncrövidítés és aminosav-szubsztitúció alkalmazásával 16 azapeptidet állítottunk elő. A peptidlánc hosszának változtatásával megtalálhatjuk a legrövidebb, még hatékony inhibitor-molekulát, míg az egyes aminosavak változtatásával felderíthetjük az aminosavak hatásban betöltött szerepét és maximalizálhatjuk molekulánk gátló ké-

építünk be a láncba. Illetve rámutattak arra, hogy a lizin-oldallánc hiánya nem rontja a peptid-származék kötődését az enzimhez. Ugyanis a szubsztrát kötődésénél erősebben képes kötődni az inhibitor-molekula az enzim aktív helyéhez. Ha a láncosszta a C-terminális felől két aminosavval rövidítettük (Ac-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>), akkor a hatás megmaradt, azonban a lánc további rövidítése a gátló képesség elvesztésével járt. Ezen rövidített inhibitorból kiindulva vizsgáltuk az N-terminális felől történő rövidítés hatását is. Már egy aminosav elhagyása a gátló hatás megszűnését eredményezte (Ac-Pro-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>). Az optimális kilenc aminosavból álló molekulában vizsgáltuk egyes aminosavak cseréjének hatását. Az újonnan beépített aminosavak a preferencia mátrixban a 2. és 3. legnagyobb pontot kapták. A leucin (Leu) cseréje a hatás elvesztésével járt, vagyis ez az aminosav fontos szerepet játszik az enzimhez kötődésben. A 2-es helyzetű prolin (Pro) cseréje

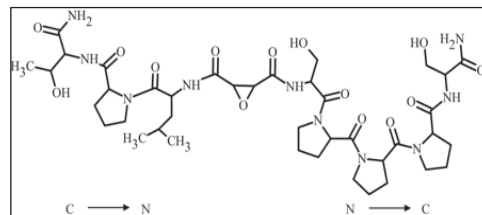


3. ábra. Cisztein proteáz szelektív E-64 inhibitor szerkezete

szerepre (Ser) és triptofánra (Trp) a gátló képesség javulásával járt. Ezen pozíció tehát sokkal megengedőbb az aminosav-oldalláncot illetően, hiszen három teljesen eltérő karakterű aminosavval (apoláris, poláris, aromás) is gátló ha-

tást kaptunk. Ha azonban az 5-ös Ser-t és a 6-os Pro-t cseréltük ki, a molekula elvesztette kalpaingátló képességét. Egy inhibitor szelektivitása fontos mind a Cys-proteázok családján belül, mind a kalpain-enzimek között. Az általunk vizsgált m-kalpain-inhibitorok szelektivitását vizsgáltuk katepszin B enzimén, ami szintén egy Cys-proteáz és  $\mu$ -kalpainon is. Az H-Thr-Pro-Leu-Agly-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-Pro-Arg-NH<sub>2</sub> azapeptid szelektívnek bizonyult m-kalpainra.

Mivel az egyes aminosavak jelentősen hatottak az enzimgátlásra, megvizsgáltuk, hogy ez kapcsolatba hozható-e az inhibitor-molekulák oldatban felvett térszerkezeteikkel, vagy csak az enzim felszínéhez kötődés során/altal jelentkezik a különbségek hatása. Vizsgáltuk a natív szekvenciának és gátló hatással nem rendelkező származékoknak a másodlagos szerkezetét különböző hőmérsékleten, vízben és trifluoretanolban (TFE) elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópiával. A spektrumok



4. ábra. Az TPL-Eps-SPPPS inhibitor szerkezete

nem mutattak lényeges különbséget a szubsztrát-peptid és az azapeptidek térszerkezetében sem vízben, sem a rendezett struktúrákat indukáló TFE-ben. Egyik esetben sem jelent meg kitértetett rendezett szerkezet, csak néhány konformáció egyensúlyi állapot volt kimutatható (rendezetlen, PPII és  $\beta$ -kanyar). Szintén erre az eredményre jutottunk a gátló és nem gátló vegyületek spektrumainak összehasonlítása során is. Azt megállapíthattuk, hogy az azaglicin beépítésének nincs hatása az eredeti szubsztrát-szekvencia másodlagos szerkezetére.

Ha a lizin helyett nem azaaminosavat építünk be a molekulánkba, hanem epoxiborostyánkősavat (1.c ábra), akkor nem reverzibilis, hanem irreverzibilis inhibitorokat kapunk. A természetben található E-64 inhibitor (3. ábra) transz-epoxiborostyánkősavat tartalmaz, ezért ennek két izomerjé (L és D) építettük be a molekulánkba. Az E-64 inhibitor-specifikus Cys-proteáz gátló hatással rendelkezik, de az enzimesaládon be-

lül nem mutat szelektivitást egyik tag felé sem. Összesen 18 inhibitor-molekulát állítottunk elő és vizsgáltunk [7].

Az új inhibitorokban az azapeptidek szekvenciáját megtartottuk és csak két változtatás történt (4. ábra). Az azaglicin epoxiszukcinil-csoportra cseréltük és a P<sub>4</sub>-P<sub>2</sub> pozíciókban lévő aminosavak kapcsolódási sorrendje a N-C irányról megfordult C-N irányra.

Az új inhibitorok m-kalpain gátló hatása nem minden esetben egyezett az azapeptideknél kapott eredményekkel. Például az eredeti szekvenciának megfelelő inhibitor (NH<sub>2</sub>-Thr-Pro-Leu-(L/D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> sem L- sem D-transz-epoxiszukcinil csoporttal nem mutatott jelentős gátló hatást m-kalpain enzimen. Azonban az L-transz-epoxiszukcinil csoportot tartalmazó származék a μ-kalpaint szelektíven gátolta. Sikerült két olyan származékot is előállítanunk mely hatékonyan gátolta az m-kalpaint, NH<sub>2</sub>-Thr-Pro-Leu-(D-Eps)-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> és NH<sub>2</sub>-Thr-Trp-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-

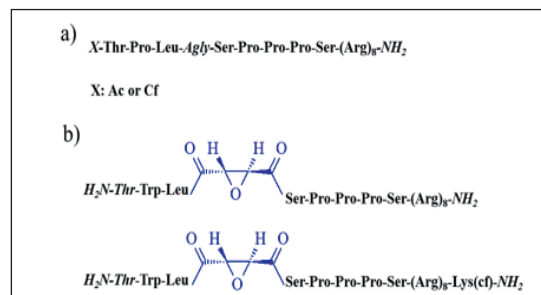
tül jussanak be a sejtekbe, fontos, hogy megvalósítsuk, fokozzuk ezen inhibitor-molekulák sejtek általi felvételét. A bejutás fokozására olyan konjugátumaik előállítását tűztük ki célul, melyek oktaarginint mint sejtpenetráló peptidet tartalmaznak. A sejtpenetráló peptidek olyan rövid, 15–20 aminosavból álló peptidek, melyek képesek átjutni a sejtmembránon és a hozzájuk kovalensen kötött molekulákat is magukkal vinni [9]. Az oktaarginint sikeresen alkalmaztuk a már bemutatott kalpainszubsztrát-molekula sejtbemutatására [10]. A sejtpenetrabilis konjugátumok az inhibitor-molekula az N-terminális végén, míg a sejtpenetráló peptid a C-terminális végén volt (5. ábra). Először azt vizsgáltuk, meg, hogy az oktaarginin beépítése a molekulába hogyan befolyásolta az enzimgátló képességet. Méréseink azt mutatták, hogy a konjugáció nem rontotta, néhány esetben még fokozta is a gátló hatást. A másik fontos kérdés megválaszolásához, azaz, hogy a konjugátumok tényleg képesek-e be-

mutató inhibitorok kiindulási pontja lehet olyan gyógyszer-molekulák kifejlesztésének, melyek sikeresen alkalmazhatók a kalpain túlműködés okozta káros folyamatok csökkentésére vagy megelőzésére. Azaz olyan, ma már egyre szélesebb tömegeket érintő betegségek gyógyításában jelenthetnek kezelési lehetőséget mint az Alzheimer-, a Huntington-kór. Szintén fontos szerepet kaphatnak a különböző kalpain-funkció vizsgálatokban, hogy teljesebb képet kapjunk ezen enzimek szervezetben betöltött szerepéről. \*

*Az itt bemutatott eredmények az OTKA K 104385 és PD-83923 számú pályázatának támogatásával végzett kutatásból születtek. Szintén segítette a kutatást a Bolyai János Kutatói Ösztöndíj is.*

**Irodalom**

[1]. Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol* 2007; 8: 218.  
 [2]. Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 355–362.  
 [3]. Saez EM, Ramirez-Lorca R, Moron JF, Ruiz A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discov. Today* 2006; 11: 917–923.  
 [4]. Donkor OI. Calpain inhibitors: a survey of compounds reported in the patent and scientific literature. *Expert Opin. Ther. Patents* 2011; 21: 601–636.  
 [5]. Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, Hudecz F, Friedrich P. On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 20775–20785.  
 [6]. Bánóczy Z, Tantos Á, Farkas A, Majer Zs, Dókus EL, Tompa P, Hudecz F. New m-calpain substrate-based azapeptide inhibitors. *J. Pept. Sci.* 2013; 19: 370–376.  
 [7]. Dókus LE, Menyhárd DK, Tantos A, Hudecz F, Bánóczy Z. Probing of primed and unprimed sites of calpains: Design, synthesis and evaluation of epoxysuccinyl-peptide derivatives as selective inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014; 82: 274–280.  
 [8]. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 2008; 456: 409–412.  
 [9]. Hudecz F, Bánóczy Z, Csik G Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. *Med. Res. Rev.* 2005; 25: 679–736.  
 [10]. Bánóczy Z, Alexa A, Farkas A, Friedrich P, Hudecz F Novel cell-penetrating calpain substrate. *Bioconjugate Chem.* 2008; 19: 1375–1381.



**5. ábra. Sejtpenetráló konjugátumok felépítése. a) azapeptid inhibitorok, b) epoxiszukcinilpeptid inhibitorok**

NH<sub>2</sub>. Az első származék ráadásul szelektívnek is bizonyult, sem a μ-kalpaint sem a katepszin B-t nem gátolta.

Hogy jobban megértsük a gátló hatások közötti különbségeket molekulamodellézést végeztünk az egyik hatékony m-kalpain inhibitor (NH<sub>2</sub>-Thr-Trp-Leu-(L-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>) és annak kevésbé hatékony analógjával NH<sub>2</sub>-Thr-Trp-Leu-(D-Eps)-Ser-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>). A két inhibitor molekulát az m-kalpain [8] aktív centrumába illesztettük. Az L-Eps-csoportot tartalmazó vegyület legkedvezőbb illeszkedése az aktív centrumba a várt módon történt. Ezzel szemben a D-Eps-csoportot tartalmazó vegyület kedvezőbb illeszkedése a várt móddal ellentétesen valósult meg.

Mind az azapeptidek, mind az epoxiszukcinil-peptidek nagy méretűek ahhoz, hogy a sejtek membránján szabadon átjussanak. Mivel receptorok sem állnak rendelkezésre, hogy rajtuk kereszt-

növekedett sejtbemutatást mutatott a szabad inhibitor-molekulákhoz képest. Az azapeptidek konjugátumainak sejtek általi felvétele azonos volt. Ezzel szemben a két vizsgált epoxiszukcinil-származék konjugátumának különböző mértékben jutott be a sejtekbe.

Munkánk eredményeként sikeresen előállítottunk reverzibilis és irreverzibilis kalpain-inhibitorokat, melyek között vannak izoforma- (m- vagy μ-kalpain) szelektív és kalpain-szelektivitást mutató molekulák is. A kapott inhibitorok szerkezet-hatás összefüggése azt mutatja, hogy sikeresen lehet módosítani peptid-szubsztrát molekulát azaminosavval vagy epoxiszukcinil-csoporttal annak érdekében, hogy inhibitor-molekulát kapjunk. Azonban a különböző típusú molekulacsaldán más-más összefüggést mutatott az egyes aminosavak szerepével kapcsolatban. Az általunk előállított hatásos és szelektivitást