

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Tereza Halamová

*Příprava nového analogu insulinu za účelem studia interakce
hormonu s izoformami receptoru insulinu*

*Preparation of a new insulin analog in order to study the
interaction of the hormone with insulin receptor isoforms*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Konzultant: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci sepsala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. a všechny informační zdroje a literaturu jsem řádně citovala. Tato práce, ani její podstatná část nebyly předloženy k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Kedrové za velkou trpělivost a pomoc v experimentální části práce, zejména při manuální syntéze a enzymové semisyntéze. Mé poděkování patří také odborné konzultantce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za její ochotu a vstřícnost, stejně jako celé skupině Dr. Jiráčka na ÚOCHB AV ČR za všestrannou pomoc a přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu při studiu.

Abstrakt

Insulin působí jako klíčový hormon v udržování stálé hladiny glukózy v krvi. Mimo tuto metabolickou funkci má navíc insulin funkci růstového hormonu. Rozdílnost v jeho působení je založena především na interakci se dvěma existujícími izoformami insulinového receptoru - IR-A a IR-B, které jsou různě zastoupeny v lidském těle. Předpokládá se, že IR-A je zodpovědný především za mitogenní funkci, a nachází se v hlavně mozku, lymfatické či plodové a rakovinné tkáni, kdežto IR-B, jehož hlavním místem je jaterní, tuková a svalová tkáň, má spíše funkci metabolickou. V poslední době je cílem vytvořit takový insulinový analog, který by se preferenčně vázal na IR-B a tak lépe kopíroval fyziologickou metabolickou funkci insulinu potřebnou pro pacienty s diabetem. Na základě nedávno vyřešené 3D struktury vazby insulinu na IR bylo zjištěno, že C-konec řetězce B podléhá při vazbě na IR konformační změně, kdy dojde k ohybu konce tohoto řetězce asi o 90°.

Cílem této bakalářské práce byla příprava a charakterizace dvou insulinových analogů s přemostěním C-konce B-řetězce v místech B26-B29 a B27-B29 pomocí disulfidického můstku, který by ohnutou strukturu konce řetězce zafixoval a umožnil zvýšit afinitu IR a specifitu vůči IR-B. Příprava byla provedena pomocí syntézy na pevné fázi, cyklizace a následné enzymové semisyntézy s využitím trypsinu. Vazebnými testy k IR-A a IR-B byly následně určeny vazebné afinity jednotlivých analogů vůči lidskému insulinu a jejich disociační konstanty. Oba analogy byly připraveny úspěšně, i když v nízkých výtěžcích. Tyto výtěžky však stačily k následnému vazebnému testování. Ze získaných hodnot lze říci, že v obou případech došlo ke zvýšení specifity vůči IR-B oproti lidskému insulinu. Afinita k jednotlivým izoformám byla však znatelně snížena. Výsledky této práce prezentují dva úspěšně připravené analogy se čtvrtým dodatečným disulfidickým můstkem. Získané poznatky lze využít k přípravě dalších analogů s dodatečným disulfidickým můstkem a s vlastnostmi vhodnými pro farmaceutické využití při léčbě diabetu.

Klíčová slova: insulin, analog, insulinový receptor, disulfidický můstek, syntéza na pevné fázi, enzymová semisyntéza

Abstract

Insulin acts as a key hormone in the blood glucose levels maintaining mechanisms. Outside this metabolic function it also has a growth hormone functionality. The interaction of insulin with the two existing insulin receptor isoforms - IR-A and IR-B, which are variously represented in the human body is determining insulin. IR-A, supposed to be mainly responsible for the mitogenic function of insulin, is located in the brain or lymphatic cancer and fetal tissue, whereas IR-B, performing metabolic function is located in adipose and muscle tissue. Present aim is to design such insulin analogs that would preferentially bind to IR-B, and could thus more efficiently carry out physiological metabolic function of insulin necessary for patients with diabetes. Based on the recently solved 3D structure of insulin bound to IR, it was found that the C-terminus of the B-chain of insulin must undergo conformational change bending it in about 90°, for efficient binding to IR.

The aim of this thesis was the preparation and characterization of two insulin analogs with bridging C-terminus of the B-chain in positions B26-B29 and B27-B29 using disulfide bridge. This could fix a bended structure of the B chain end and could help to increase the affinity of IR and specificity for IR-B. The preparation was carried out using solid phase synthesis, cyclization and subsequent enzymatic semi-synthesis using trypsin. Both analogs were prepared successfully, but in low yields. These yields, however, were sufficient for subsequent binding tests. Binding assays for the IR-A and IR-B were performed to determine by the binding affinity of both analogs to human insulin receptor isoforms, and their dissociation constants determined. From the values obtained, we can conclude that in both cases there was an increased specificity for IR-B compared to human insulin. However, the affinity of the individual isoforms was significantly reduced. This thesis yielded two successfully prepared insulin analogs with fourth disulfide bridge. The data obtained can be used to prepare further similar analogs, which having desirable properties could find applications in pharmaceutical use. (In Czech)

Key words: insulin, analog, insulin receptor, disulfide bridge, solid-phase synthesis, enzymatic semisynthesis

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	10
1.1 Insulin	10
1.2 Insulinový receptor (IR)	10
1.3 Interakce insulínu s IR	12
1.4 "Idea práce"	14
2. Cíle práce	16
3. Materiál	17
4. Metody	19
4.1. Syntéza oktapeptidů na pevné fázi	19
4.1.1 Automatická syntéza.....	19
4.1.2 Manuální syntéza.....	19
4.2 Cyklizace oktapeptidů	20
4.2.1 Cyklizace a purifikace peptidu 1.....	20
4.2.2 Cyklizace a purifikace peptidu 2.....	21
4.3 Enzymová semisyntéza analogů insulínu	22
4.3.1 Enzymová semisyntéza a purifikace analogu insulínu 1.....	22
4.3.2 Enzymová semisyntéza a purifikace analogu insulínu 2.....	23
4.4 Hmotnostní spektrometrie	24
4.5 Vazebné testy ligandů s IR-A a IR-B <i>in vitro</i>	24
4.5.1 Příprava roztoků ligandů IR pro vazebné testy.....	24
4.5.2 Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity ligandů k IR-A.....	25
4.5.3 Testování vazebné afinity ligandů k IR-A.....	25
4.5.4 Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity ligandů k IR-B.....	26
4.5.5 Testování vazebné afinity ligandů k IR-B.....	27
5. Výsledky	28
5.1 Syntéza oktapeptidů na pevné fázi a jejich cyklizace	28
5.1.1 Syntéza peptidu 1.....	28
5.1.2 Syntéza peptidu 2.....	33

5.2 Semisyntéza insulinových analogů	37
5.2.1 Semisyntéza analogu insulinu 1	37
5.2.2 Semisyntéza analogu insulinu 2	41
5.3 Určení hodnot vazebných disociačních konstant analogů insulinu 1 a 2 vůči oběma izoformám receptoru insulinu	44
6. Diskuze.....	48
7. Souhrn	52
8. Reference.....	53

Seznam použitých zkratek

ACN - acetonitril

Boc - *t*-butyloxykarbonylová skupina

BSA - hovězí sérový albumin (z angl. *bovine serum albumin*)

DCM - dichlormethan

DIC - *N,N*-diisopropylkarbodiimid

DIPEA - *N,N*-diisopropylethylamin

DMA - dimethylacetamid

DMF - dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

DOI - des(B23-B30)oktapeptid insulin

DODT - 3,6-dioxo-1,8-oktandithiol

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

Fmoc - 9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina

GLUT-2 - glukosový transportér typu 2

GLUT-4 - glukosový transportér typu 4

HAc - kyselina octová

HEPES - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonová kyselina

HBTU - 2 - (1H - benzotriazol - 1 - yl) - 1,1,3,3 - tetramethyluronium
hexafluorofosfát

IR - insulinový receptor

IUB - Mezinárodní unie pro biochemii (z angl. *International Union of Biochemistry*)

IUPAC - Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

NMP - *N*-methyl-2-pyrrolidon

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (z angl. *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*)

tBu - *t*-butylová skupina

TCEP - tris(2-chlorethyl)fosfát

TFA - trifluoroctová kyselina

TIS - triisopropylsilan

Trt - tritylová skupina

Dále jsou používány jednopísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB[1]. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v *L*-formě.

1. Úvod

1.1 Insulin

Insulin je malý proteinový hormon produkovaný β -buňkami ve slinivce břišní, konkrétně v Langerhansonových ostrůvcích. Byl objeven roku 1921 a jeho krystalická struktura byla vyřešena roku 1969[2]. Je složen z 51 aminokyselin, rozdělených do dvou řetězců; řetězce A (21 aminokyselin) a řetězce B (30 aminokyselin). Řetězce jsou propojeny 2 disulfidickými vazbami mezi cysteiny A7-B7 a A20-B19 a další disulfidický můstek je v rámci samotného řetězce A mezi cysteiny A6 a A11 (obrázek 2, strana 13).

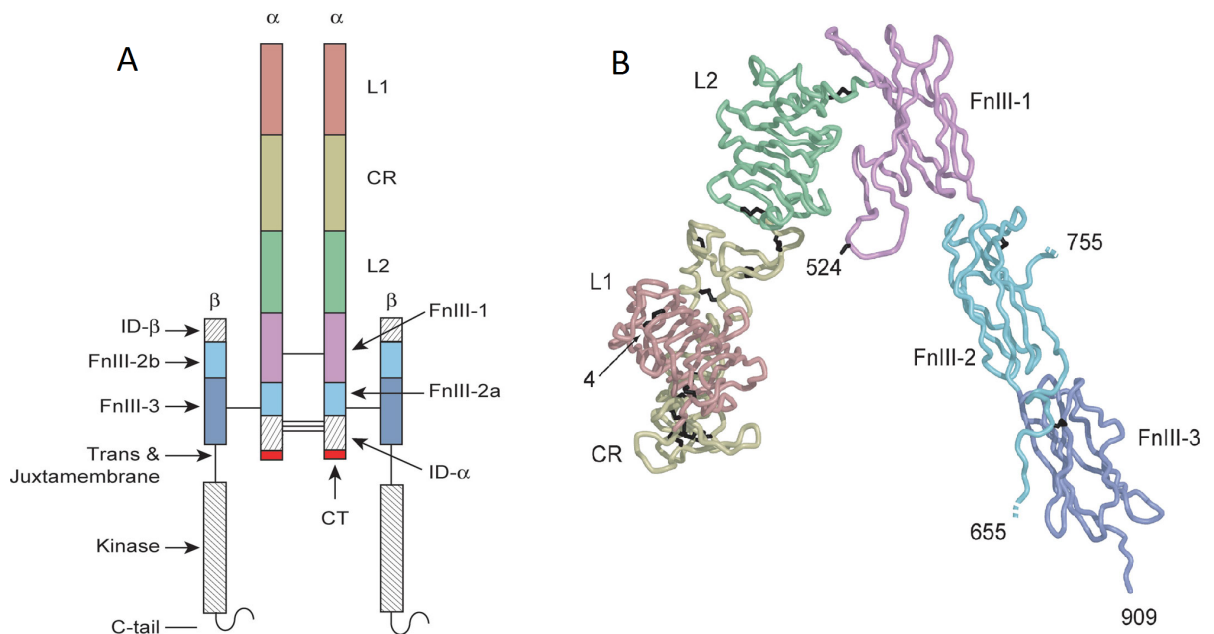
In vitro insulin vytváří již při mikromolární koncentraci dimery a za přítomnosti zinečnatých iontů i hexamery[3]. Hexamery jsou hlavní tzv. zásobní formou insulínu např. ve farmaceutických preparátech insulínu podávaných diabetickým pacientům. Předpokládá se, že v hexamerní formě je insulin přítomen i v sekrečních granulích β -buněk slinivky[4], ale není pro to prozatím žádný přímý experimentální důkaz.

Insulin hraje důležitou roli v udržování stálé hladiny cukru v krvi a v regulaci jeho vstupu do buněk, ale také se významně podílí na metabolismu proteinů a lipidů[5]. Sekrece insulínu je řízena primárně hladinou krevní glukózy, ale podléhá komplexní regulaci[6]. Insulin se váže na specifický membránový insulinový receptor (IR)[7]. Poruchy v sekreci insulínu, vazbě na jeho receptor či ve vnitrobuněčné signalizaci po aktivaci receptoru mohou vést k různým onemocněním, jako je například diabetes[8], nádorová onemocnění[9] či Alzheimerova choroba[10].

1.2 Insulinový receptor (IR)

Insulinový receptor je transmembránový homodimerní alosterický protein s enzymovou aktivitou ve své intracelulární části, který řadíme do rodiny tyrosinkináz. Skládá se ze dvou extracelulárních α -podjednotek a dvou β -podjednotek, které jsou částečně extracelulární, transmembránové a intracelulární. Intracelulární β -podjednotky vykazují tyrosinkinázovou aktivitu. Monomery IR jsou tedy identické a každý z nich se skládá z jedné podjednotky α a jedné podjednotky β . Podjednotky α a β jednoho monomeru jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky

a zároveň jsou oba monomery spojeny v dimer disulfidickými můstky (obrázek 1). Krystalická struktura extracelulární části IR byla vyřešena roku 2006. Extracelulární část IR se skládá ze dvou α -podjednotek propojených disulfidickými můstky, z nichž každá má tvar obráceného písmena "V"[11]. Jedna větev tohoto V je tvořena doménami CR („cystein rich“), L1 („leucin rich“), a L2, zatímco druhá se skládá z lineárního uspořádání tří domén FnIII 1-3 (fibronektin) (obrázek 1). Kvarterní struktura extracelulární části IR se vytváří specifickou interakcí a vzájemným uspořádáním obou α -podjednotek tak, že α -podjednotky IR jsou vůči sobě v antiparalelním uspořádání. Dále se ukázalo, že C konec jedné α -podjednotky IR, nazývaný jako segment „ α CT“, leží přímo na β -lístech domény L1 druhé α -podjednotky. Tento segment α CT je nezbytný pro vazbu insulinu na IR[12].



Obrázek 1. - Podjednotkové složení insulinového receptoru a krystalová struktura α -podjednotky insulinového receptoru. Obrázek A zobrazuje schéma modelu insulinového receptoru s jeho vyznačenými doménami a podjednotkami propojenými disulfidickými vazbami (šedé vazby). Obrázek B ukazuje 3D krystalickou strukturu α -monomeru IR. Podle McKern et al., Ref. [11].

Insulinový receptor má dvě izoformy, IR-A a IR-B, odlišující se přítomností krátké aminokyselinové sekvence (12 aminokyselin) kódované exonem 11[13]. Tato sekvence 12 aminokyselin je umístěna právě na karboxylovém konci peptidu α CT

o kterém jsme hovořili výše. V případě IR-B je přítomna, v případě IR-A chybí. Izoformy IR jsou zastoupeny v různých tkáních. IR-A se nachází především v mozku, lymfatické či plodové a rakovinové tkáni, zatímco IR-B se vyskytuje či dominuje pouze ve tkáních, které se vyznačují specifickou absorpcí glukózy v závislosti na působení insulínu jako odpovědi na vysokou hladinu krevního cukru[14]. Těmito tkáněmi jsou hlavně svalová a tuková tkáň. Při tomto mechanismu vazba insulínu na receptor indukce kaskádu fosforylací vnitrobuněčných proteinů, která má za následek přemístění specifického transportéru Glut4 z cytosolu do membrány buňky a právě prostřednictvím Glut4 pak glukóza do buňky vstupuje. V jiných tkáních vstupuje glukóza do buněk nezávisle na působení insulínu. Dalo by se tedy zjednodušeně říci, že IR-A je více zodpovědný za mitogenní funkce insulínu jako růstového hormonu, zatímco IR-B je odpovědný hlavně za metabolické efekty insulínu.

Insulin byl během let modifikován a syntetizován mnoha způsoby, jak pro biologický a biochemický výzkum, tak pro rozvoj biofarmak[15]. S novými poznatky, objevy a rozvíjejícími se možnostmi peptidové syntézy a HPLC se objevují stále nové insulínové analogy. Šest analogů insulínu je již v klinické praxi používáno pro léčbu diabetu[16]. Tyto analogy se ovšem od lidského insulínu neliší ve svých vlastnostech vůči receptoru insulínu. Oproti insulínu lidskému mají ovšem rozdílnou rozpustnost, a tím i rychlejší nástup účinku či naopak prodlouženou dobu působení v organismu.

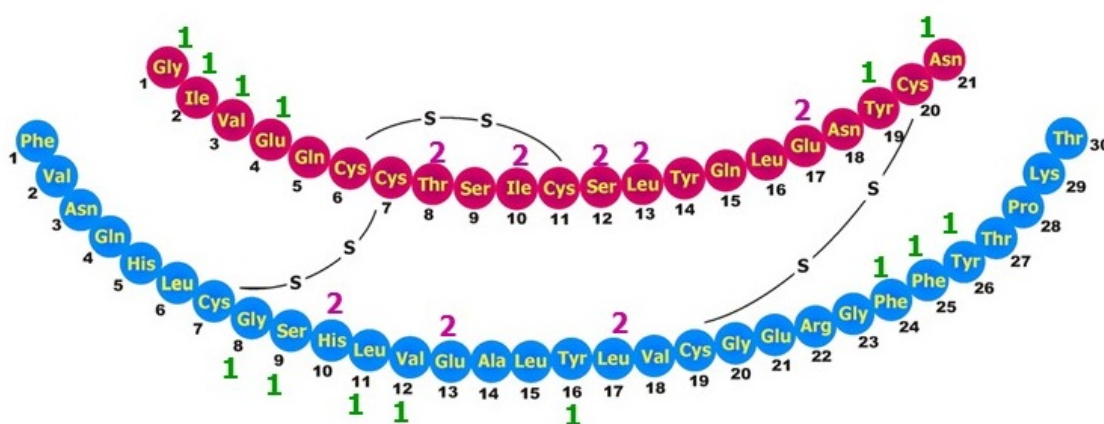
Na základě existence obou izoform IR (IR-A a IR-B) a jejich specifík, je snaha vytvořit takový insulínový analog, který by s dostatečnou afinitou dominoval vazbou na IR-B. Takový analog by byl potenciálně vhodným kandidátem k využití v léčbě diabetu a zároveň by minimalizoval riziko vzniku nádorových onemocnění a dalších vedlejších účinků[14][17][18].

1.3 Interakce insulínu s IR

Mechanismus interakce insulínu s jeho receptorem se studuje již desítky let a stále nebyl zcela objasněn[19]. IR, jak již bylo řečeno, je dimerní a obsahuje 2 vazebná místa pro insulín, která jsou od sebe poměrně vzdálená. Na receptor se tak mohou teoreticky vázat dvě molekuly insulínu. Každé z těchto vazebných míst se navíc skládá ze dvou dílčích vazebných míst, která pevně „uchopí“ navázanou molekulu insulínu.

Na tvorbě těchto vazebných míst se účastní oba monomery IR a vzájemně se tak doplňují. Vazebná místa prvního monomeru označujeme jako 1 a 2, zatímco vazebná místa druhého monomeru pro jasnost označujeme jako 1' a 2'. Insulin po navázání propojuje tyto dva monomery v jejich antiparalelním uspořádání dvojitým způsobem[20]. Propojením místa 1 s místem 2', nebo místa 2 s místem 1'. Vazba insulínu vykazuje negativní kooperativitu, což znamená, že po navázání první molekuly insulínu na receptor, je afinita receptoru k další molekule insulínu snížena[20].

Při mapování aminokyselin v molekule insulínu účastnících se samotné vazby insulínu na receptor bylo objeveno několik úseků aminokyselin, které jsou, jak se později zjistilo, esenciální pro správnou vazbu a funkci hormonu. Jde o tzv. „klasické“ nebo-li primární vazebné místo insulínu (interagující s vazebným místem 1 či 1' receptoru) a „sekundární“ místo insulínu (interagující s vazebným místem 2 či 2' receptoru) pro vazbu na receptor. U místa primárního jde hlavně o aminokyseliny A1, A2, A3, A5, A19, A21, B12, B16 a B23-B26[21][22] a sekundární místo zahrnuje hlavně aminokyseliny A12, A13, A17, B10, B13 a B17[23] (Obrázek 2).



Obrázek 2. - Tzv. primární struktura lidského insulínu. Řetězec A insulínu je zobrazen červenými kuličkami a řetězec B kuličkami modrými. Aminokyseliny, u nichž se předpokládá interakce s vazebným místem 1 receptoru insulínu jsou označeny zelenými jedničkami a aminokyseliny, u nichž se předpokládá interakce s vazebným místem 2 receptoru fialovými dvojkami.

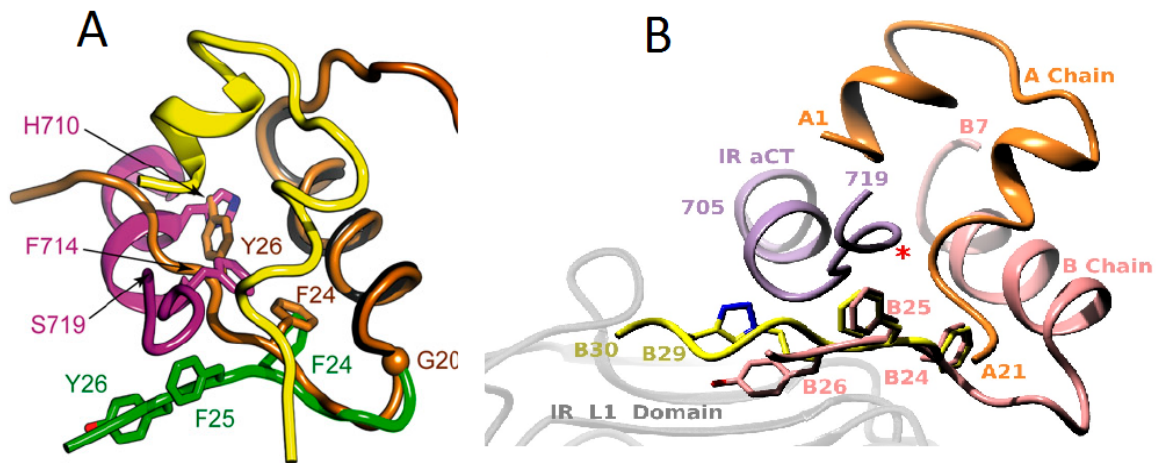
V rámci vývoje analogů bylo hlavním cílem jednak co nejvíce napodobit fyziologickou funkci insulínu v organismu za účelem farmaceutického použití (vývoj

rychle či naopak pomalu působících analogů, viz výše) a samozřejmě také objasnit jak insulin interaguje s IR. Pokroku ve vývoji do nedávna bránil nedostatek 3D struktur popisujících vazbu insulinu a IR. Avšak v roce 2013 byla vyřešena první dlouho očekávaná struktura komplexu IR s insulinem[24] mapující interakci primárního vazebného místa insulinu s vazebným místem 1 (či 1') receptoru. Zjistilo se a je pozoruhodné, že hlavní interakce insulinu s doménou L1 α -podjednotky IR není přímá, ale je zprostředkována pomocí α CT-segmentu. Také se ukázalo, že C-konec řetězce B insulinu musí podstoupit konformační změnu, aby se vytvořil prostor pro tento α CT-segment a mohlo dojít k vsunutí C-konce řetězce B insulinu mezi doménu L1 a α CT-segment. K umožnění této změny konformace C-konce B-řetězce musí dojít k vychýlení úseku aminokyselin B25-B30 a k jejich odklonu od centrální části insulinu[25], viz obrázek 3A na straně 15 (Ref. [26]).

1.4 "Idea práce"

Na základě těchto nových poznatků bylo nedávno vytvořeno několik analogů insulinu s cílem zafixovat tzv. aktivní (ohnutou) konformaci C-konce řetězce B insulinu pomocí kovalentního přemostění peptidového řetězce v tomto výše popsaném úseku (pozice B25-B30). Konkrétně šlo o přemostění C-konce řetězce B insulinu v různých pozicích pomocí triazolového můstku (obrázek 3B, strana 15). U takto připravených insulinových analogů byly následně určeny jejich specifity a vazebné preference vůči jednotlivým izoformám IR[27].

V této práci budu navazovat na zmíněnou sérii analogů insulinu, kde přemostění C-konce B-řetězce vedlo k zvýšené afinitě vůči IR a zejména ke zvýšené selektivitě vůči IR-B. Konkrétně se budu věnovat přemostování C-konce B-řetězce insulinu pomocí disulfidického můstku. Umístění disulfidického můstku do specifických poloh C-konce řetězce B insulinu by mohlo vést k ohybu této části molekuly insulinu, což by mohlo vést ke zvýšené afinitě vůči IR a případně k zvýšené selektivitě vůči IR-B. K použití disulfidického můstku v C-konci B-řetězce insulinu nás inspirovaly nedávné práce týmu z firmy Novo Nordisk A/S (Ref. [28]), kdy byl inkorporován dodatečný disulfidický můstek do různých pozic insulinu, avšak ne do C-konce řetězce B.



Obrázek 3. - A. 3D struktura insulínu v komplexu s IR. Řetězec A insulínu je označen žlutě. Řetězec B insulínu v tzv. neaktivní či zásobní konformaci je označen hnědě. Zeleně je označen řetězec B insulínu v konformaci navázané na receptor (aminokyseliny B28-B30 nebyly v krystalové struktuře rozlišeny). Z receptoru insulínu je ukázán pouze segment α CT z izoformy IR-A (fialově). Z obrázku je jasné, že řetězec B insulínu se musí „odklopit“ od centrální části molekuly insulínu, jinak by došlo ke střetu se segmentem receptoru α CT. Podle Menting et al. (Ref. [26]). Na obrázku 3B je opět zobrazena interakce insulínu s IR (řetězec A je hnědý a řetězec B růžový, aminokyseliny B28-B30 nebyly v komplexu rozlišeny) zprostředkovaná přes α CT-segment receptoru (z IR-A, vyznačen fialově). Žlutě je na obrázku rovněž vyznačena část řetězce B (aminokyseliny B23-B30) speciálně upraveného analogu insulínu jak se váže na IR. Za povšimnutí stojí linker v polohách B26-B29 analogu obsahující pětičlenný triazolový kruh. Šedě je zde rovněž vyznačena doména IR L1. Podle Viková et al. (Ref. [27]).

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo připravit analog insulínu s disulfidickým můstkem mezi polohami B27 a B29 (analog 1) a určit jeho vazebné afinity vůči IR-A a IR-B.

V případě úspěchu u prvního analogu bylo dalším cílem připravit analog insulínu s disulfidickým můstkem mezi polohami B26 a B29 (analog 2) a určit jeho vazebné afinity vůči IR-A a IR-B.

3. Materiál

aceton- Penta, Chrudim, ČR

acetonitril (ACN) - Fischer Scientific, Leics, UK

1,4-butandiol - Fluka, Buchs, Švýcarsko

diethylether - Penta, Chrudim, ČR

dichlormethan (DCM) - Penta, Chrudim, ČR

diisopropylethylamin (DIPEA) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

dimethylacetamid (DMA) - Fluka, Buchs, Švýcarsko

N,N - dimethylformamid (DMF) - Macron Fine Chemicals, Center Valley, USA

dimethylsulfoxid (DMSO) - Penta, Chrudim, ČR

des(B23-B30)oktapeptid-inuslin (DOI) - skupina dr. Jiráčka, ÚOCHB AV ČR

ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - Lachema, Neratovice, ČR

3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (DODT) - Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japonsko

Fmoc-chráněné aminokyseliny – Novabiochem, Lucern, Švýcarsko

fenol - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

mono-¹²⁵I-TyrA14-lidský insulin - Perkin Elmer, Waltham, USA

kyselina octová 99% (HAc) - Penta, Chrudim, ČR

N-methylmorpholin - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) - Merck, Kenilworth, USA

octan vápenatý - Fluka, Buchs, Švýcarsko

telecí sérum - Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

thioanisol - Fluka, Buchs, Švýcarsko

trifluoroctová kyselina (TFA) - Fluka, Buchs, Švýcarsko

Tris/HCl - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

triisopropylsilan (TIS) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

tris(2-chlorethyl)fosfát (TCEP) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

trypsin - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Wangova pryskyřice substituovaná Fmoc-Thr(OtBu) - Wang resin, Novabiochem, Lucern, Švýcarsko

2 - (1H - benzotriazol - 1 - yl) - 1,1,3,3 - tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU) - Novabiochem, Lucern, Švýcarsko

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina (HEPES) - Sigma, St. Louis, USA

4. Metody

4.1. Syntéza oktapeptidů na pevné fázi

4.1.1 Automatická syntéza

Peptid G-F-F-Y-C-P-C-T (peptid 1) byl připravován na zakázku v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na automatickém syntetizátoru ABI 433A od firmy Applied Biosystems. Příprava peptidů byla provedena pomocí syntézy na pevné fázi podle Merrifielda[29]. Jako chránicí skupina α -aminoskupin byla použita 9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina (Fmoc). Postranní řetězce byly chráněny pomocí skupin Trt, tBu a Boc. Jako pevná fáze byla použita Wangova pryskyřice předem substituovaná první C-koncovou aminokyselinou, tedy threoninem. Syntéza proběhla v měřítku 200 μ mol. Každý kondenzační cyklus byl 1-2krát opakován. V každém cyklu byl přidán 10-ti násobek stechiometrického (molárního) množství dané Fmoc-aminokyseliny a stejné množství 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfátu (HBTU) při dvojnásobném přebytku *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) vůči aminokyselině na pryskyřici v prostředí *N*-methyl-2-pyrrolidonu (NMP).

Pryskyřice z reaktoru syntetizátoru byla převedena do baňky a přelita štěpící směsí obsahující 0,75 ml deionizované vody, 0,75 ml thioanisolu, 0,375 ml 3,6-dioxo-1,8-oktandithiolu (DODT), 0,15 ml triisopropylsilanu (TIS), 0,75g fenolu a byla doplněna na celkový objem 30 ml kyselinou trifluoroctovou (TFA) 91,5% (v/v). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 hodiny. Produkt byl přefiltrováním přes fritu S3 do ledového diethyletheru. Následně byla sraženina peptidu filtrována přes fritu S4. Výsledný peptid byl promyt 400 ml ledového diethyletheru a nechán vysušit. Sražený peptid byl následně převeden do 100 ml baňky.

4.1.2 Manuální syntéza

Peptid G-F-F-C-T-P-C-T (peptid 2) byl připraven metodou manuální syntézy na pevné fázi pomocí Wangovy pryskyřice v množství 200 μ mol. Syntéza byla provedena v plastové stříkačce. Jako chránicí skupina α -aminoskupin byla použita Fmoc.

Postranní řetězce byly chráněny pomocí skupin Trt, tBu a Boc. První aminokyselina Fmoc-threonin byla již substituovaná a na pryskyřici.

Pryskyřice s první aminokyselinou se nejprve nechala bobtnat 15 min v 2 ml DMF. Následně byla promyta 2x5 ml dimethylformamidu (DMF). Chránící skupina Fmoc byla odštěpena pomocí 1,5 ml 20% piperidinu v DMF (5 a následně 20 minut). Deprotekční reakce byla poté kvantitativně zkontrolována pomocí spektrofotometrického měření absorpance piperidin-dibenzofulvenového komplexu vzniklého odstraněním skupiny Fmoc. Absorbance komplexu byla měřena při vlnové délce 301 nm za použití extinkčního koeficientu $7040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Poté byla pryskyřice promyta 2x5 ml DMF, 4x5 ml dichlormethanu (DCM) a následně 4x5 ml NMP. Navázání dalších aminokyselin (3 ekvivalenty) bylo provedeno s činidly HBTU (3 ekvivalenty) a DIPEA (7 ekvivalent) v prostředí NMP (2 ml), vždy po dobu 1-2 hodiny. Kondenzační reakce byla vždy kontrolována Kaiserovým testem detekujícím přítomnost volných α -aminoskupin. V případě nedostatečné kondenzace byl postup opakován za stejných podmínek.

V případě, že se nechala kondenzační reakce probíhat přes noc, kondenzace aminokyselin (3 ekvivalenty) probíhala s činidlem *N,N*-diisopropylkarbodiimid (DIC) (3,6 ekvivalent) a HOBt (3,6 ekvivalent), celé rozpuštěno ve 2 ml DCM:NMP (1:1). Pryskyřice byla následně promyta 3x5 ml DCM:NMP (1:1) a 6x5 ml DMF.

Pryskyřice s výsledným oktapeptidem byla promyta 5 ml DMF a 4x5 ml DCM a vysušena. Peptid byl štěpen z pryskyřice s 22,5 ml štěpící směsi obsahující 0,75 ml thianizolu, 0,375 ml DODT, 0,75g fenolu, 0,15 ml TIS, 0,75 ml deionizované vody a 21 ml TFA (91,5 %, v/v). Štěpení probíhalo 2 hodiny za laboratorní teploty.

Produkt byl přefiltrováním přes fritu S3 do ledového diethyletheru. Následně byla sraženina peptidu filtrována přes fritu S4. Výsledný peptid byl promyt 400 ml ledového diethyletheru a nechán vysušit.

4.2 Cyklizace oktapeptidů

4.2.1 Cyklizace a purifikace peptidu 1

Z celkové hmotnosti 152 mg surového peptidu 1 bylo odebráno 78 mg a rozpuštěno v 8 ml 63% acetonitrilu (ACN). Dále bylo přidáno 48 mg redukčního činidla tris(2-chlorethyl)fosfátu (TCEP). Reakční směs byla míchána (točena) cca 20

hodin v uzavřené baňce a následně ředěna na přibližně 50 μ M koncentraci pomocí 1,7 l 10% roztoku DMSO ve vodě. pH směsi bylo upraveno pomocí kyseliny octové (HAc) na hodnotu 5-6. Reakční směs byla po dobu 22 h nejprve míchána a poté následně ponechána stát bez míchání za laboratorní teploty v otevřené baňce a temnu oxidovat po dalších 26 h. Následně byla směs odpařena (hlavně voda) na rotační vakuové odparce a DMSO postupně odstraněn lyofilizací.

Průběh cyklizace peptidu 1 byl monitorován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). RP-HPLC byla prováděna na přístrojích firmy Waters (čerpadlo Waters 600, duální UV/VIS detektor Waters 2487 - Milford, USA). Zjištěná data byla zpracována pomocí programu Clarity Lite od firmy Data Apex. Eluce probíhala gradientovou metodou se vzrůstající koncentrací ACN v deionizované vodě za přítomnosti 0,1% TFA. K míšení a změně gradientu byl použit roztok A (0,1% TFA ve vodě) a roztok B (0,1% TFA s 80% ACN). Absorbance byla měřena při vlnových délkách 218 a 276 nm. Pro analýzy byla použita analytická kolona Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250x4 mm firmy Macherey-Nagel (Düren, Německo) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Využívaný gradient je uveden v tabulce 1 (str. 22).

Cyklický peptid 1 (po odstranění DMSO) byl následně purifikován pomocí preparativního RP-HPLC na preparativní koloně Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250x21 mm firmy Watrex (Praha, ČR) při průtokové rychlosti 9 ml/min. Využívaný gradient je uveden v tabulce 1 (str. 22). Identita peptidu byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.2.2 Cyklizace a purifikace peptidu 2

Z celkové hmotnosti 130 mg surového peptidu 2 bylo odebráno 65 mg a přeneseno do 1,5 l 10% DMSO ve vodě. pH bylo upraveno na hodnotu pH 5-6 pomocí HAc. Směs byla následně ponechána při laboratorní teplotě oxidovat v temnu, bez míchání. Průběh cyklizace peptidu 2 byl monitorován pomocí RP-HPLC s analytickou kolonou Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250x4 mm firmy Watrex (Praha, ČR) s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Po 48 hodinách byla reakce již kompletní a peptid 2 oxidovaný. Směs byla následně 2 dny postupně nanášena na sorbent C18 LiChroprep RP-18 (25-40 μ m) firmy Merck (Kenilworth, USA) ve skleněné koloně. Kolona se

sorbentem (asi 50 ml) byla poté promyta 600 ml deionizované vody, aby byl odstraněn DMSO. Cyklický peptid byl eluován pomocí roztoku 80% ACN, 0,1% TFA, kdy byly odebírány frakce po (cca) 15 ml a průběžně analyzovány pomocí RP-HPLC.

Cyklický peptid se následně purifikoval pomocí preparativního RP-HPLC na preparativní koloně Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250x21 mm firmy Watrex (Praha, ČR) při průtokové rychlosti 9 ml/min. Využívaný gradient je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Gradient 1 využívaný pro analýzu a purifikaci peptidů. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 218 a 276 nm. Pro analýzu byl použit průtok 1 ml/min a pro preparaci průtok 9 ml/min. Jako roztok A byla použita 0,1% TFA (v/v) ve vodě a jako roztok B byl použit 80% (v/v) ACN ve vodě za přítomnosti 0,1 % TFA (v/v).

Gradient 1					
Čas [min]	0	30	31	32	32,1
Koncentrace roztoku B [%] (v/v)	30%	50%	100%	100%	30%

4.3 Enzymová semisyntéza analogů insulinu

Des(B23-B30)oktapeptidinsulin (DOI) použitý pro semisyntézu byl již dříve připraven v laboratoři Dr. Jiráčka a byl purifikován na preparativní koloně C4 v systému voda/acetonitril/0.1% TFA. Tato purifikace nebyla součástí této bakalářské práce.

4.3.1 Enzymová semisyntéza a purifikace analogu insulinu 1

Peptid (18,2 μ mol) byl spolu s DOI (2,67 μ mol) rozpuštěn v roztoku o celkovém objemu 340 μ l obsahující 35% (v/v) dimethylacetamidu (DMA) ve vodě, 35% (v/v) 1,4-butandiol a 30% (v/v) směsi obsahující 0,2 M Tris/HCl (o pH 8), 10 mM octan vápenatý a 1 mM ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA).

pH reakce bylo následně upraveno pomocí N-methylmorpholinu (3 μ l) na hodnotu 6,9-7,1. Reakce byla míchána za laboratorní teploty a byly odebírány vzorky

po 1 μl v různých časech. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC s analytickou kolonou.

Po 3,5 hodinách bylo přidáno 1,3 mg trypsinu a 1 μl N-methylmorpholinu a směs byla míchána při 37°C. Reakce probíhala přes noc a po 21 hodinách zastavena pomocí acetonu. Poté byly sražené peptidy centrifugovány, vysušeny a rozpuštěny ve 100 μl 10% HAc.

Preparace a analýza analogu byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Využívané přístroje k měření a ostatní parametry se shodují s využitím u preparace a analýzy peptidů.

Pro analýzu insulinového analogu 1 byla používána analytická kolona Nucleosil 120-5 C18 o rozměrech 250x4 mm firmy Macherey-Nagel (Düren, Německo) s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Pro purifikaci analogu 1 byla použita semipreparativní kolona Nucleosil 120-5 C18 o rozměrech 250x10 mm. Využívaný gradient je uveden v tabulce 2 (str. 24).

4.3.2 Enzymová semisyntéza a purifikace analogu insulinu 2

Peptid (33,5 μmol) byl rozpuštěn v roztoku o celkovém objemu 643 μl obsahující 35% (v/v) DMA ve vodě, 35% (v/v) 1,4-butandiol, a 30% (v/v) směsi obsahující 0,2M Tris (pH 8), 10 mM octan vápenatý a 1 mM EDTA. Následně byl přidán DOI (4,95 μmol). Z této směsi byl odebrán vzorek reprezentující počáteční čas reakce a analyzován na RP-HPLC s analytickou kolonou. Reakce byla následně odstartována přidáním trypsinu (0,2 μmol). Ihned po promíchání reakční směsi bylo pH reakce upraveno pomocí N-methylmorpholinu (3 μl) na hodnotu 6,9-7,1. Reakční směs byla poté míchána při 37°C a postupně byly odebírány vzorky (1 μl) v různých časech. Průběh reakce byl zaznamenáván pomocí HPLC na analytické koloně. Po 3 hodinách reakce bylo vzhledem ke špatné rozpustnosti přidáno 100 μl původního roztoku (1,4-butandiol, DMA, Tris ve stejném poměru jak je popsáno výše). Po 6 hodinách bylo přidáno dalších 100 μl roztoku. Po 23 hodinách byl přidán další 1 μl N-methylmorpholinu, 2 μg trypsinu a 120 μl DMF. Po 31 hodinách byla reakce zastavena přidáním acetonu. Vysrážené peptidy byly poté vysušeny a rozpuštěny ve směsi 10% HAc, 40% ACN.

Pro analýzu insulinového analogu 1 byla používána analytická kolona Nucleosil 120-5 C18 o rozměrech 250x4 mm firmy Macherey-Nagel (Düren, Německo) s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Pro purifikaci analogu 1 byla použita semipreparativní kolona Nucleosil 120-5 C18 o rozměrech 250x10 mm. Využívaný gradient je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. - Gradient 2 využívaný pro analýzu a purifikaci insulinových analogů. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 218 a 276 nm. Jako roztok A byla použita 0,1% TFA (v/v) ve vodě a jako roztok B byl použit 80% (v/v) ACN ve vodě za přítomnosti 0,1 % TFA (v/v).

Gradient 2							
Čas [min]	0	1	21	34	36	37	37,1
Koncentrace roztoku B [%] (v/v)	10%	35%	45%	55%	90%	90%	10%

4.4 Hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci připravených peptidů a insulinových analogů byla využita hmotnostní spektrometrie v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR. Ve většině případů na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) metodou ESI (Electrospray Ionization) v pozitivním iontovém módu a v jednom případě (cyklický peptid 2) i na tandemovém hybridním hmotnostním spektrometru Q-TOF micro (Waters - Milford, USA) opět metodou ESI.

4.5 Vazebné testy ligandů s IR-A a IR-B *in vitro*

4.5.1 Příprava roztoků ligandů IR pro vazebné testy

Zásobní roztoky insulinu a analogů byly připraveny v 0,1% HAc o koncentraci 100 µg/ml. Přesné koncentrace látek byly určeny pomocí spektrofotometrického měření absorbance při vlnové délce 280 nm. Extinkční koeficient (ϵ) pro lidský insulin měl hodnotu 5840 M⁻¹.cm⁻¹ a pro analog 1 měl hodnotu 6080 M⁻¹.cm⁻¹. Extinkční koeficient pro analog 2 měl hodnotu 4800 M⁻¹.cm⁻¹. Extinkční koeficienty

byly spočteny základě počtu tyrosinů a cysteinů ze vztahu $\epsilon = (nY \times 1280) + (nC \times 120)$, kde nY značí počet tyrosinů a nC počet cysteinů obsažených v molekule. Roztoky jednotlivých ligandů (analogů a lidského insulinu) byly před samotným testováním ředěny pomocí vazebného pufru obsahujícího 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO₄, 1mM EDTA, 10 mM glukosu, 15 mM octan sodný a 1% (w/v) hovězí sérový albumin (BSA). pH roztoků bylo upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 7,6.

4.5.2 Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity ligandů k IR-A

K vazebným testům byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9, která exprimuje výhradě IR-A. Buněčná linie byla pěstována dle doporučení ATCC, USA. Buňky byly kultivovány při teplotě 37°C v prostředí s 5% obsahem CO₂, v médiu RPMI-1640 obsahujícím 10% telecího séra, 100 IU/ml penicilinu, 100 µg streptomycinu a 2mM L-glutamin. Buňky byly třikrát týdně pasážovány. Vypěstované buňky byly spočítány a následně ředěny vazebným pufrům na koncentraci 2 miliony buněk/ml.

4.5.3 Testování vazebné afinity ligandů k IR-A

Testování vazebných afinit analogů vůči jednotlivým izoformám receptorů probíhá jako kompetice mezi testovaným ligandem a lidským insulinem značeným pomocí izotopu ¹²⁵I na tyrosinu A14. Testování probíhá za konstantního množství radioaktivně značeného insulinu i buněk IM-9. Koncentrace testovaného ligandu je postupně zvyšována.

Testování bylo provedeno za použití buněčné linie IM-9 postupem dle Morcavallo a kol.[30]. Testovací směs vždy obsahovala buňky v počtu 2 miliony/ml, roztok s konstantní koncentrací insulinu značeného izotopem ¹²⁵I a postupně rostoucí koncentrací daného analogu. Reakce probíhala při teplotě 15°C po dobu 2,5 hodiny a reakční směs byla každou půlhodiny promíchána. Celkový objem reakční směsi byl 500 µl. Po uplynutí inkubační doby byl z každé reakční zkumavky vytvořen duplikát o objemu 200 µl, ke kterému bylo přidáno 200 µl vychlazeného vazebného pufru, čímž byla reakce ukončena. Následně byly vzorky centrifugovány při 13000 x g po dobu 10 minut a při teplotě 4°C. Supernatant byl následně odsát a pelety byly použity k

měření radioaktivity pomocí γ -počítače (Wizard 1470 Automatic γ Counter). Doba měření jednoho vzorku byla 10 minut. Data byla analyzována pomocí programu vytvořeného v aplikaci Excel z laboratoře prof. P. De Meytse z firmy NovoNordisk A/S speciálně vytvořeného pro testování vazebných afinit na využívaném typu buněk. Program je založen na analýze podle modelu vazby jednoho vazebného místa (z angl. *One-site Fitting Model*) metodou nelineární regrese a bere v úvahu tzv. depleci ligandu při jeho nízkých koncentracích. Alternativně byl využíván i program GraphPad Prism 5 za pomoci stejného modelu.

Vazebná křivka analogu byla měřena jedenkrát až třikrát (v závislosti na dostupném množství analogu) a z každé křivky určena hodnota disociační konstanty analogu. Jednotlivé hodnoty disociačních konstant byly následně použity k výpočtu výsledné hodnoty disociační konstanty analogu (K_d). Hodnota disociační konstanty lidského ^{125}I -insulinu vůči receptoru IR-A nutná pro výpočet byla stanovena na 0,3 nM. V případě, že byla pro analog k dispozici jen jedna vazebná křivka, je uvedena jen hodnota K_d určená na základě této křivky bez uvedené experimentální chyby. V případě dvou zjištěných křivek pro analog byla vypočtena průměrná hodnota K_d a je k ní udán rozsah chyby. V případě tří dostupných křivek pro analog byla určena střední hodnota K_d a k ní směrodatná odchylka.

4.5.4 Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity ligandů k IR-B

K vazebným testům byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů s blokovanou expresí genů pro myší IGF-1R a transfekovaná lidským IR-B (R/IR-B)[27].

Příprava buněk a stanovení vazebné afinity ligandů k IR-B probíhala metodou podle Žákové a kol.[31]. Buňky byly kultivovány při teplotě 37°C v prostředí s 5% obsahem CO_2 , v médiu DMEM obsahujícím 25 mM glukosu, 10% telecího séra, 100 IU/ml penicilinu, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinu, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycinu a 2 mM L-glutamin. Buňky byly třikrát týdně pasážovány. Den před testováním byly buňky nasazeny na 24-jamkové destičky v koncentraci asi 12000 buněk na jamku. Výsledná koncentrace buněk použitých k testování byla 20000-30000 buněk na jamku.

4.5.5 Testování vazebné afinity ligandů k IR-B

Buňky byly ponechány 6 h před testováním v médiu bez telecího séra, aby se dosáhlo odstranění insulínu ze séra a ovlivnění měření. Následně byly buňky buněčné linie R-/IR-B dvakrát omyty vazebným pufrům (viz složení vazebného pufru v kap. 4.5.1). Testovací směs vždy obsahovala roztok s konstantní koncentrací insulínu značeného izotopem ^{125}I a postupně rostoucí koncentrací daného analogu. Reakce probíhala při teplotě 5°C po dobu 16 hodin a reakční směs byla kontinuálně míchána na třepačce. Celkový objem reakční směsi byl $250\ \mu\text{l}$. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech. Po uplynutí inkubační doby byly jednotlivé vzorky promyty dvakrát $300\ \mu\text{l}$ vychlazeného vazebného pufru a následně solubilizovány $300\ \mu\text{l}$ $0,1\ \text{M}$ NaOH, čímž byla reakce ukončena. Po 15 minutách byly vzorky se solubilizovanými buňkami z každé jamky kvantitativně přeneseny do zkumavek, které byly poté využity k měření radioaktivity pomocí γ -počítače (Wizard 1470 Automatic γ Counter). Doba měření vzorku byla 1 minuta.

Data byla analyzována v programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese s modelem vazby jednoho vazebného místa, která bere v úvahu tzv. depleci ligandu při jeho nízkých koncentracích. Hodnota disociační konstanty lidského ^{125}I -insulínu vůči receptoru IR-B nutná pro výpočet byla stanovena na $0,3\ \text{nM}$. Z každé křivky byla určena hodnota disociační konstanty analogu. Postup výpočtu finální K_d byl stejný, jako je popsáno výše pro IR-A (kapitola 4.5.3.).

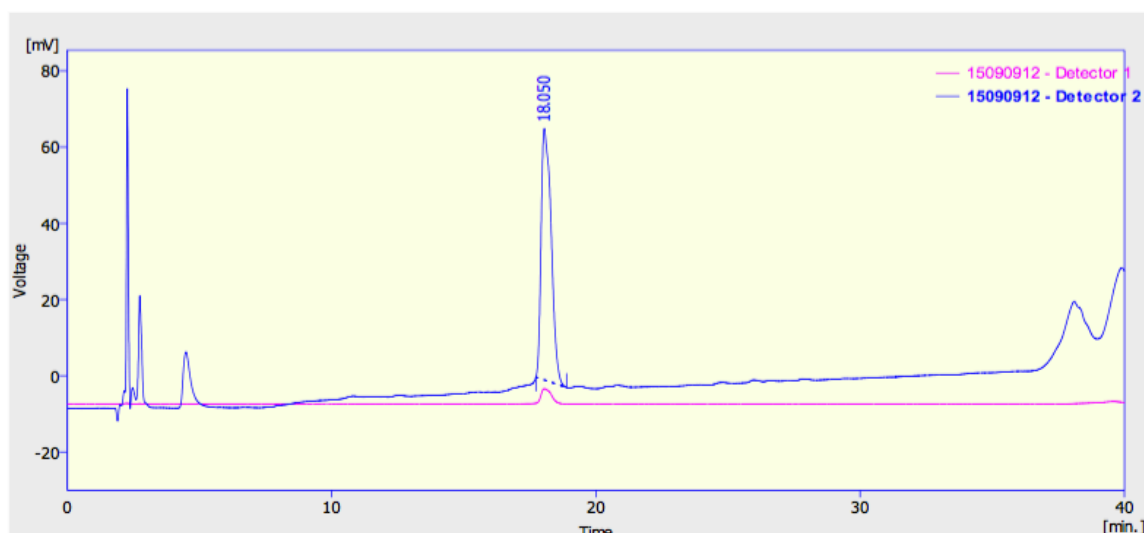
5. Výsledky

5.1 Syntéza oktapeptidů na pevné fázi a jejich cyklizace

Syntézou na pevné fázi byly připraveny dva oktapeptidy (1 a 2) pro přípravu analogů insulínu 1 a 2. Oba peptidy byly již v „surovém“ stavu cyklizovány pomocí oxidační reakce, která byla průběžně analyzována a produkty následně purifikovány pomocí RP-HPLC za podmínek popsanych v kapitole 4.2. Identifikace peptidů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

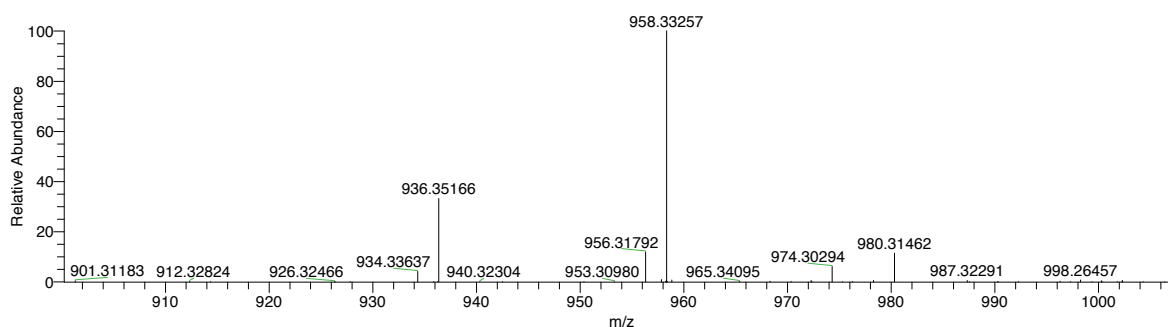
5.1.1 Syntéza peptidu 1

Analytický chromatogram „surového“ peptidu 1 je znázorněn na obrázku 4. Byl odebrán pík s časem 18,05 min.



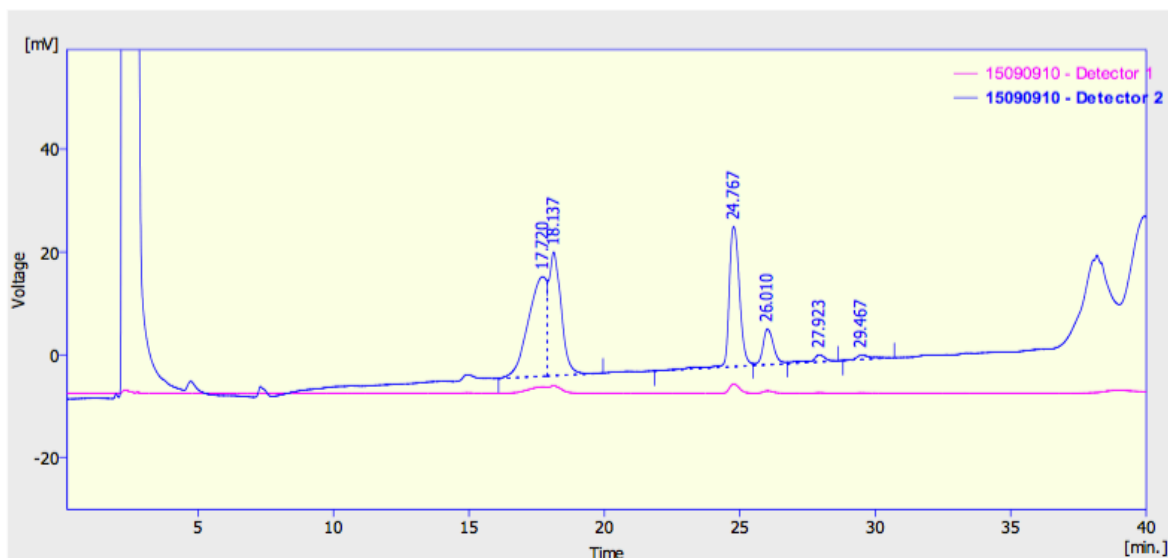
Obrázek 4. - RP-HPLC připraveného „surového“ lineárního (necyklizovaného) peptidu 1 (G-F-F-Y-C-P-C-T). Peptid je eluován v čase 18,050 min.

Dále byla ověřena identita produktu pomocí hmotnostní spektrometrie. Obrázek 5 (str. 29) ukazuje hmotnostní spektrum peptidu 1, které potvrdilo identitu produktu.



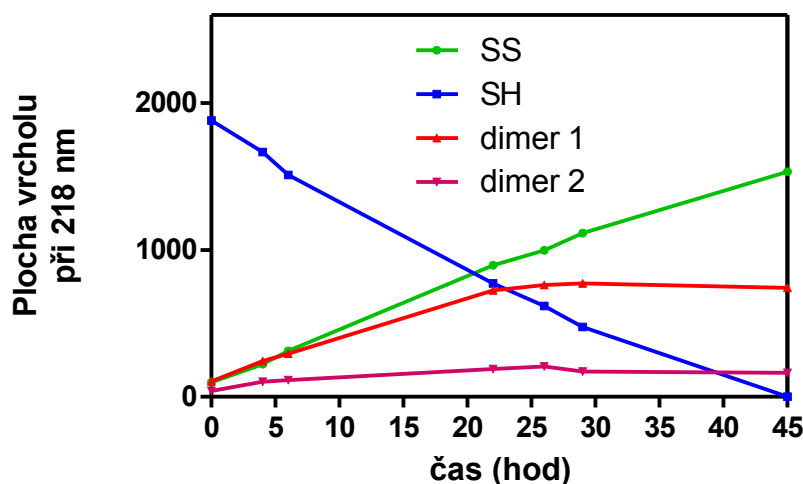
Obrázek 5. - Hmotnostní spektrum surového peptidu 1. Teoretická relativní molekulová monoizotopická hmotnost (M_r) je 936,3510, což odpovídá signálu m/z 936,35166. Druhý hlavní signál m/z ve spektru (958.3325) odpovídá peptidu 1 s jedním atomem sodíku.

Po identifikaci lineárního peptidu 1 následovala jeho cyklizace. Příklad analýzy průběhu cyklizace, po 22 hodinách oxidace, je znázorněn na obrázku 6. Produkt cyklizace je eluován v čase 17,77 min. Jeho eluční čas je velmi blízký výchozímu lineárnímu peptidu 1 (čas 18,137 min). Látky ve vrcholech v časech 24,767 min a 26,010 min jsou pravděpodobně dimery peptidu 1.



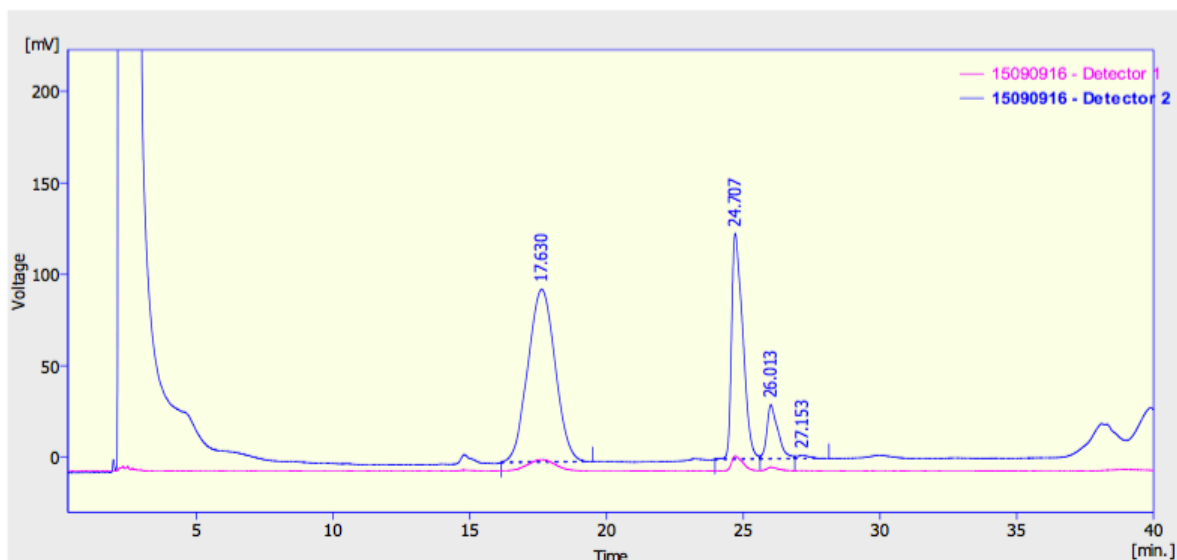
Obrázek 6 - RP-HPLC průběhu oxidace peptidu 1 v čase $t = 22$ h. Produkt je eluován v čase 17,770 min. Výchozí látka má vrchol v čase 18,137 min. Látky ve vrcholech v časech 24,767 min a 26,010 min jsou pravděpodobně dimery peptidu 1.

Průběh oxidace a její produkty byly analyzovány a vynášeny do přehledného schématu (obrázek 7). Množství výchozího lineárního peptidu (SH na obrázku) s časem klesá se současným nárůstem cyklického peptidu (SS na obrázku) a konkurenčních dimerů 1 a 2 (časy v chromatogramu viz obrázek 6, str. 29). Reakční směs byla po dobu 22 h míchána, poté byla ponechána oxidovat bez míchání dalších 26 h. Schéma ukazuje, že po skončení míchání dimery přestaly vznikat.



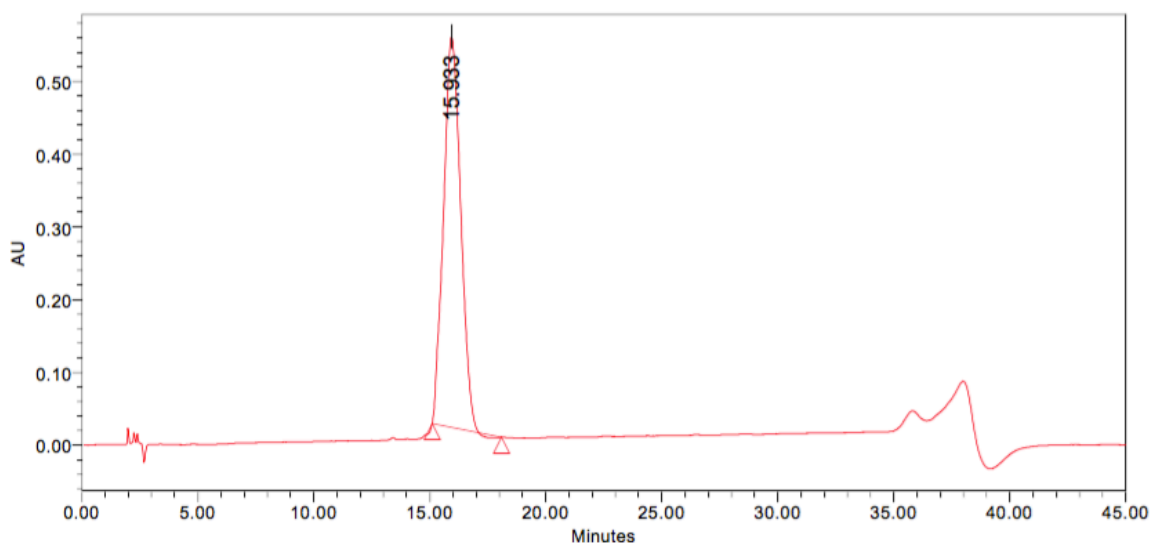
Obrázek 7. - Průběh oxidace peptidu 1. Do 22. hodiny byla směs míchána. Následně byla směs oxidována bez míchání. Modrá křivka (SH) znázorňuje výchozí lineární peptid 1, zelená křivka (SS) charakterizuje cyklický peptid 1. Dimer 1 (čas 24,767 min, viz obrázek 6, str. 29) a dimer 2 (čas 26,010 min, viz obrázek 6, str. 29), jako konkurenční produkty, po ukončení míchání přestaly vznikat.

Cyklizace byla ukončena po 2 dnech. Chromatogram na konci cyklizace je znázorněn na obrázku 8 (str. 31). Výsledný produkt měl vrchol v čase 17,630 min.



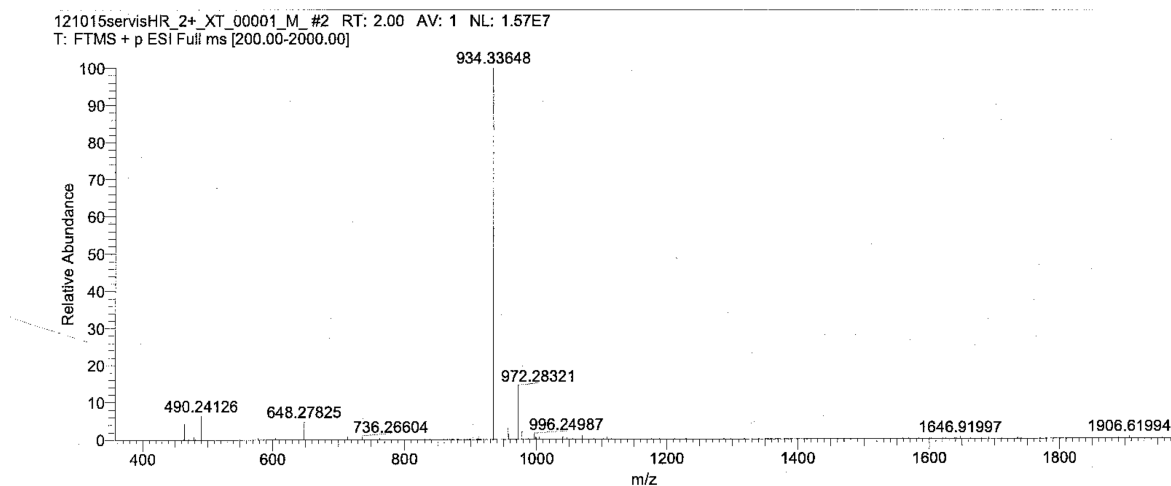
Obrázek 8 - RP-HPLC finálního cyklického peptidu 1 po oxidaci. Produkt byl ve vrcholu s časem 17,630 min. Látky ve vrcholech v časech 24,707 min a 26,013 min jsou pravděpodobně dimery peptidu 1.

Následně byl cyklický peptid 1 přečištěn pomocí RP-HPLC. Chromatogram přečištěného finálního peptidu 1 je zázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9 - RP-HPLC cyklického peptidu 1 - provedeno na analytické koloně. Vlnová délka byla monitorována při 218 nm.

Přečištěný peptid 1 byl poté identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie (viz obrázek 10, str. 32).



Obrázek 10 - Hmotnostní spektrum purifikovaného cyklického peptidu 1. Teoretická relativní molekulová monoizotopická hmotnost (M_r) je 934,3353, což odpovídá signálu m/z 934,33648.

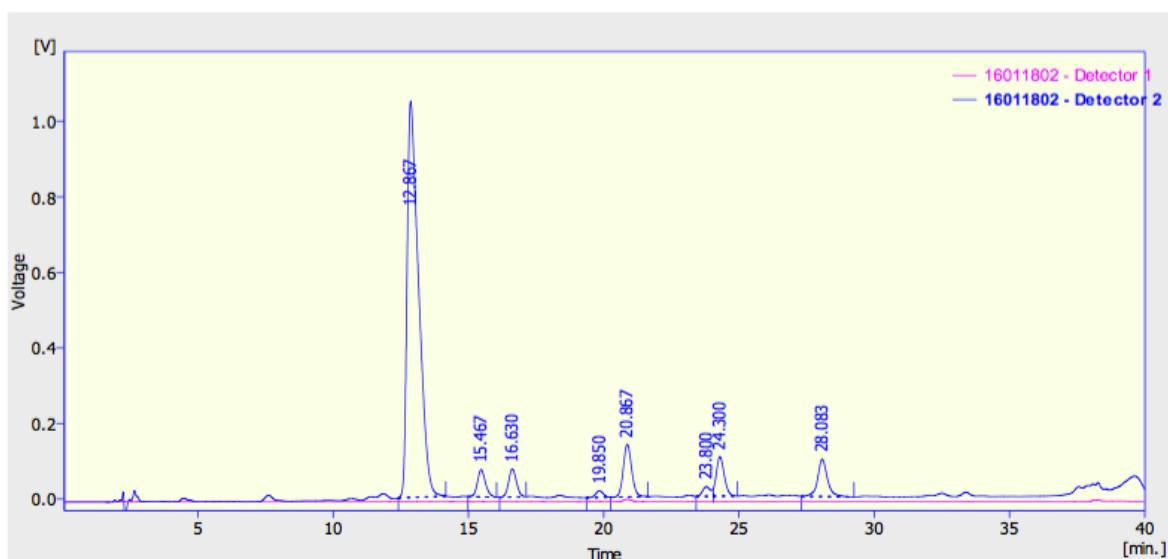
Celkově můžeme shrnout, že automatizovanou syntézou na pevné fázi bylo získáno 152 mg „surového“ lineárního peptidu 1 (162,3 μmol), což odpovídá 81,2 % výtěžku, neboť syntéza byla prováděna v měřítku 200 μmol . Následnou cyklizací 78 mg (83,3 μmol) lineárního peptidu 1 bylo získáno 17 mg cyklického peptidu 1 (18,2 μmol), což odpovídá 21,9 % výtěžku. Relativní molekulové hmotnosti spolu s výtěžky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. - Výtěžky a relativní molekulové hmotnosti lineárních a cyklických peptidů 1. M_r (teoretická) označuje vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost. M_r (experimentální) označuje experimentálně zjištěnou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

Peptid	M_r (teoretická)	M_r (experimentální)	Výtěžek
Lineární peptid 1	936,3510	936,3516	81,165 % (surový peptid)
Cyklický peptid 1	934,3353	934,3364	21,85 % (purifikovaný peptid)

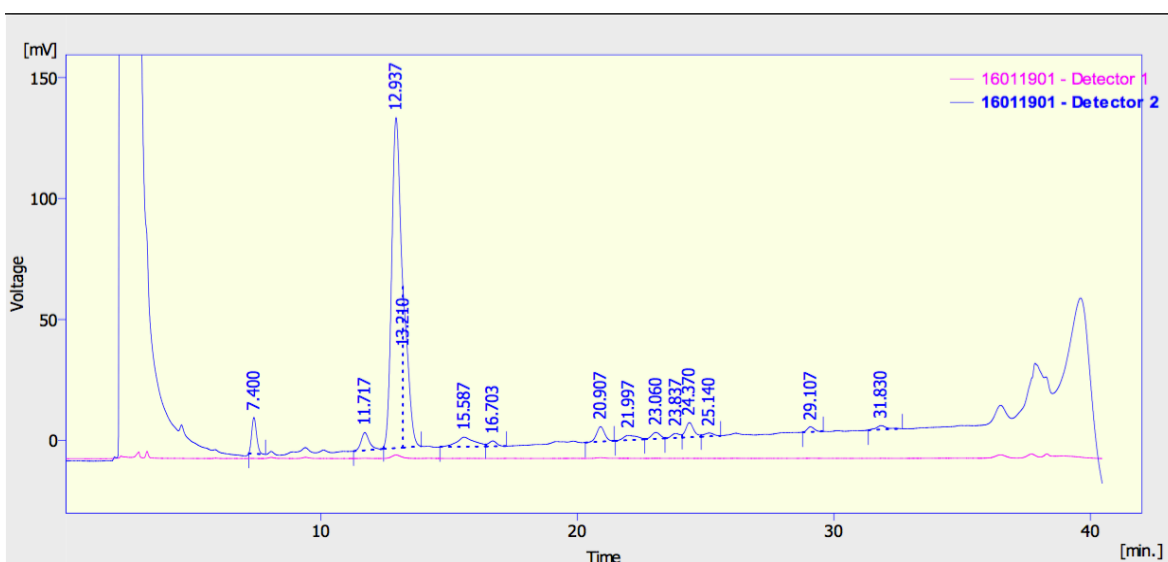
5.1.2 Syntéza peptidu 2

Analytický chromatogram surového lineárního peptidu 2 je znázorněn na obrázku 11. Produkt je eluován ve vrcholu v čase 12,867 min.



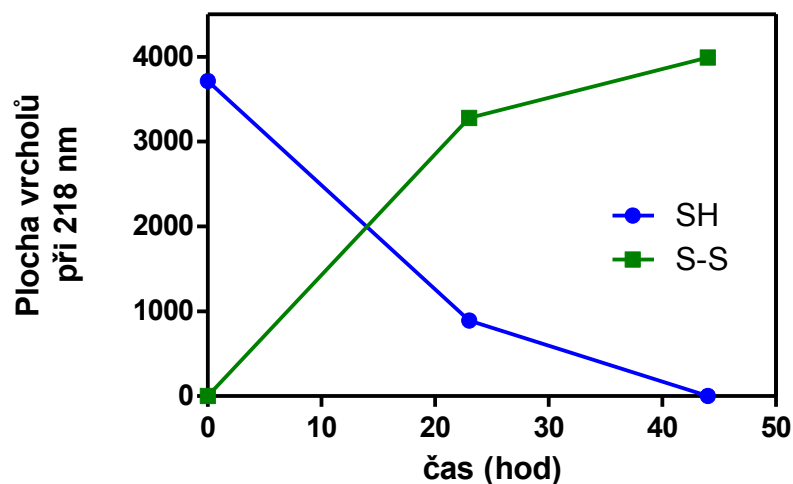
Obrázek 11 – Chromatogram analytické RP-HPLC surového lineárního peptidu 2 (G-F-F-C-T-P-C-T). Peptid je eluován v čase 12,867 min.

Peptid 2 byl poté oxidován, jak bylo popsáno v kapitole 4.2. Obrázek 12 zobrazuje oxidaci peptidu 2 po 23 hodinách, kdy ještě nebyla zcela ukončena.



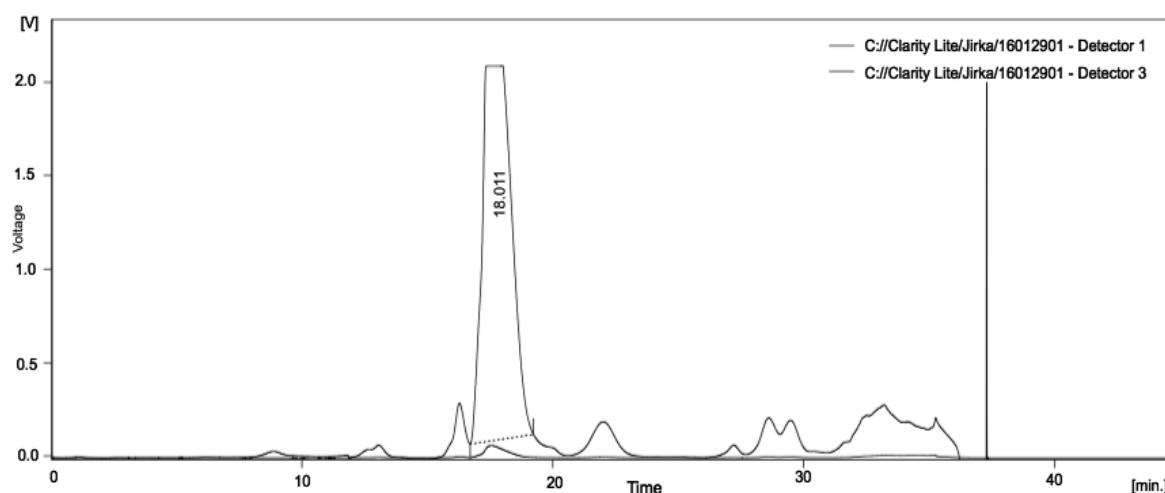
Obrázek 12 - RP-HPLC peptidu 2 po 23 hodinách oxidace. Výchozí lineární peptid má vrchol v čase 13,210 min. Produkt má vrchol v čase 12,937 min.

Průběh oxidace a její produkty byly analyzovány a vynášeny do přehledného schématu (obrázek 13). Výchozí lineární peptid s časem klesá se současným nárůstem cyklického peptidu. Oxidace v tomto případě probíhala zcela bez míchání.



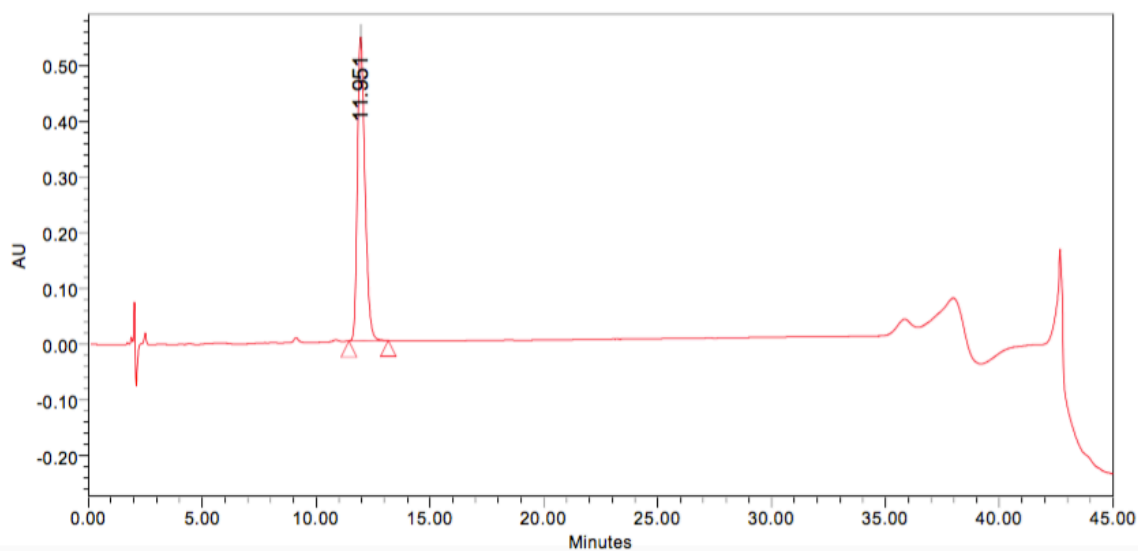
Obrázek 13. - Schéma průběhu oxidace peptidu 2. Modrá křivka reprezentuje výchozí lineární peptid 2 (SH), zelená křivka znázorňuje cyklický produkt peptidu 2 (S-S).

Po 48 hodinách byla oxidace ukončena. Plně oxidovaný peptid 2 je zobrazen na obrázku 14 (čas 18,011 min). Za povšimnutí stojí, že v případě cyklizace (oxidace) lineárního peptidu 2 nevznikaly dimery (obrázky 12, str. 33 a obrázek 14), jak tomu bylo při cyklizaci lineárního peptidu 1 (obrázek 8, str. 31).

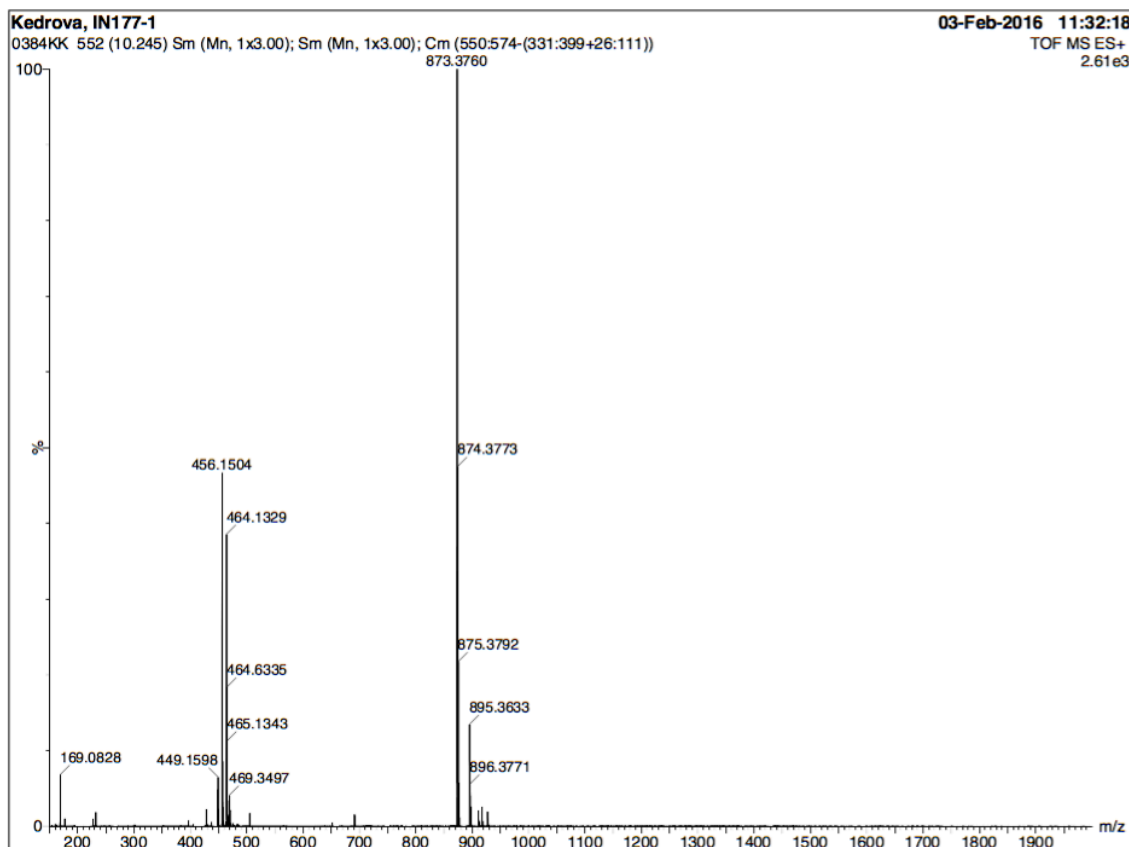


Obrázek 14. - HPLC plně oxidovaného peptidu 2 na preparativní koloně. Produkt oxidace má vrchol v čase 18,011 min.

Následovalo přečištění peptidu 2 a jeho identifikace. Chromatogram přečištěného peptidu 2, s jeho vrcholem v čase 11,951 min, je uveden na obrázku 15. Hmotnostní spektrum purifikovaného peptidu 2 je na obrázku 16 (str. 36) a v tomto jediném případě bylo provedeno na tandemovém hybridním hmotnostním spektrometru Q-TOF micro firmy Waters (Milford, USA).



Obrázek 15. – Chromatogram analytické RP-HPLC finálního cyklického peptidu 2. Absorbance byla monitorována při 218 nm.



Obrázek 16. - Hmotnostní spektrum cyklického peptidu 2 měřené na tandemovém hybridním hmotnostním spektrometru Q-TOF micro. Teoretická relativní molekulová monoizotopická hmotnost (v tomto případě MH^+) je 873,3277. Produktu tedy odpovídá m/z signál (MH^+) 873,3760. m/z signál 456,1504 pravděpodobně odpovídá dvojnásobně nabitému produktu s navázaným iontem draslíku.

Celkově můžeme shrnout, že manuální syntézou bylo získáno 130 mg „surového“ lineárního peptidu 2 (148,7 μmol), což odpovídá 74 % výtěžku, neboť syntéza byla prováděna v měřítku 200 μmol . Následnou cyklizací 65 mg surového lineárního peptidu 2 (74,3 μmol) bylo získáno 29,2 mg purifikovaného cyklického peptidu 2 (33,5 μmol), což odpovídá výtěžku 45 %. Relativní molekulové hmotnosti spolu s výtěžky jsou uvedeny v tabulce 4 (str. 37).

Tabulka 4. - Výtěžky a relativní molekulové hmotnosti peptidů 2. Mr (teoretická) označuje vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost. Mr (experimentální) označuje experimentálně zjištěnou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

Peptid	Mr (teoretická)	Mr (experimentální, po odečtení vodíkového protonu, H ⁺)	Výtěžek
Lineární peptid 2	874,3353	Nebylo určeno	74,34 % (surový peptid)
Cyklický peptid 2	872,3197	872,3680	45,02 % (purifikovaný peptid)

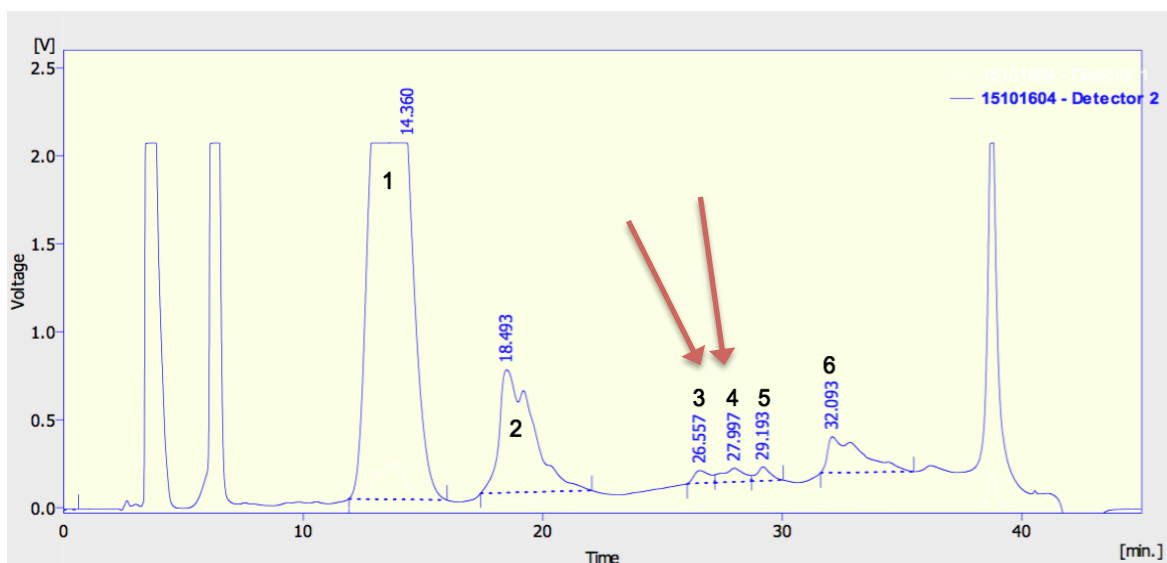
5.2 Semisyntéza insulinových analogů

Cyklické peptidy 1 a 2 byly využity pro enzymové semisyntézy analogů 1 a 2 popsané v kapitole 4.3. Průběh semisyntéz byl průběžně sledován pomocí RP-HPLC. Identifikace analogů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Obecně se pro obě semisyntézy dá konstatovat, že jejich průběh a analýzy jejich průběhu byly komplikovány nízkou rozpustností reaktantů, pravděpodobně hlavně cyklických peptidů 1 či 2. Velmi rychle po přidání všech složek došlo ke ztuhnutí reakční směsi, která byl jen obtížně rozmíchatelná.

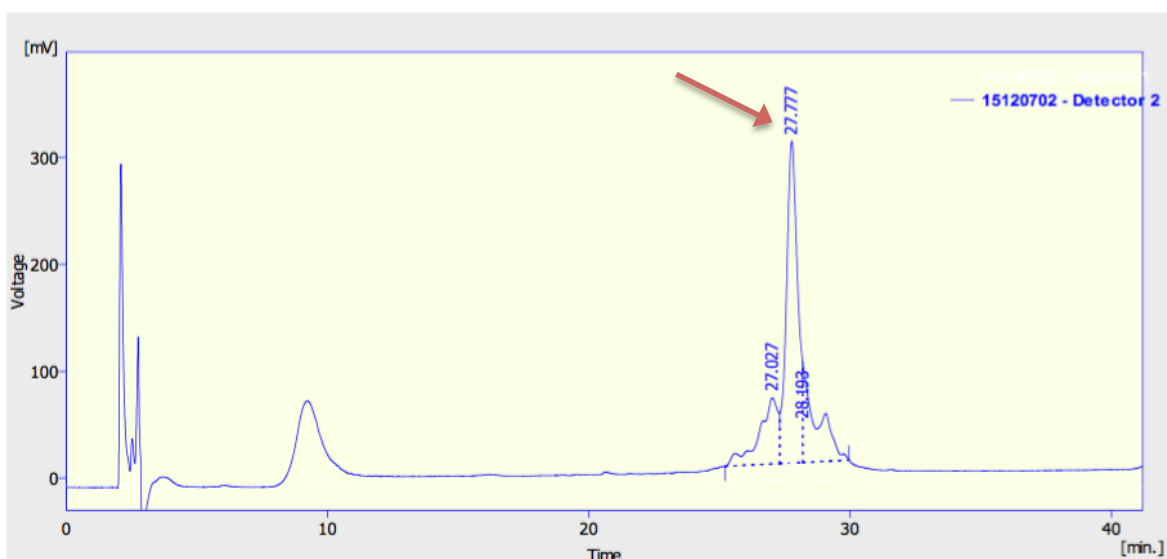
5.2.1 Semisyntéza analogu insulinu 1

Po ukončení semisyntézy byla směs analyzována pomocí RP-HPLC. Chromatogram purifikace reakční směsi po enzymové reakci je uveden na obrázku 17 (str. 38). Pro přehlednost jsou uvedena čísla jednotlivých frakcí. Produkt se nacházel ve frakcích 3 a 4 vyznačených šipkami na obrázku 17 (str. 38).

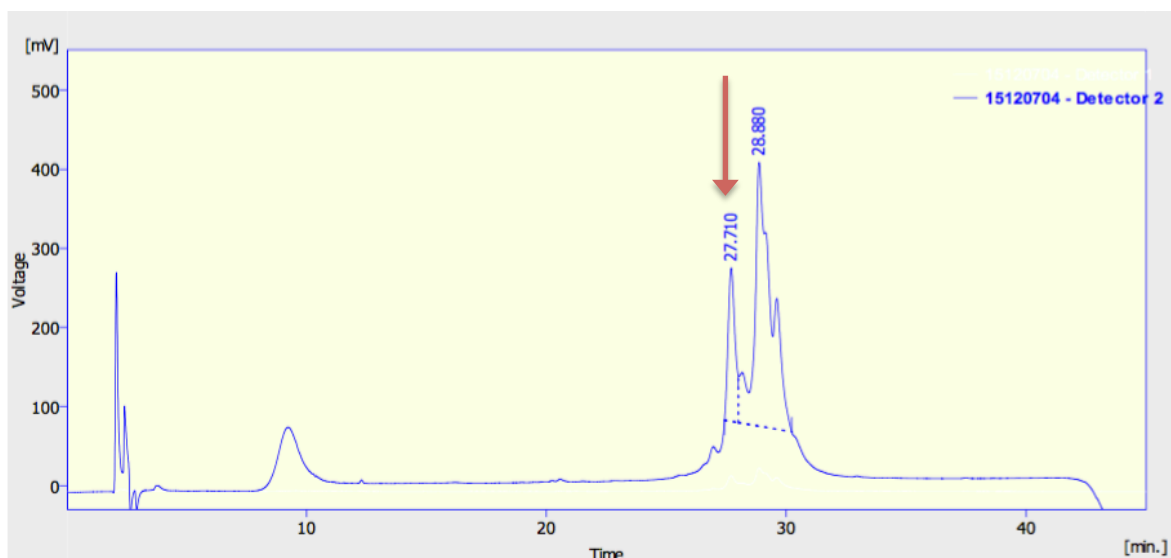


Obrázek 17. - Chromatogram RP-HPLC reakční směsi po enzymové semisyntéze analogu 1. Frakce 1 označuje peptid 1, frakce 2 byla identifikována jako DOI. Frakce 5 a 6 byly identifikovány jako nečistoty. Frakce 3, 4 byly identifikovány jako frakce s obsahem produktu a jsou označené červenou šipkou. Absorbance byla monitorována při 218 nm.

Frakce 3 a 4, ve kterých se nacházel produkt a jejichž chromatogramy jsou ukázány na následujících obrázcích 18 a 19 (str. 39), byly dále přečištěny.

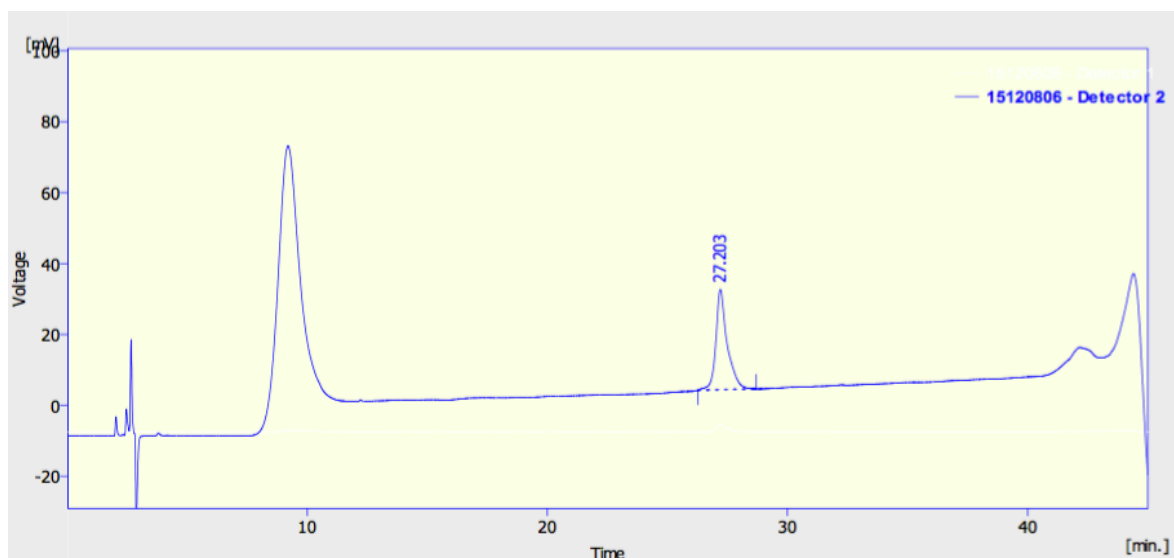


Obrázek 18. - RP-HPLC frakce 3. Produkt se nacházel ve vrcholu píku 2 s časem 27,777 min označeném červenou šipkou. Absorbance byla monitorována při 218 nm.



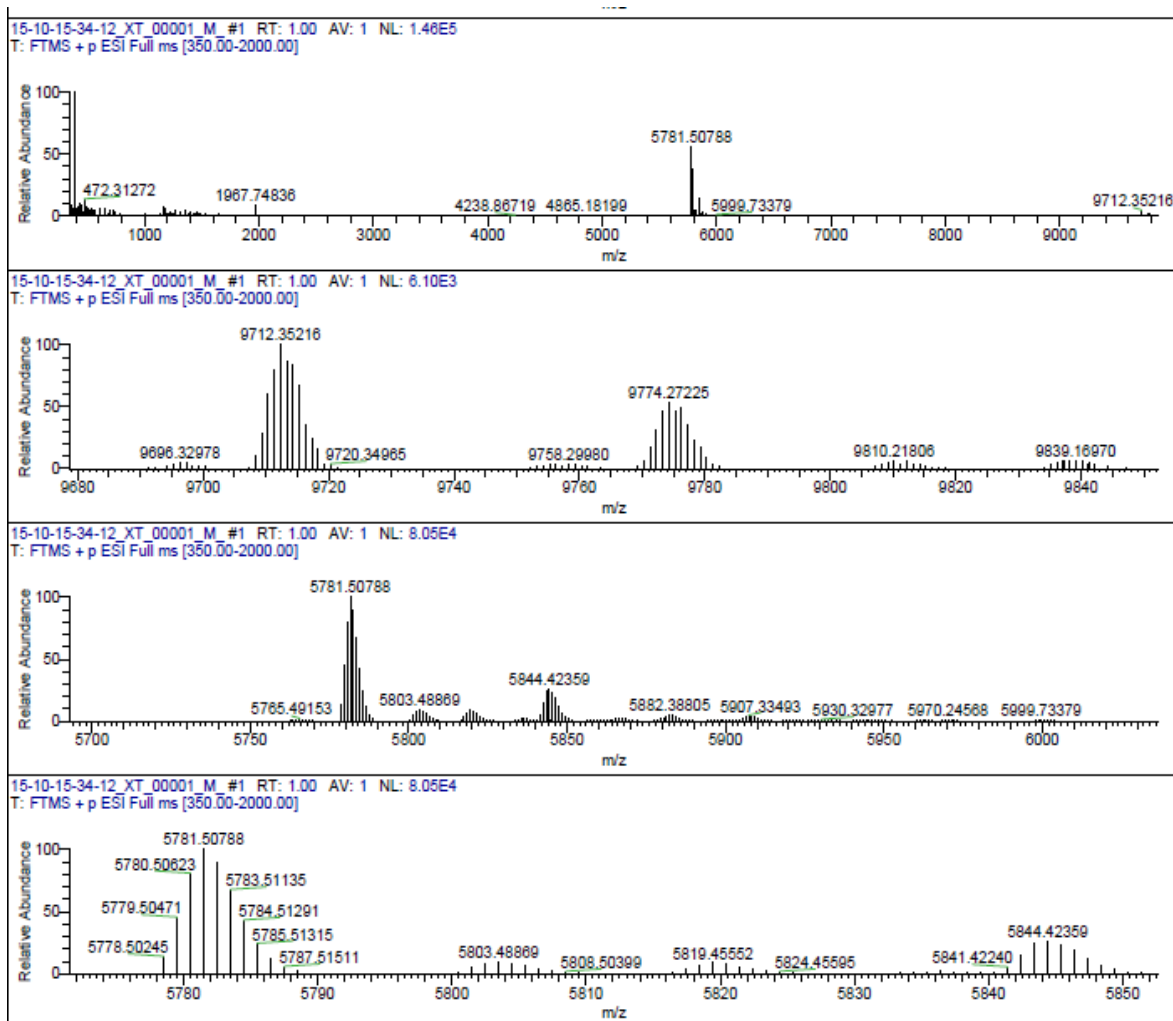
Obrázek 19. - RP-HPLC frakce 4. Produkt byl v píku 1 s vrcholem v čase 27,710 min označeném červenou šipkou. Absorbance byla monitorována při 218 nm.

Pík 2 z frakce 3 a pík 1 z frakce 4 obsahující produkt byly následně spojeny. Chromatogram výsledného purifikovaného analogu 1 je uveden na obrázku 20.



Obrázek 20. - RP-HPLC přečištěného produktu semisyntézy , analogu 1 (čas 27, 703 min). Absorbance byly monitorována při 218 nm.

Identita produktu byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie (obrázek 21, str. 40).



Obrázek 21 - Hmotnostní spektrum purifikovaného analogu insulinu 1. Teoretická relativní molekulová monoizotopická hmotnost (M_r) je 5778,4976 což odpovídá signálu m/z 5778,5025, který je viditelný v detailu spektra v levém dolním rohu obrázku.

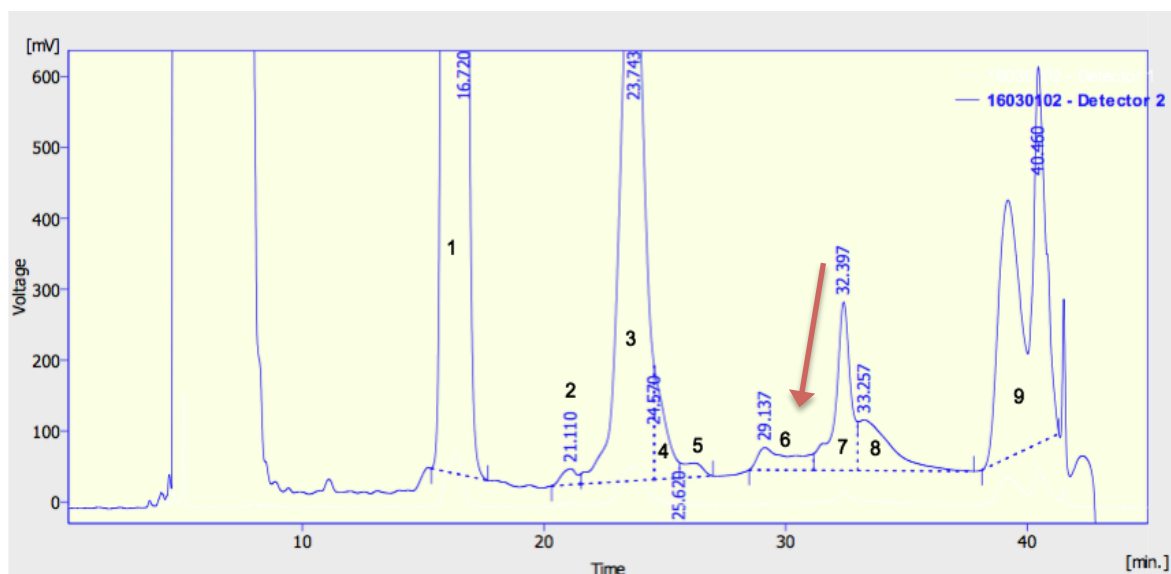
Celkově můžeme shrnout, že bylo získáno 49 μg finálního analogu 1 (0,00845 μmol), což odpovídá výtěžku 0,32 %. Výtěžek byl počítán vzhledem k limitující složce reakce DOI (2,67 μmol) a byl určen spektrofotometricky (viz kapitola 4.3.1.). Relativní molekulové hmotnosti a výtěžek jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 5 (str. 41).

Tabulka 5. - Výtěžek a relativní molekulové hmotnosti analogu insulinu 1. Mr (teoretická) označuje vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost. Mr (experimentální) označuje experimentálně zjištěnou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

	Mr (teoretická)	Mr (experimentální)	Výtěžek
Analog 1	5778,4976	5778,5025	0,32%

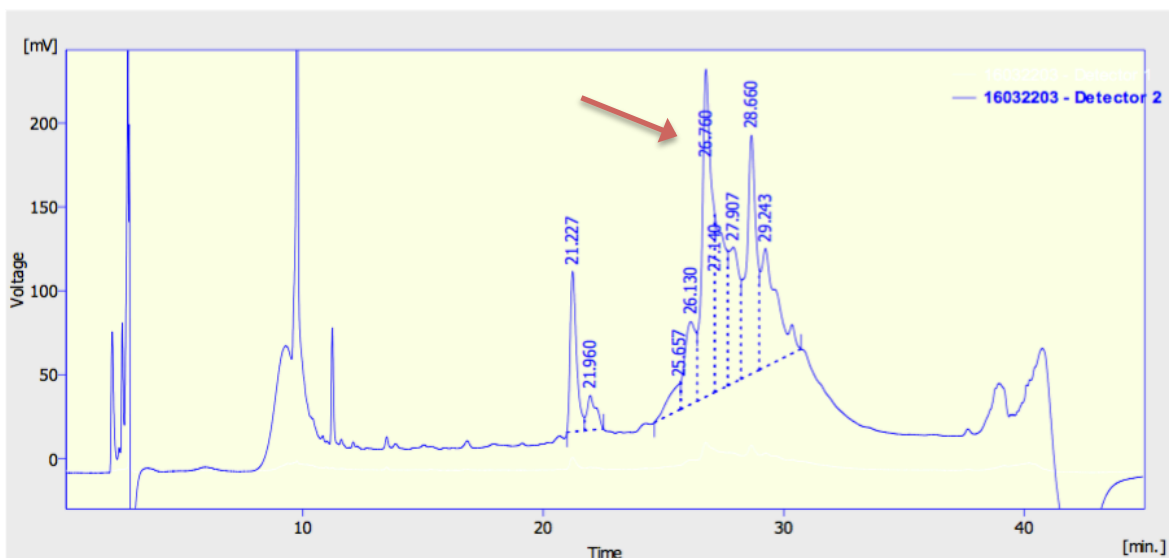
5.2.2 Semisyntéza analogu insulinu 2

Po ukončení semisyntézy analogu insulinu 2 byla směs preparována pomocí RP-HPLC. Chromatogram, s vyznačenými čísly odebíraných frakcí, je zobrazen na obrázku 22. Produkt s obsahem nečistot byl identifikován ve frakci 6 s retenčním časem 29,137 min. Frakce 1 byla identifikována jako peptid 2. Ve frakci 3 byl identifikován DOI. Ostatní frakce neobsahovaly ani produkt reakce ani jeho prekurzory.



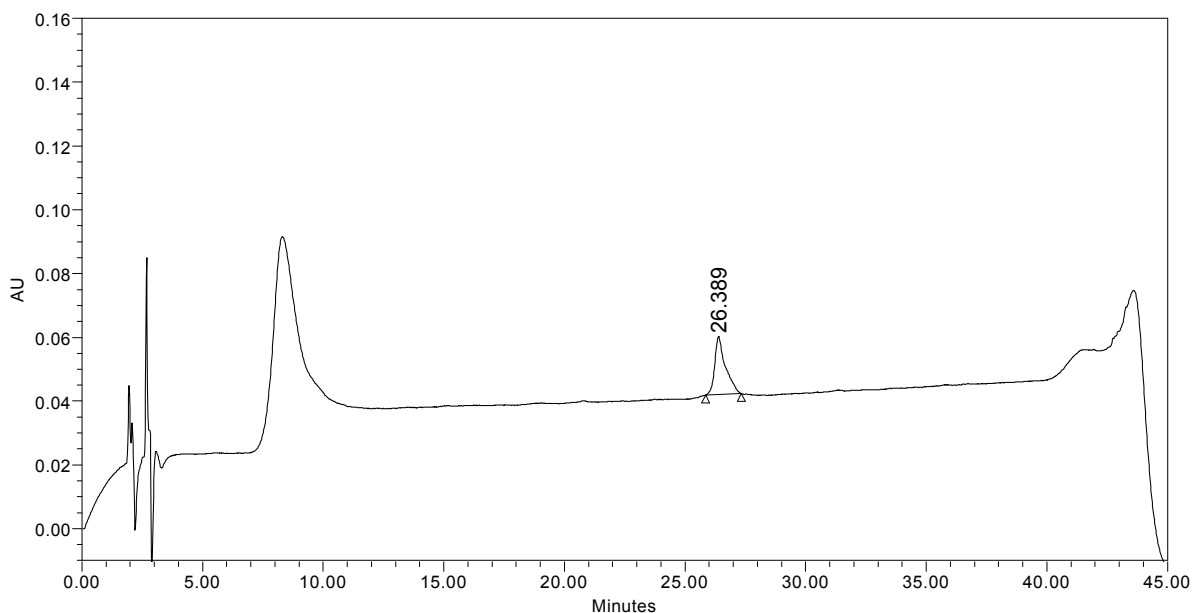
Obrázek 22. - RP-HPLC preparace reakční směsi po enzymové semisyntéze. Produkt s obsahem nečistot se nacházel ve frakci 6 označené červenou šipkou. Absorbance byla monitorována při 218 nm.

Frakce 6 byla dále purifikována, za účelem přečištění výsledného produktu (analogu 2). Chromatogram frakce 6 je znázorněn na obrázku 23 (str. 42). Produkt se nacházel v 5. píku frakce s časem 26,760 min.

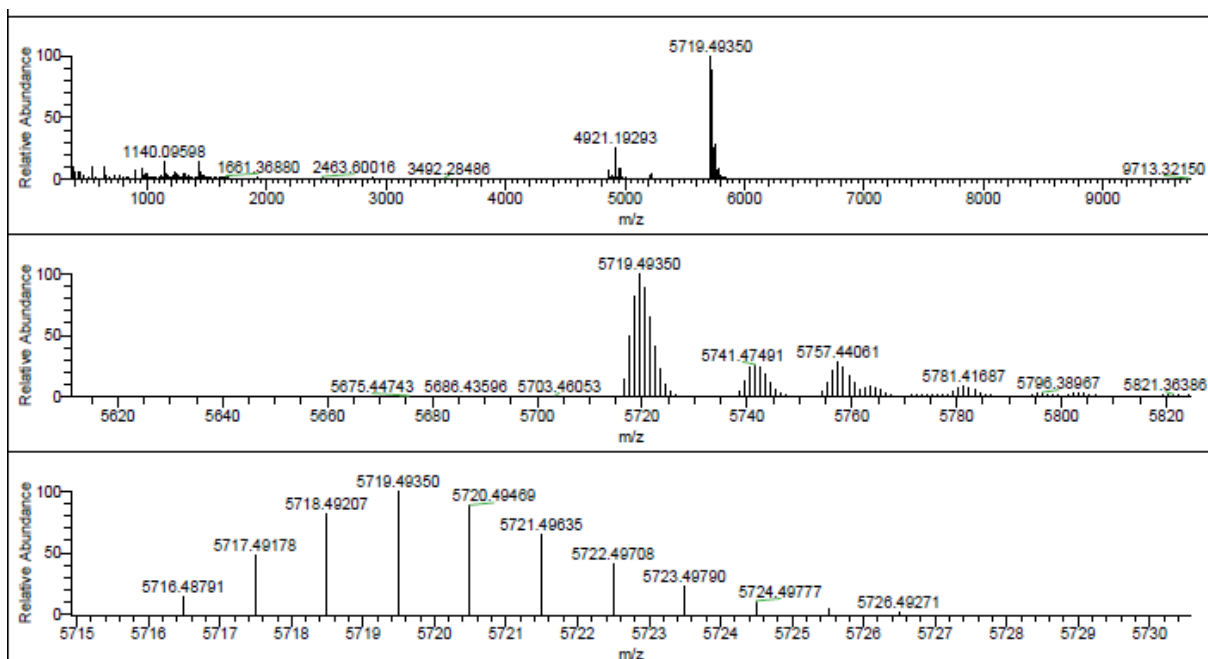


Obrázek 23. - Chromatogram RP-HPLC frakce 6. Produkt se nacházel v píku s vrcholem v čase 26,760 min. Absorbance byla monitorována při 218 nm.

Chromatogram finálního přečištěného analogu 2 je na obrázku 24 (pík s časem 26,389 min) a hmotnostní spektrum produktu na obrázku 25 (str. 43).



Obrázek 24. - RP-HPLC výsledného přečištěného analogu 2. Absorbance byla monitorována při 218 nm.



Obrázek 25 - Hmotnostní spektrum purifikovaného cyklického analogu 2. Teoretická relativní molekulová monoizotopická hmotnost (M_r) je 5716,4820 což odpovídá signálu m/z 5716,4879, který je viditelný v detailu spektra v levé dolní části obrázku.

Celkově můžeme shrnout, že bylo získáno 19 μg analogu insulinu 2 (0,00336 μmol), což odpovídá 0,068% výtěžku. Výtěžek byl vypočítán na základě limitující složky DOI (4,95 μmol) a byl určen spektrofotometricky (viz kapitola 4.3.2.). Relativní molekulové hmotnosti a výtěžek jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. - Výtěžek a relativní molekulové hmotnosti analogu 2. M_r (teoretická) označuje vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost. M_r (experimentální) označuje experimentálně zjištěnou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

	M_r (teoretická)	M_r (experimentální)	Výtěžek
Analog 2	5716,4820	5716,48791	0,068%

5.3 Určení hodnot vazebných disociačních konstant analogů insulínu 1 a 2 vůči oběma izoformám receptoru insulínu

V poslední fázi experimentů byly určeny hodnoty disociačních konstant (K_d) obou analogů insulínu vůči izoformám IR-A a IR-B receptoru insulínu.

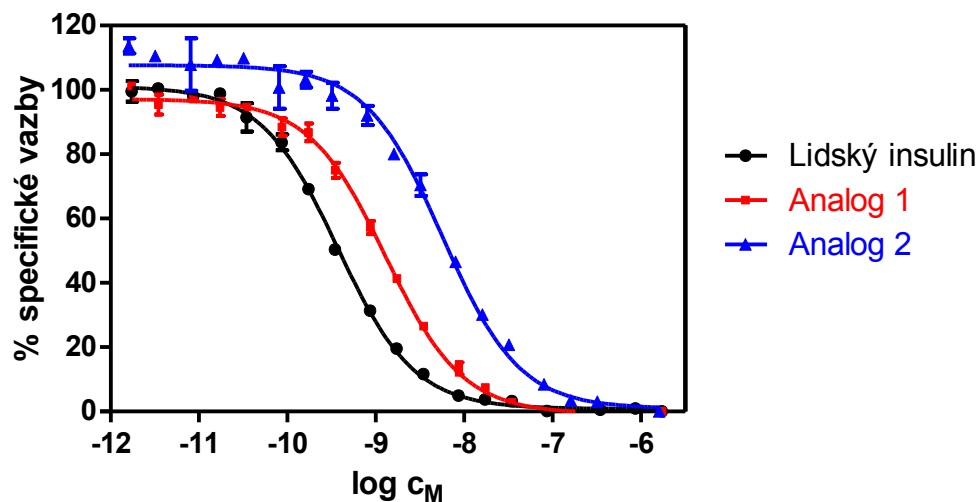
Při testování vazebné afinity k IR-A byly insulinové analogy testovány na buněčné linii lidských lymfocytů IM-9, která exprimuje výhradě IR-A, podle postupu popsaného v kapitole 4.5.3. Vazebné testy byly prováděny v duplikátech. U analogu 1 ve dvou opakováních a u analogu 2 pouze jednou. Insulin byl testován čtyřikrát. Ze získaných dat byly vytvořeny vazebné křivky pomocí programu GraphPad Prism 5 a programu Excel, jak je taktéž popsáno v kapitole 4.5.2.

K vazebným testům připravených insulinových analogů k IR-B byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů s blokovanou expresí genů pro myší IGF-1R a transfekovaná lidským IR-B (R/IR-B), jak bylo popsáno v kapitole 4.5.5. Testování bylo prováděno v duplikátech. U analogu 1 dvakrát a analogu 2 jednou. Insulin byl testován čtyřikrát.

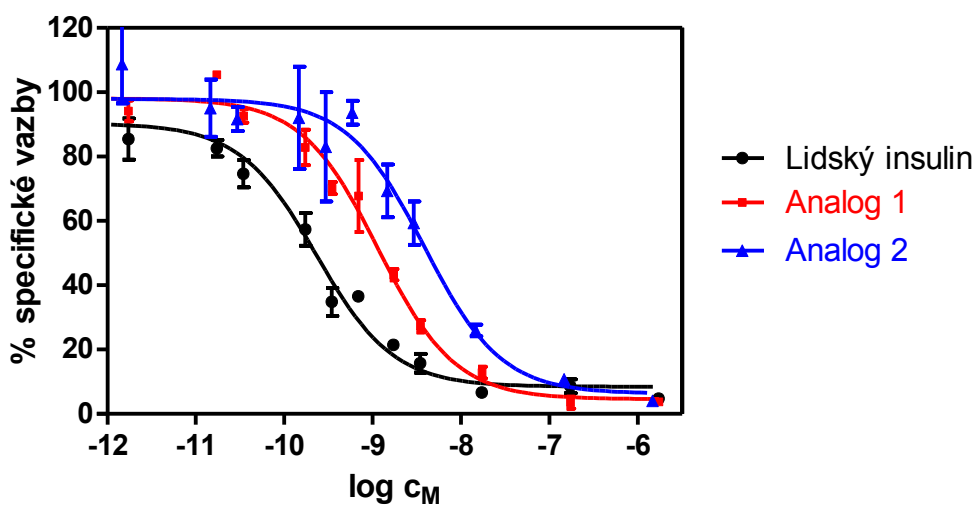
Následně byly určeny disociační konstanty (K_d) obou analogů insulínu. Afinity analogů jsou vždy počítány vůči 100% afinitě lidského insulínu. Vazebné afinity a hodnoty K_d jsou uvedeny v tabulce 7 (str. 45). Reprezentativní vazebné křivky jsou uvedeny na obrázcích 26 a 27 (str. 46).

Tabulka 7. – Hodnoty disociačních konstant analogů 1 a 2 vůči IR-A v membránách lidských IM-9 lymfocytů a vůči IR-B v membránách myších fibroblastů transfekovaných lidským IR-B a hodnoty relativních vazebných afinit (v %) obou analogů vztažené k vazebné afinitě lidského insulinu. Relativní vazebná afinita je vypočítána podle následujícího vzorce: K_d (lidský insulin) / K_d (analog) * 100 (%). n je počet vazebných křivek ze kterých byly hodnoty určeny (viz kapitola 4.5.). ^a V tomto případě byla hodnota K_d vypočítána ze čtyř hodnot (vazebných křivek) a má zde charakter střední hodnoty ± standardní chyba. ^b V tomto případě byla hodnota K_d vypočítána ze dvou hodnot (vazebných křivek) a má zde charakter průměru ± rozptyl obou hodnot. ^c V tomto případě byla hodnota K_d určena jen z jedné vazebné křivky.

Protein	K_d (nM) vůči IR-A	Relativní vazebná afinita [%]	K_d (nM) vůči IR-B	Relativní vazebná afinita [%]
Lidský insulin	0,34 ± 0,01 (n=4) ^a	100 ± 2,9	0,47 ± 0,19 (n=3) ^a	100 ± 40
Analog 1	1,24 ± 0,01 (n=2) ^b	27 ± 0,8	1,08 ± 0,09 (n=2) ^b	43,5 ± 8,3
Analog 2	5,5 (n=1) ^c	6,2	3,26 (n=1) ^c	14,4



Obrázek 26. Inhibice vazby lidského [¹²⁵I]monoiodotyrosylA14-insulinu na lidský IR-A v membránách lidských IM-9 lymfocytů lidským insulinem (černě), analogem insulinu 1 (červeně) a analogem insulinu 2 (modře). Jsou ukázány reprezentativní křivky pro každý z analogů a lidský insulin.



Obrázek 27. Inhibice vazby lidského [¹²⁵I]monoiodotyrosylA14-insulinu na lidský IR-B v membránách myších fibroblastů lidským insulinem (černě), analogem insulinu 1 (červeně) a analogem insulinu 2 (modře). Jsou ukázány reprezentativní křivky pro každý z analogů a lidský insulin.

Relativní vazebná afinita obou analogů vůči receptorům insulinu byla ve srovnání s lidským insulinem snížena, a to více u analogu insulinu 2 než u analogu insulinu 1. Insulinový analog 1 vykazuje vůči IR-A asi čtvrtinu vazebné afinity lidského insulinu a insulinový analog 2 pouze asi 6% vazebné afinity lidského insulinu. Avšak u obou analogů insulinu je jejich relativní afinita k IR-B ve srovnání s lidským insulinem vyšší než k IR-A. Analog 1 vykazuje vůči IR-B asi 43% vazebné afinity lidského insulinu a analog 2 asi 14%. V důsledku vyšší afinity analogů vůči IR-B má analog 1 poměr relativních vazebných afinit IR-B/IR-A $1,6 \pm 10,4$ a analog 2 poměr 2,3. Oba analogy tedy vykazují ve srovnání s lidským insulinem, který je zde referenční molekulou, jistou vazebnou selektivitu vůči IR-B.

6. Diskuze

Existence dvou izoforem receptoru insulínu, IR-A a IR-B, jejich rozdílné tkáňové zastoupení a pravděpodobně i jejich rozdílné fyziologické funkce vedou v posledních letech ke snaze vyvinout takové analogy insulínu, které by se preferenčně vázaly na izoformu IR-B, která se nachází převážně v játrech, svalové a tukové tkáni[17], [18]. Svalová a tuková tkáň obsahují insulínem regulovaný glukózový přenašeč GLUT-4, který je aktivován přímo insulínem jako odpověď na vyšší hladinu krevní glukózy. Do svalů a tukové tkáně tedy glukóza vstupuje primárně jako odpověď na insulín. Játra neobsahují GLUT-4, ale GLUT-2, který není insulínem regulovaný. Do jater tedy glukóza nevstupuje jako odpověď na působení insulínu, ale pasivně. *In vivo* jsou ale játra prvním místem působení insulínu kam se dostává bezprostředně po sekreci ze slinivky. V játrech prostřednictvím IR-B hepatocytů insulín indukuje řadu důležitých dějů, z nichž je nejdůležitější inhibice enzymů glukoneogeneze a tím inhibice syntézy glukózy v játrech a jejímu uvolňování do cirkulace. Inhibicí glukoneogeneze tedy insulín v játrech přispívá k snížení koncentrace krevní glukózy, zatímco ve svalové a tukové tkáni aktivně zprostředkovává její vstup do buněk. Insulín je podáván pacientům vpichem subkutánně pod kůži, tudíž do periferie organismu. Jeho prvním cílem tedy nejsou primárně játra jako při normálním fyziologickém působení a nedochází tedy ihned k inhibici glukoneogeneze. Insulín navíc může v periferních tkáních také působit více na zde hojně zastoupenou izoformu IR-A, která je považována za izoformu zprostředkovávající spíše mitogenní než metabolické efekty insulínu. Analog insulínu, který by se preferenčně vázal na IR-B a méně na IR-A by měl tedy větší šanci napodobit fyziologické působení insulínu a jeho podávání by tedy bylo i pro pacienty bezpečnější[17][18].

Laboratoř Dr. Jiráčka v ÚOCHB nedávno publikovala sérii připravených insulínových analogů s přemostěním C-konce B-řetězce pomocí triazolového můstku[27]. Jeden z analogů s triazolovým můstkem v polohách B26 a B29 (obrázek 3B, str. 15) vykazoval velmi vysokou afinitu vůči oběma izoformám IR, ale hlavně vůči IR-B (asi 550% insulínu). Výsledkem byl poměr relativních vazebných afinit IR-B/IR-A asi 2,6 ve srovnání s lidským insulínem, u kterého je tato hodnota 1. Jistého úspěchu při modulaci vazebné selektivity analogů insulínu jsme dosáhli i v roce 2014,

kdy jsme připravili analog insulínu s asparaginem v poloze B26[31]. Inkorporace Asn do polohy B26 vedla k ohybu C-konce řetězce B, podobně jako tomu bylo u analogů s triazolovým můstkem[27]. Tento analog AsnB26 byl v jádru ekvipotentní s lidským insulínem a vykazoval poměr relativních vazebných afinit IR-B/IR-A asi 1,7. Na základě těchto výsledků a pozorování, bylo cílem vyzkoušet strukturní analogii s přemostěním C-konce řetězce B insulínu za použití disulfidického můstku. Inspirací k tomuto cíli byly také poznatky týmu firmy Novo Nordisk A/S, která již vytvořila řadu aktivních insulínových analogů se čtvrtým disulfidickým můstkem, avšak přímo se nevěnovala C-konci řetězce B. Výhodou inkorporace dvou cysteinů do C-konce řetězce B insulínu a jejich oxidace na cystin by bylo, že se jedná o přirozené aminokyseliny, takže by výsledný analog mohl být připravován i rekombinantně, pokud by byl farmaceuticky zajímavý.

Automatická syntéza lineárního peptidu 1 na pevné fázi proběhla s výtěžkem asi 81 % („surový“ peptid) a po jeho cyklizaci byl výtěžek purifikovaného peptidu 1 po oxidační reakci asi 22 %. Syntéza lineárního peptidu 2 proběhla s výtěžkem „surového“ peptidu asi 74 %. Výtěžek finálního purifikovaného peptidu 2 byl asi 45 %. Lineární peptidy 1 a 2 nebyly purifikovány, aby se zabránilo jejich nespecifické oxidaci (formace cystinu) během purifikace.

U manuální syntézy lineárního peptidu 2 byla jeho finální čistota nižší než u lineárního peptidu 1 syntetizovaného automaticky, nicméně uspokojující. Důvodem nižší čistoty u peptidu 2 může být právě jeho příprava pomocí manuální syntézy, která probíhá pomaleji a je zde vyšší pravděpodobnost vedlejších reakcí jako je např. racemizace. Oproti automatické syntéze také může růst pravděpodobnost malých chyb díky lidskému faktoru, kdy spíše dojde při práci k možnému znečištění reakční směsi či nepřesnému dávkování reaktantů.

Pro cyklizaci peptidů a zároveň jako rozpouštědlo byl použit DMSO v mírně kyselém prostředí. DMSO je znám jako mírný oxidant podporující tvorbu disulfidických můstků vzdušným kyslíkem v peptidech[32][33]. Výhodou použití DMSO jako solventu je i možnost jeho odstranění lyofilizováním. Odpařování na vakuové odparce je obtížné z důvodu vysokého bodu varu DMSO (189°C). Nižší výtěžek cyklizace lineárního peptidu 1 byl způsoben tím, že to byl první pokus cyklizace tohoto typu, a postupy byly teprve testovány a optimalizovány. V tomto

případě bylo rozpouštědlo DMSO z reakční směsi postupně „odlyofilizováno“, kdežto v druhém případě (cyklizace lineárního peptidu 2) bylo využito kolony s C18 sorbentem k jeho elegantnějšímu a k peptidu šetrnějšímu odstranění (viz kapitola 4.2.2.). Výtěžek po první cyklizaci (peptid 1) byl proto nižší, protože při zdlouhavé lyofilizaci DMSO docházelo ke ztrátám. V druhém případě jsme již věděli jakým způsobem postupovat a odstranili jsme DMSO po zachycení peptidu na C18 sorbent, a proto i finální výtěžek peptidu 2 je viditelně (dvakrát) vyšší. V případě lineárního peptidu 1 jsme také reakční směs prvních 22 h míchali, což přispělo k vzniku dimerů insulinu (obr. 6, str. 29 a obr. 7, str. 30). V druhém případě byla reakce nechána stát bez míchání a vznikal v podstatě jen oxidovaný monomer insulinu (obr. 12, str. 33 a obr. 13, str. 34).

Syntetizované cyklické peptidy 1 a 2 byly následně využity pro enzymovou semisyntézu analogů 1 a 2. Analog 1 byl připraven s výtěžkem 0,32 % (pouze 49 μg) a analog 2 s výtěžkem 0,068 % (pouze 19 μg). Nízké výtěžky analogů insulinu byly nejspíše způsobeny jejich špatnou rozpustností v semisyntetické reakční směsi. V případě obou reakcí došlo po smíchání takřka okamžitě k ztuhnutí reakční směsi. Toto ztuhnutí může být zapříčiněno specifickým charakterem cyklických peptidů 1 a 2, tzn. jejich malou rozpustností za daných podmínek. Zajímavé je, že jsme také museli přidávat relativně vyšší množství N-methylmorpholinu (asi 5 μl), aby bylo upraveno pH na hodnotu 7. To by mohlo být způsobeno použitím DOI purifikovaného za pomoci HPLC. I po lyofilizaci mohlo v lyofilizátu DOI zůstat jisté množství zbytkové TFA, která tak mohla přispět k vyšší počáteční kyselosti reakční směsi a nižší rozpustnosti reaktantů již se nepodařilo zvrátit přidáním N-methylmorpholinu.

Oba analogy insulinu měly v důsledku obtížného průběhu jejich semisyntetické přípravy velmi nízké výtěžky, získaná množství však stačila k vazebným testům. V případě analogu 1 získané množství stačilo pro dvě vazebné křivky (každá z duplicitních bodů) pro každou z izoform IR. V případě analogu 2 jeho získané množství stačilo pouze pro jednu vazebnou křivku (z duplicitních bodů) pro každou z izoform IR. Dvě či dokonce jen jedna vazebná křivka nejsou postačující pro správné statistické vyhodnocení výsledků (střední hodnota \pm standardní chyba), ale i tak poskytly informaci o vlastnostech analogů.

Oba analogy insulínu byly následně testovány k určení specifity vůči IR-A a IR-B izoformě receptoru. Oba insulinové analogy, jak vůči IR-A tak IR-B, měly zřetelně nižší vazebnou afinitu vzhledem k insulínu, nicméně stále v nanomolárních koncentracích. Nicméně jejich vazebné afinity k IR-B byly v obou případech méně snižené než k IR-A ve srovnání s lidským insulínem. Poměr vazebných afinit pro IR-B a IR-A (IR-B/IR-A) byl měl u analogu 1 hodnotu 1,6 a u analogu 2 hodnotu 2,3. Pro referenční lidský insulín je tato hodnota poměru jeho vazebných afinit 1. To znamená, že zejména u analogu 2 došlo k zajímavému posunu jeho vazebné selektivity vůči IR-B, a to na úroveň analogu s triazolovým můstkem (Ref. [27]) diskutovaném výše, i když analog 2 připravený v této práci má zřetelně nižší afinity vůči receptorům než analog s triazolovým můstkem. Analog 1 vykazuje poměr afinit IR-B/IR-A v hodnotě asi 1,6 což je podobné AsnB26-insulínu citovanému výše[31]. Je také zajímavé, že vyšší vazebnou selektivitu poskytl analog 2 s cysteiny v polohách 26 a 29, což byly výchozí pozice pro přemostění i v případě insulinového analogu s triazolovým můstkem a stejnou selektivitou[27].

I přes syntetické potíže a nízké výtěžky analogů se nám tedy podařilo dosáhnout zajímavých výsledků, které by mohly vyústit v návrh a přípravu dalších analogů s vyšší selektivitou vůči IR-B. V laboratoři Dr. Jiráčka bylo nedávno zjištěno, že prodloužení C-konce řetězce B insulínu o jednu či dvě aminokyseliny zřetelně zvyšuje selektivitu analogů ve prospěch IR-B (nepublikované výsledky, manuskript v revizích). Dalším experimentálním postupem by tedy mohlo být např. prodloužení C-konce řetězce B s posunutím disulfidického můstku do poloh 28-31 či 29-31.

7. Souhrn

V této bakalářské práci byly připraveny dva analogy insulínu s disulfidickým můstkem na C-konci řetězce B. Analog 1 s disulfidickým můstkem mezi aminokyselinami B27 a B29 a analog 2 s disulfidickým můstkem mezi polohami B26 a B29. I přes jejich nízké výtěžky byla u obou analogů určena vazebná afinita vůči IR-A a IR-B. Poměr vazebných afinit IR-B/IR-A měl v případě analogu 1 hodnotu 1,6 a v případě analogu 2 hodnotu 2,3, což je oproti hodnotě lidského insulínu 1 v obou případech více selektivní vůči IR-B, avšak absolutně byla hodnota afinit k jednotlivým izoformám vůči insulínu viditelně nižší. Lze tedy říci, že tato analogie na základě poznatků s přemostěním pomocí triazolového můstku přinesla obzvláště v případě analogu 2 obdobnou selektivitu. I přes jisté komplikace během semisyntézy a nízké výtěžky jsou tyto výsledky hodnotné a přispěly k tomu, že jsme se naučili připravovat insulinové analogy se čtvrtým disulfidickým můstkem. Do budoucna lze poznatky z této práce využít k přípravě analogů s prodlouženým C-koncem řetězce B a posunutým disulfidického můstku do poloh 28-31 či 29-31, které by mohly umožnit výraznější zvýšení afinity a selektivity vůči IR-B.

8. Reference

- [1] J. H. Jones, „A short guide to abbreviations and their use in peptide science“, *Journal of Peptide Science*, roč. 5, č. 11, s. 465–471, 1999.
- [2] T. L. Blundell, J. F. Cutfield, E. J. Dodson, G. G. Dodson, D. C. Hodgkin, a D. A. Mercola, „Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals“, *Nature*, roč. 224, č. 5218, s. 491–495, 1969.
- [3] X. Chang, A. M. M. Jørgensen, P. Bardrum, a J. J. Led, „Solution structures of the R6 human insulin hexamer“, *Biochemistry*, roč. 36, č. 31, s. 9409–9422, 1997.
- [4] J. Suckale a M. Solimena, „The insulin secretory granule as a signaling hub“, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, roč. 21, č. 10, s. 599–609, 2010.
- [5] D. E. Moller, A. Yokota, J. F. Caro, a J. S. Flier, „Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man.“, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, roč. 3, č. 8, s. 1263–1269, 1989.
- [6] L. Žáková a J. Jiráček, „Biosynthesis, secretion and degradation of insulin“, *Chemické Listy*, roč. 99, č. 11, s. 772–781, 2005.
- [7] A. Ullrich, J. R. Bell, E. Y. Chen, R. Herrera, L. M. Petruzzelli, T. J. Dull, A. Gray, L. Coussens, Y. C. Liao, M. Tsubokawa, A. Masson, P. H. Seeburg, C. Grunfeld, O. M. Rosen, a J. Ramachandran, „Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes“, *Nature*, roč. 313, č. 6005, s. 756–761, 1985.
- [8] J. Boucher, A. Kleinridders, a C. R. Kahn, „Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states“, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, roč. 6, č. 1, 2014.
- [9] M. Pollak, „Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia.“, *Nature reviews. Cancer*, roč. 8, č. 12, s. 915–928, 2008.
- [10] K. Talbot, H. Y. Wang, H. Kazi, L. Y. Han, K. P. Bakshi, A. Stucky, R. L. Fuino, K. R. Kawaguchi, A. J. Samoyedny, R. S. Wilson, Z. Arvanitakis, J. A. Schneider, B. A. Wolf, D. A. Bennett, J. Q. Trojanowski, a S. E. Arnold, „Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline“, *Journal of Clinical Investigation*, roč. 122, č. 4, s. 1316–1338, 2012.

- [11] N. M. McKern, M. C. Lawrence, V. A. Streltsov, M.-Z. Lou, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, T. C. Elleman, K. M. Richards, J. D. Bentley, P. A. Pilling, P. A. Hoyne, K. A. Cartledge, T. M. Pham, J. L. Lewis, S. E. Sankovich, V. Stoichevska, E. Da Silva, C. P. Robinson, M. J. Frenkel, L. G. Sparrow, R. T. Fernley, V. C. Epa, a C. W. Ward, „Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation.", *Nature*, roč. 443, č. 5106, s. 218–221, 2006.
- [12] J. Whittaker, L. J. Whittaker, C. T. Roberts, N. B. Phillips, F. Ismail-Beigi, M. C. Lawrence, a M. A. Weiss, „ α -Helical element at the hormone-binding surface of the insulin receptor functions as a signaling element to activate its tyrosine kinase", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 109, č. 28, s. 11166–11171, 2012.
- [13] S. Seino, M. Seino, S. Nishi, a G. I. Bell, „Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 86, č. 1, s. 114–118, 1989.
- [14] S. G. Vienberg, S. D. Bouman, H. Sørensen, C. E. Stidsen, T. Kjeldsen, T. Glendorf, A. R. Sørensen, G. S. Olsen, B. Andersen, a E. Nishimura, „Receptor-isoform-selective insulin analogues give tissue-preferential effects", *Biochemical Journal*, roč. 440, č. 3, s. 301–308, 2011.
- [15] J. P. Mayer, F. Zhang, a R. D. DiMarchi, „Insulin structure and function", *Biopolymers - Peptide Science Section*, roč. 88, č. 5. s. 687–713, 2007.
- [16] Wikipedia, „https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin_analog", *Wikipedia*, 2016. [Online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin_analog. [Viděno: 12-kvě-2016].
- [17] D. H. Bedinger a S. H. Adams, „Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators", *Molecular and Cellular Endocrinology*, roč. 415. s. 143–156, 2015.
- [18] R. Herring, R. H. Jones, a D. L. Russell-Jones, „Hepatospecificity and the evolution of insulin", *Diabetes, Obesity and Metabolism*, roč. 16, č. 1. s. 1–8, 2014.
- [19] P. De Meyts, „Insulin and its receptor: Structure, function and evolution", *BioEssays*, roč. 26, č. 12. s. 1351–1362, 2004.

- [20] P. De Meyts, „The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling.", *Diabetologia*, roč. 37 Suppl 2, s. S135–S148, 1994.
- [21] C. Kristensen, T. Kjeldsen, F. C. Wiberg, L. Schäffer, M. Hach, S. Havelund, J. Bass, D. F. Steiner, a A. S. Andersen, „Alanine scanning mutagenesis of insulin", *Journal of Biological Chemistry*, roč. 272, č. 20, s. 12978–12983, 1997.
- [22] R. A. Pullen, D. G. Lindsay, S. P. Wood, I. J. Tickle, T. L. Blundell, A. Wollmer, G. Krail, D. Brandenburg, H. Zahn, J. Gliemann, a S. Gammeltoft, „Receptor-binding region of insulin.", *Nature*, roč. 259, č. 5542, s. 369–373, 1976.
- [23] L. Schäffer, „A model for insulin binding to the insulin receptor.", *European journal of biochemistry / FEBS*, roč. 221, č. 3, s. 1127–1132, 1994.
- [24] J. G. Menting, J. Whittaker, M. B. Margetts, L. J. Whittaker, G. K.-W. Kong, B. J. Smith, C. J. Watson, L. Žáková, E. Kletvíková, J. Jiráček, S. J. Chan, D. F. Steiner, G. G. Dodson, A. M. Brzozowski, M. A. Weiss, C. W. Ward, a M. C. Lawrence, „How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor.", *Nature*, roč. 493, č. 7431, s. 241–245, 2013.
- [25] P. De Meyts, „Insulin/receptor binding: The last piece of the puzzle?: What recent progress on the structure of the insulin/ receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation.", *BioEssays*, roč. 37, č. 4, s. 389–397, 2015.
- [26] J. G. Menting, Y. Yang, S. J. Chan, N. B. Phillips, B. J. Smith, J. Whittaker, N. P. Wickramasinghe, L. J. Whittaker, V. Pandyarajan, Z.-L. Wan, S. P. Yadav, J. M. Carroll, N. Strokes, C. T. Roberts, F. Ismail-Beigi, W. Milewski, D. F. Steiner, V. S. Chauhan, C. W. Ward, M. A. Weiss, a M. C. Lawrence, „Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 111, č. 33, s. E3395–E3404, 2014.
- [27] J. Viková, M. Collinsová, E. Kletvíková, M. Buděšínský, V. Kaplan, L. Žáková, V. Veverka, R. Hexnerová, R. J. T. Aviñó, J. Straková, I. Selicharová, V. Vaněk, D. W. Wright, C. J. Watson, J. P. Turkenburg, A. M. Brzozowski, a J. Jiráček, „Rational steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking", *Scientific Reports*, roč. 6, s. 19431, 2016.

- [28] T. N. Vinther, T. B. Kjeldsen, K. J. Jensen, a F. Hubálek, „The road to the first, fully active and more stable human insulin variant with an additional disulfide bond", *Journal of Peptide Science*, roč. 21, č. 11, s. 797–806, 2015.
- [29] G. B. Fields a R. L. Noble, „Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids.", *International journal of peptide and protein research*, roč. 35, č. 3, s. 161–214, 1990.
- [30] A. Morcavallo, M. Genua, A. Palummo, E. Kletvikova, J. Jiracek, A. M. Brzozowski, R. V. Iozzo, A. Belfiore, a A. Morrione, „Insulin and insulin-like growth factor II differentially regulate endocytic sorting and stability of insulin receptor isoform A.", *The Journal of biological chemistry*, roč. 287, č. 14, s. 11422–11436, 2012.
- [31] L. Žáková, E. Kletvíková, M. Lepšík, M. Collinsová, C. J. Watson, J. P. Turkenburg, J. Jiráček, a A. M. Brzozowski, „Human insulin analogues modified at the B26 site reveal a hormone conformation that is undetected in the receptor complex", *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, roč. 70, č. Pt 10, s. 2765–2774, 2014.
- [32] T. J. Wallace a J. J. Mahon, „Reactions of thiols with sulfoxides. III. Catalysis by acids and bases.", *Section Title: Physical Organic Chemistry*, roč. 30, č. 5, s. 1502–1506, 1965.
- [33] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, a J. W. Zhang, „Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl-Sulfoxide - Scope and Applications", *Journal of the American Chemical Society*, roč. 113, č. 17, s. 6657–6662, 1991.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka