

**Diplomová práce**

**NOVÉ ZKRÁCENÉ A NEZKRÁCENÉ  
ANALOGY INSULINU S MODIFIKACEMI  
V POLOZE B26**

**NOVEL SHORTENED AND FULL-LENGTH INSULIN  
ANALOGS WITH MODIFICATIONS IN THE POSITION B26**

**Ivona Hančlová**

**Školitelé: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.**

**Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.**

**Katedra biochemie,**

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy**

**Praha 2007**

„Stvrzuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) a Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. (PřF UK, Praha). Použité informační zdroje jsem řádně citovala.“

V Praze, dne *26. 4. 2004*

Podpis: *Jana Amélová*

Úvodem bych ráda poděkovala svým školitelům RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za velkou podporu, pomoc a trpělivost během mé diplomové práce, Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za laskavost a vstřícnost. Dík patří také RNDr. Lence Žákové, PhD. za cenné rady a pomoc v experimentální části práce.

Dále bych ráda poděkovala Dr. Marku Brzozowskému a Ing. Ludmile Kazdové, CSc., kteří umožnili provést krystalizaci a testování biologické aktivity insulinových analogů, Mgr. Miloslavu Šandovi za měření hmotových spekter a kolektivu skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě věnuji velký dík mé rodině a všem blízkým, kteří mi byli během mých studií oporou.

Tato práce byla provedena v rámci výzkumného záměru ÚOCHB AV ČR Z4 055 0506 a byla podporována Centrem chemické genetiky LC06077.

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| <b>1. ÚVOD</b>   | 6  |
| <b>1.1. Protein 20. století</b>  | 6  |
| <b>1.2. Struktura insulínu</b>   | 7  |
| 1.2.1. Primární struktura  | 7  |
| 1.2.2. Vyšší struktury a formy insulínu  | 7  |
| <b>1.3. Insulinový receptor</b>  | 10 |
| <b>1.4. Interakce insulínu s receptorem</b>  | 14 |
| 1.4.1. Vazebná místa v molekule insulínu   | 14 |
| 1.4.2. Vazebná místa na insulinovém receptoru  | 14 |
| 1.4.3. Negativní kooperativita   | 17 |
| <b>1.5. Účinek insulínu</b>  | 18 |
| <b>1.6. Glukózové přenašeče</b>  | 20 |
| <b>1.8. Insulinové analogy v praxi</b>   | 22 |
| 1.8.1. Analogy s okamžitým účinkem   | 23 |
| 1.8.2. Analogy s dlouhou dobou působení  | 24 |
| <b>1.9. Výsledky některých výzkumů v oblasti insulinových analogů modifikovaných v C-koncové části B-řetězce</b> | 25 |
| <b>2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>   | 27 |
| <b>3. METODY PRÁCE</b>   | 28 |
| <b>3.1. Klíčové materiály</b>  | 28 |
| <b>3.2. Použité přístroje</b>  | 28 |
| <b>3.3. Seznam použitých zkratk</b>  | 29 |
| <b>3.4. Příprava desoktapeptid(B23 – B30)insulínu (DOI)</b>  | 30 |
| 3.4.1. Odstranění $Zn^{2+}$ z komerčně dodaného insulínu   | 30 |
| 3.4.2. Enzymatické štěpení insulínu po odstranění $Zn^{2+}$  | 30 |
| 3.4.3. Purifikace DOI  | 30 |
| <b>3.5. Příprava peptidů</b>   | 31 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5.1. Příprava tetrapeptidů  | 31 |
| 3.5.2. Příprava oktapeptidů   | 32 |
| <b>3.6. Enzymová semisyntéza</b>  | 32 |
| <b>3.7. Odštěpení fenylacetylové skupiny z postranního řetězce lysinu analogů</b>       | 33 |
| <b>3.8. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</b>                               | 33 |
| <b>3.9. Hmotnostní spektroskopie</b>  | 34 |
| <b>3.10. Testování vazebné afinity insulinových analogů <i>in vitro</i></b>             | 34 |
| 3.10.1. Izolace a zpracování potkaních tukových buněk                                   | 34 |
| 3.10.2. Vazebné studie  | 34 |
| <b>3.11. Testování insulinových analogů <i>in vivo</i></b>                              | 35 |
| <b>3.12. Krystalografické studie analogů insulinu</b>                                   | 35 |
| <b>4. VÝSLEDKY</b>  | 37 |
| <b>4.1. Příprava desoktapeptid(B23–B30)-insulinu (DOI)</b>                              | 37 |
| 4.1.1. Odstranění $Zn^{2+}$ z komerčního vepřového insulinu                             | 37 |
| 4.1.2. Enzymatické štěpení insulinu po odstranění $Zn^{2+}$                             | 37 |
| 4.1.3. Oddělení DOI od ostatních členů štěpící reakce                                   | 37 |
| <b>4.2. Příprava peptidů</b>  | 38 |
| <b>4.4. Odštěpení fenylacetylové skupiny (Pac) z postranního řetězce lysinu analogů</b> | 41 |
| <b>4.5. Testování vazebné afinity insulinových analogů <i>in vitro</i></b>              | 42 |
| 4.5.1. Izolace a zpracování potkaních tukových buněk                                    | 42 |
| 4.5.2. Vazebné studie   | 42 |
| <b>4.6. Testování insulinových analogů <i>in vivo</i></b>                               | 47 |
| <b>4.7. Krystalografické studie analogů insulinu</b>                                    | 49 |
| <b>5. DISKUZE</b>   | 50 |
| <b>6. ZÁVĚR</b>   | 54 |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>  | 55 |

# 1. ÚVOD

## 1.1. Protein 20. století

Insulin je globulární protein produkovaný  $\beta$ -buňkami slinivky břišní, které, spolu s dalšími buňkami produkujícími jiné hormony a aktivní peptidy, tvoří oblasti nazývané Langerhansovy ostrůvky. V  $\beta$ -buňkách je insulin také skladován a z nich je procesem exocytózy uvolňován do krve. Funkce insulinu je velmi důležitá pro činnost organismu. Váže se na insulinový receptor v membráně buněk a složitou kaskádou reakcí umožňuje glukózovému přenašeči GLUT 4 dodávat glukózu do buněk. Kromě výše zmíněné funkce se insulin podílí i na metabolismu lipidů a proteinů. Na jeho působení je nejvíce závislá svalová a tuková tkáň.

Cesta od produkce insulinu k jeho účinku je dlouhá a tudíž na ní existuje spousta míst, kde může dojít k poruše a finálně k pozastavení vstupu glukózy do buněk. Primárním projevem těchto poruch je zvýšená hladina cukru v krvi, sekundárně dochází k ovlivnění celkové látkové přeměny v organismu a konečným důsledkem může být poškození mnoha orgánů. Onemocnění se nazývá *diabetes mellitus* (cukrovka). Existuje několik forem *diabetu*, více či méně závažných.

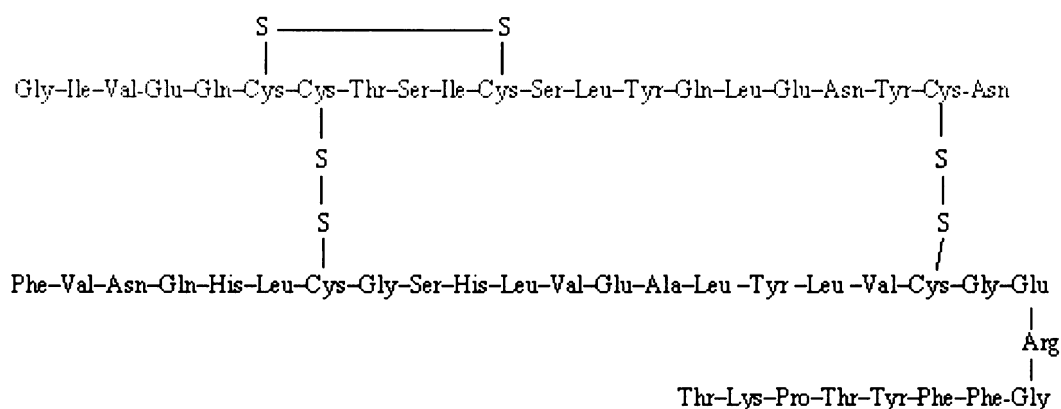
V minulosti lidé na *diabetes* umírali a proto není divu, že bylo získání extraktu insulinu z pankreatu psů a následné úspěšné testování na diabetických zvířatech, zázrakem. Izolace i testování byly provedeny roku 1921 Frederikem Bantingem a Charlesem Bestem v laboratořích Johna Macleoda [1]. Bantingovi a Macleodovi byla v roce 1923 udělena Nobelova cena. Insulin se stal modelovým proteinem pro další výzkumy při nichž bylo dosaženo během několika desítek let mnohých vědeckých prvenství. V roce 1955 určil Frederic Sanger a jeho spolupracovníci primární strukturu insulinu [2] a tím položil základy pro další práci s tímto proteinem. O tři roky později byl Sanger oceněn Nobelovou cenou za práci s proteiny a to především s insulinem. Insulin se stal prvním chemicky syntetizovaným proteinem. V 60. letech ho nezávisle na sobě připravily tři vědecké skupiny [3,4,5]. Krystalickou formu vepřového insulinu (rhombohedr) získal John Abel v roce 1925 [6]. První charakteristika pomocí rentgenové difrakce byla provedena Dorothy Crowfoot Hodgkin v roce 1935 [7] a struktura vepřového insulinu v krystalu byla nezávisle vyřešena skupinami v Oxfordu [8, 9] a v Pekingu [10]. Insulin se stal i prvním proteinem biosyntetizovaným

v mikroorganismech [11]. Nejen tato prvenství, ale i všeobecný zájem vědecké komunity i veřejnosti vynesly insulinu přívlastko „protein 20. století“.

## 1.2. Struktura insulinu

### 1.2.1. Primární struktura

Sanger zjistil, že insulin je tvořen relativně malým počtem aminokyselin [2]. Ty jsou uspořádány ve dvou řetězcích. U většiny organismů produkujících insulin je rozdělení následující; řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a řetězec B 30 aminokyselin. Oba řetězce jsou propojeny pomocí disulfidických vazeb v polohách Cys<sup>A7</sup> – Cys<sup>B7</sup> a Cys<sup>A20</sup> – Cys<sup>B19</sup>. Řetězec A obsahuje navíc jeden intramolekulární disulfidický můstek v poloze Cys<sup>A6</sup> – Cys<sup>A11</sup> (Obrázek 1).

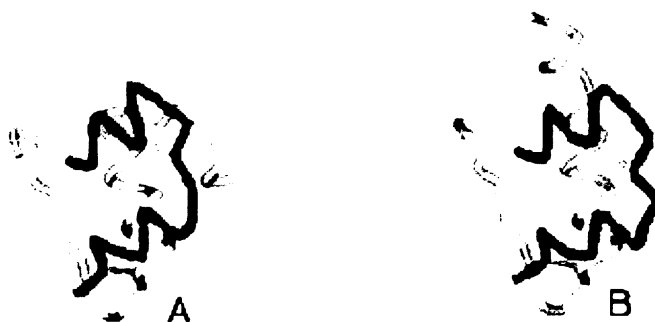


Obrázek 1. Primární struktura lidského insulinu. Červeně-řetězec A, modře-řetězec B. Podle Brandenburg [12].

### 1.2.2. Vyšší struktury a formy insulinu

Biologicky aktivní formou insulinu je monomer. V této podobě je ovšem protein přítomen jen při koncentraci nižší než  $10^{-7}$  M. Při mikromolární koncentraci dochází k dimerizaci a v přítomnosti  $Zn^{2+}$  se tři dimery spojují v hexamer. Z analýz hexamerní a dimerní krystalové struktury lze dobře popsat i insulinový monomer [9,13]. Řetězec A je tvořen dvěma antiparalelními  $\alpha$ -šroubovicemi, Gly<sup>A1</sup> - Thr<sup>A8</sup> (N-konec) a Ser<sup>A12</sup> - Cys<sup>A20</sup> (C-konec), zbylé tři aminokyseliny (Ser<sup>A9</sup> - Cys<sup>A11</sup>) jsou součástí  $\beta$ -otáčky. NH skupiny aminokyselin Cys<sup>A7</sup> a Ile<sup>A10</sup> tvoří vodíkové vazby s kyslíky karbonylů Val<sup>A3</sup> a Gln<sup>A5</sup>.

U řetězce B je centrální část, Ser<sup>B9</sup>-Cys<sup>B19</sup>, ve formě šroubovice. C-konec (Glu<sup>B21</sup>- Thr<sup>B30</sup>) tvoří  $\beta$ -strukturu. Vodíkové vazby jsou zformovány mezi Cys<sup>B19</sup> CO a Arg<sup>B22</sup> NH, Gly<sup>B20</sup> CO a Gly<sup>B23</sup> NH a mezi Thr<sup>B27</sup> CO a Thr<sup>B30</sup> NH. Kyslíky C-konců aminokyselin Leu<sup>B17</sup> a Val<sup>B18</sup> jsou buď solvatované nebo jsou součástí vodíkových vazeb s postranním řetězcem Arg<sup>B22</sup>. Meziřetězcové vodíkové můstky propojují CO a NH skupiny peptidových vazeb (Cys<sup>A11</sup>- Gln<sup>B4</sup>, Cys<sup>A6</sup>- Leu<sup>B6</sup>, Cys<sup>A7</sup>- His<sup>B5</sup>, Asn<sup>A21</sup>- Gly<sup>B23</sup>, Tyr<sup>A19</sup>- Phe<sup>B25</sup>). Výše popsaná struktura odpovídá takzvané T-konformaci, kdy aminokyseliny Phe<sup>B1</sup>- Gly<sup>B8</sup> nevytvářejí uspořádanou strukturu. (Obrázek 2A) [14].



Obrázek 2.A: Vepřový insulin, T-konformace. B: Lidský insulin, R-konformace. Červeně-řetězec A, žlutě-řetězec B. Použito z De Meyts [15].

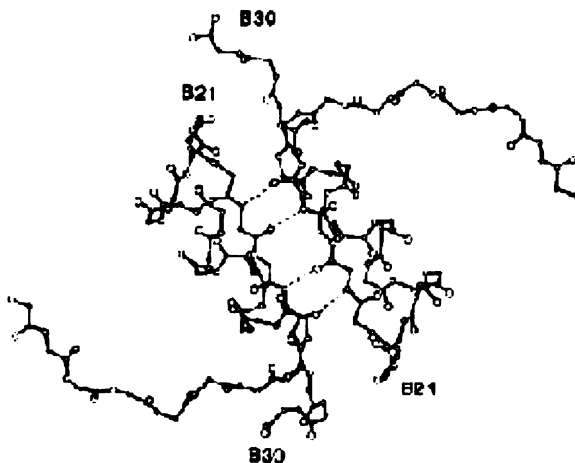
Insulin může existovat ještě v jiné konformaci, označované písmenem R. Rozdíl nastává v tom, že celý úsek Phe<sup>B1</sup>- Cys<sup>B19</sup> vytváří  $\alpha$ -šroubovici (Obrázek 2B). Konformace R je relaxovaná, v molekule nedochází k takovému pnutí jako u konformace T.

Jádro molekuly insulinu je tvořeno převážně nepolárními aminokyselinovými zbytky Ile<sup>A2</sup>, Cys<sup>A6</sup>, Cys<sup>A11</sup>, Leu<sup>A16</sup>, Tyr<sup>A19</sup>, Leu<sup>B6</sup>, Leu<sup>B11</sup>, Leu<sup>B15</sup>, Ala<sup>B14</sup>. Postranní řetězce aminokyselin přítomných na povrchu molekuly se mohou účastnit formování dimeru a hexameru. Jsou to Val<sup>A3</sup>, Leu<sup>A13</sup>, Asn<sup>A21</sup>, Val<sup>B12</sup>, Tyr<sup>B16</sup> a Val<sup>B18</sup> a C-konec B-řetězce. C-konec B-řetězce je udržován v pozici přivrácené ke zbytku molekuly především díky dvěma vodíkovým vazbám; Gly<sup>B23</sup> CO s Asn<sup>A21</sup> HN a Phe<sup>B25</sup> NH s Tyr<sup>A19</sup> CO [13].

Molekula insulinu má zřetelně plochý povrch s mnoha aromatickými a alifatickými postranními řetězci aminokyselin. V dimeru se formují protilehlé molekuly antiparalelně. Na stabilizaci dimeru (Obrázek 3) se podílí aminokyseliny B-řetězce, Gly<sup>B8</sup>,



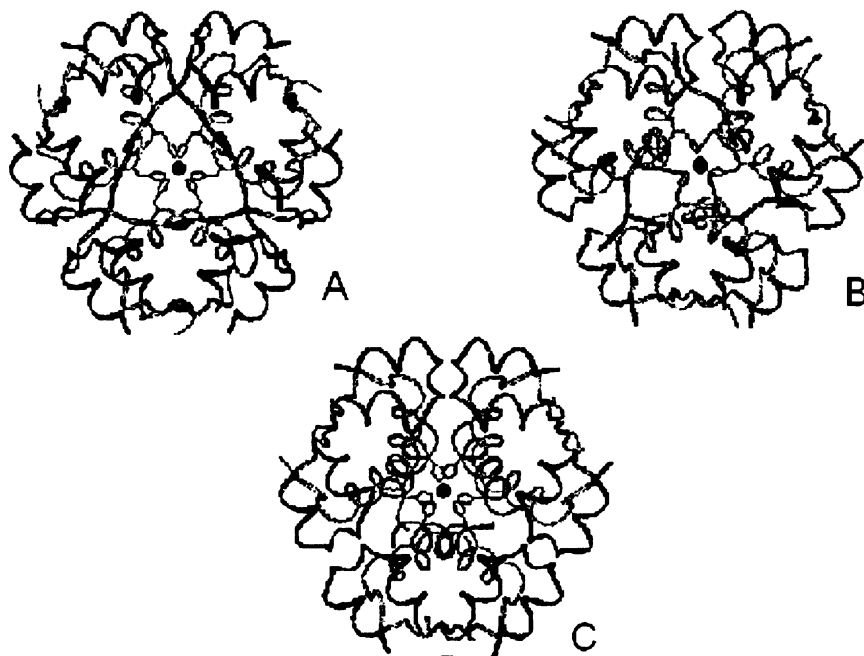
Ser<sup>B9</sup>, Val<sup>B12</sup>, Glu<sup>B13</sup>, Tyr<sup>B16</sup>, Gly<sup>B23</sup>, Phe<sup>B24</sup>, Phe<sup>B25</sup>, Tyr<sup>B26</sup>, Pro<sup>B28</sup> a Asn<sup>A21</sup> řetězce A. Síly, které udržují molekuly pohromadě jsou převážně nepolárního charakteru. Formu dimeru udílí vodíkové vazby mezi Phe<sup>B24</sup> jedné molekuly s Tyr<sup>B26</sup> druhé molekuly a naopak. Navíc vznikají dvě vodíkové vazby mezi Gly<sup>B23</sup> CO a Thr<sup>B27</sup> NH [13].



Obrázek 3. Fragment dimeru insulínu znázorňující interakci dvou C-konců B-řetězců. Znázorněny jsou čtyři vodíkové můstky mezi polohami Phe<sup>B24</sup> a Tyr<sup>B26</sup> a polohami Gly<sup>B23</sup> a Thr<sup>B27</sup>. Převzato z Baker a kol. [13].

Jak již bylo řečeno, v přítomnosti  $Zn^{2+}$  se tři dimery spojují a tvoří hexamer. Kationty zinku jsou vázány koordinačními vazbami k atomu dusíku v imidazolovém kruhu His<sup>B10</sup> [16]. Pozitivní náboj je vyrovnáván negativními náboji OH<sup>-</sup> iontů molekul vody. Centrum hexameru je obklopeno šesti glutamovými kyselinami Glu<sup>B13</sup>, které jsou pravděpodobně propojeny vodíkovými vazbami a vytváří kruh. Sbalení struktury je volnější než při vzniku dimeru. Vodíkový můstek se vytváří mezi Cys<sup>A11</sup> jednoho dimeru a Gln<sup>B4</sup> druhého dimeru. Postranní řetězec Phe<sup>B1</sup> jedné dvojice je vložen mezi A-řetězec a Tyr<sup>A14</sup> sousední dvojice. Tím vzniká jedno z mnoha aromatických center hexamerní struktury. Val<sup>B2</sup> je také přikloněn k sousednímu dimeru. Spojení dimerů je posíleno polární interakcí mezi NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Phe<sup>B1</sup> a COO<sup>-</sup> Glu<sup>A17</sup>. Nepolární části A- a B-řetězců se přibližují a vytváří větší nepolární úseky (Leu<sup>A13</sup> obou dimerů, Leu<sup>B17</sup> a Ala<sup>B14</sup> sousedních struktur) [13]. V hexamerní struktuře se dvěma  $Zn^{2+}$  jsou všechny molekuly insulínu v konformaci T, tedy T6 (Obrázek 4A). V roztocích o vysoké koncentraci chloridů a za přítomnosti čtyř  $Zn^{2+}$  je hexamer tvořen třemi formami R a třemi formami T (R3T3) (Obrázek 4B). Pokud je insulin vykrytalizován z fenolického roztoku, jsou

všechny monomery ve formě R, tedy R<sub>6</sub> (Obrázek 4C) [16]. Studium rovnováhy mezi formami T a R je důležité vzhledem k faktu, že fenol i chloridové anionty se používají v medicíně a s insulinem přicházejí do styku.

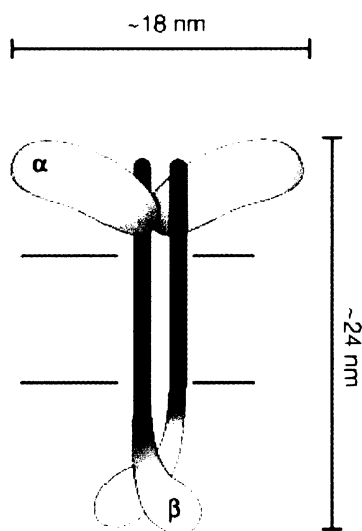


Obrázek 4. Hexamer insulinu. A: T<sub>6</sub>-konformace, B: R<sub>3</sub>T<sub>3</sub>-konformace, C: R<sub>6</sub>-konformace. Černě jsou znázorněny Zn<sup>2+</sup> (tečka uprostřed) a postranní řetězce histidinů His<sup>B10</sup>, které se na vazbě zinku podílejí. Použito z Wan a kol. [17].

### 1.3. Insulinový receptor

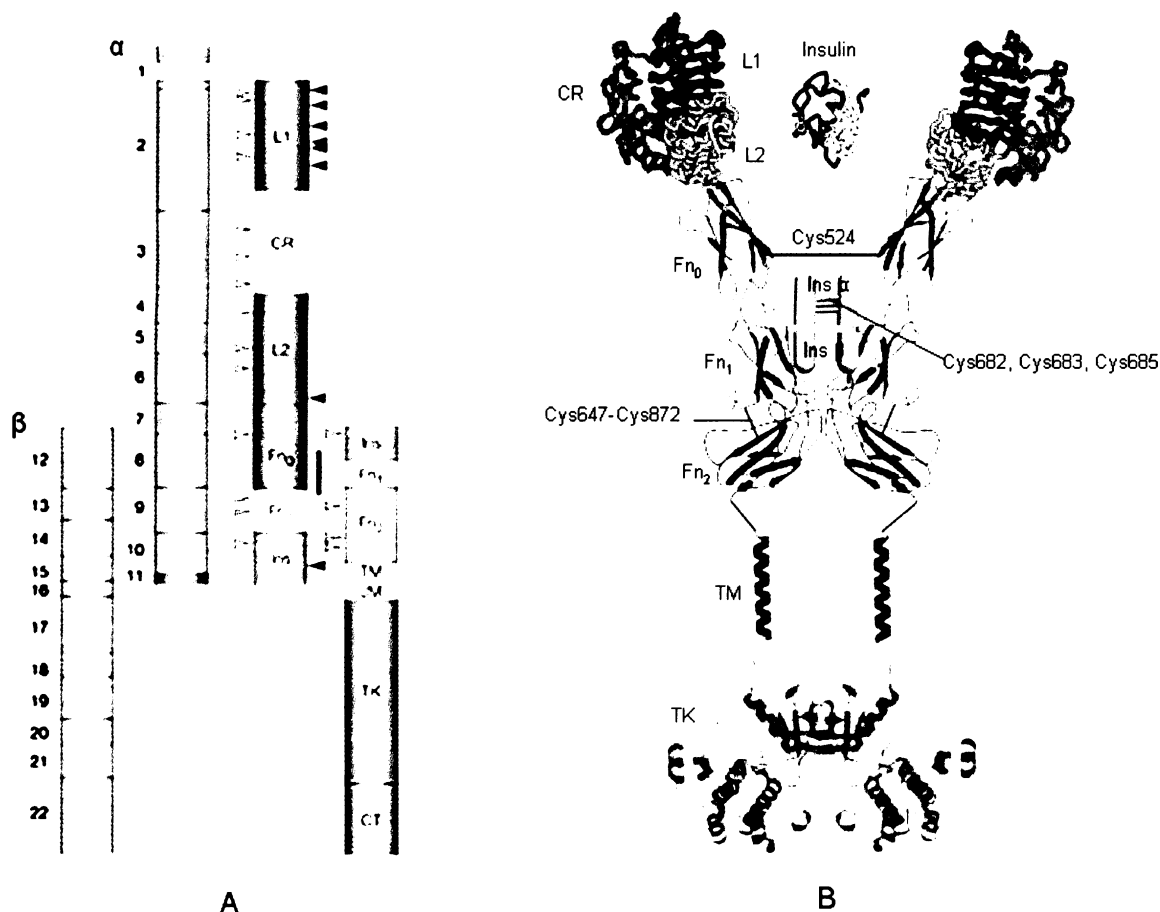
Insulinový receptor je transmembránový glykoprotein o celkové velikosti 460 kDa. Jde o kovalentní heterotetramer (či dimer dvou dimerů)  $\alpha_2\beta_2$  tvořený dvěma podjednotkami  $\alpha$  a dvěma podjednotkami  $\beta$ . Podjednotky jsou navzájem spojené disulfidickými můstky (Obrázek 4). Podjednotky  $\alpha$  (135 kDa) zasahují do extracelulárního prostoru. Menší části  $\beta$ -podjednotek (95 kDa) zasahují do extracelulárního prostoru, dále následují transmembránové a intracelulární části. Na extracelulární část receptoru se váže insulin, intracelulární část je zodpovědná za přenos signálu a má enzymatickou funkci. První domněnky v 80. letech byly takové, že insulinový receptor je úzce spjat s tyrosinkinázou [18]. Od té doby však bylo mnohokrát prokázáno, že receptor sám je tyrosinkinázou [19]. Tyto enzymy katalyzují přenos fosfátu z ATP na tyrosinové zbytky proteinových substrátů. Jde o velkou skupinu enzymů,

u člověka obsahuje přibližně 60 členů. Insulinový receptor a receptor pro IGF 1 se ovšem odlišují právě tím, že jde kovalentní multimery. Ostatní členové této velké rodiny tyrosinkináz dimerizují popřípadě oligomerizují až po navázání substrátu.



Obrázek 4. Insulinový receptor. Převzato z De Meyts a kol. [20].

Insulinový receptor je kódován genem, který se skládá z 22 exonů a 21 intronů (Obrázek 5A) [21]. Exon číslo 11 je rozštěpen ve dvě izoformy (A a B), což následně vede ke vzniku dvou izomerních forem insulinového receptoru (rovněž A a B), které se liší absencí (A) či přítomností (B) 12 aminokyselin (717-729) na C-konci  $\alpha$ -podjednotky [22]. Izoformy mají různou afinitu k substrátu. Izoforma B váže insulin o něco silněji než izoforma A. Receptor je syntetizován ve formě jednořetězcového preproreceptoru. Posttranslační modifikace zahrnují glykosylaci, poskládání řetězce za pomoci calnexinu a calreticulinu, štěpení na jednotlivé podjednotky a dimerizaci [23]. Podjednotka  $\alpha$  insulinového receptoru obsahuje dvě velké globulární domény, L1 a L2, bohaté na leucinové zbytky. L1 doména zahrnuje aminokyseliny 1-158 a doména L2 aminokyseliny 309-469. Tyto domény jsou odděleny úsekem bohatým na cysteinové zbytky (CR) [24]. Struktura těchto tří domén byla určena na základě podobnosti při strukturních studiích IGF 1 receptoru [25].



Obrázek 5. A:  $\alpha_2\beta_2$  struktura insulinového receptoru. Levá část-hranice exonů v genu pro insulinový receptor. Pravá část-rozložení jednotlivých domén. B: L1, L2-velké domény bohaté na leucinové zbytky, CR-oblast s vysokým obsahem cysteinových zbytků, Fn<sub>0</sub>, Fn<sub>1</sub>, Fn<sub>2</sub>-domény fibronektinu typu III, Ins-vložená doména, Ins  $\alpha$ -vložená doména podjednotky  $\alpha$ , Ins  $\beta$ -vložená doména podjednotky  $\beta$ , TM-transmembránová oblast, JM-oblast přiléhající k buněčné membráně, TK-tyrosinkinázový úsek, CT-C-konec  $\beta$ -podjednotky, oranžové šipky-místa, kde dochází ke glykosylaci, zelené šipky-místa pro vazbu insulinu. Převzato z De Meyts a kol. [20].

C-koncový úsek  $\alpha$ -podjednotky obsahuje dvě domény fibronektinu typu III (Fn<sub>0</sub>, Fn<sub>1</sub>) [26,27], které obsahují cysteiny důležité pro tvorbu disulfidických vazeb mezi jednotlivými částmi dimeru. Podjednotky  $\alpha$  jsou spojeny prostřednictvím Cys<sup>524</sup>, Cys<sup>682</sup>, Cys<sup>683</sup> a Cys<sup>685</sup> [28]. Do domény Fn<sub>1</sub> je vložen úsek 124 aminokyselinových zbytků, který zahrnuje C-koncovou část  $\alpha$ -podjednotky a N-koncovou část  $\beta$ -podjednotky. V tomto úseku se nachází místo pro odštěpení podjednotek. Mezi  $\alpha$ - a  $\beta$ -podjednotkou je disulfidický můstek [29] v poloze Cys<sup>647</sup> v Fn<sub>1</sub> doméně a Cys<sup>872</sup> v Fn<sub>2</sub> doméně, která je součástí  $\beta$ -podjednotky [27]. Podjednotka  $\beta$  insulinového receptoru dále obsahuje transmembránovou doménu (23 aminokyselin) mající helikální strukturu, úsek přiléhající

k membráně (30 aminokyselin) a tyrosinkinázovou doménu (aminokyseliny 980-1255) [30] (Obrázek 5). Významným pokrokem bylo publikování modelu prostorové struktury části insulinového receptoru navrženého australskou skupinou C. Warda v roce 2006. Skupina vyřešila krystalickou strukturu dimeru ektodomén insulinového receptoru v komplexu se čtyřmi Fab úseky monoklonálních protilátek [31]. Podle výsledků rentgenové difrakce mají obě ektodomény tvar převráceného písmena V. Jedna část je tvořena oblastmi L1, CR, L2 a v druhé jsou zahrnuty tři domény fibronektinu typu III ( $F_{n0}$ ,  $F_{n1}$ ,  $F_{n2}$ ) (Obrázek 6). L2 oblast prvního monomeru je v kontaktu s  $F_{n0}$  doménou druhého monomeru a naopak, další intermonomerní interakce jsou mezi úseky L1 a  $F_{n1}$ , L2 a  $F_{n0}$ .



Obrázek 6. Ektodomény insulinového receptoru. Hnědě-L1, žlutě-CR, zeleně-L2, fialově- $F_{n0}$ , světle modře- $F_{n1}$ , tmavě modře- $F_{n2}$ , černě-místa pro glykozylaci. Převzato z McKern a kol. [31].

## 1.4. Interakce insulínu s receptorem

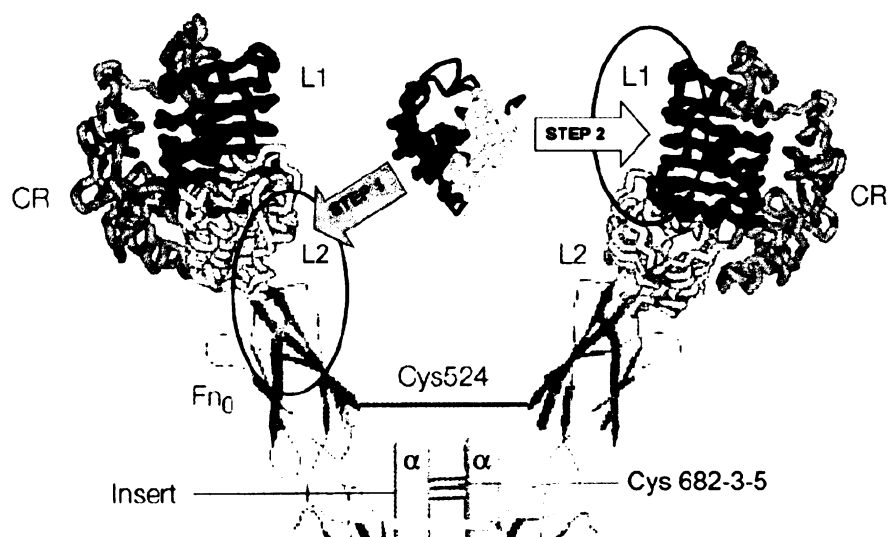
### 1.4.1. Vazebná místa v molekule insulínu

Ihned po prozkoumání struktury insulínu se zájem přesunul k pátrání po podstatě vazby hormonu s receptorem. Možnost provádět *in vitro* testování síly vazby poskytla základ pro získání odpovědí na otázky týkající se strukturních souvislostí vazby insulínu a jeho receptoru. Z prvních studií vyplynulo, že na vazbě se pravděpodobně podílejí aminokyseliny Gly<sup>A1</sup>, Gln<sup>A5</sup>, Tyr<sup>A19</sup>, Asn<sup>A21</sup>, Val<sup>B12</sup>, Tyr<sup>B16</sup>, Gly<sup>B23</sup>, Phe<sup>B24</sup>, Phe<sup>B25</sup>, Tyr<sup>B26</sup> (takzvaný klasický vazebný povrch) [32]. Z krystalografických studií [9,10] je známo, že aminokyseliny C-konce B-řetězce (Phe<sup>B24</sup>, Phe<sup>B25</sup> a Tyr<sup>B26</sup>) a postranní řetězce náležící Tyr<sup>B16</sup> a Val<sup>B12</sup> tvoří hydrofobní oblast, která má velmi pravděpodobně možnost interagovat s receptorem. Za nejdůležitější aminokyseliny jsou považovány Phe<sup>B24</sup> a Phe<sup>B25</sup> [33,34]. Prostřednictvím nepolárních postranních řetězců těchto aminokyselin dochází k prvnímu kontaktu s receptorem. Peptidová vazba mezi Tyr<sup>B26</sup> a Thr<sup>B27</sup> pravděpodobně také silně přispívá k vazbě insulínu a receptoru [35]. O důležitosti této oblasti svědčí i fakt, že úsek Gly<sup>B23</sup>- Phe<sup>B24</sup>- Phe<sup>B25</sup>- Tyr<sup>B26</sup> zůstal zachovaný během vývoje mnoha druhů organismů produkujících insulín. Předpokládá se, že C-konec B-řetězce (Gly<sup>B23</sup>- Thr<sup>B30</sup>) se při interakci s receptorem insulínu „odklápí“ od zbytku molekuly insulínu a původně skryté aminokyseliny Ile<sup>A2</sup> a Val<sup>A3</sup> se tímto posunem C-konce B-řetězce odkryjí a také vstupují do interakce s receptorem [36]. Při studiu analogů insulínu se změnou v polohách Leu<sup>A13</sup> a Leu<sup>B17</sup>, které se účastní tvorby hexameru, bylo zjištěno, že i tyto dvě aminokyseliny mají vliv na vazbu k receptoru [37]. Dánská skupina Pierra De Meytse prokázala důležitost shluku aminokyselin Ser<sup>A12</sup>, Leu<sup>A13</sup>, Glu<sup>A17</sup>, His<sup>B10</sup>, Glu<sup>B13</sup>, Leu<sup>B17</sup>. Ty jsou navíc součástí povrchu molekuly, který se uplatňuje při tvorbě hexameru a jsou nazývány druhým, tzv. vysoko-afinitním, vazebným místem insulínu (viz dále) [38].

### 1.4.2. Vazebná místa na insulinovém receptoru

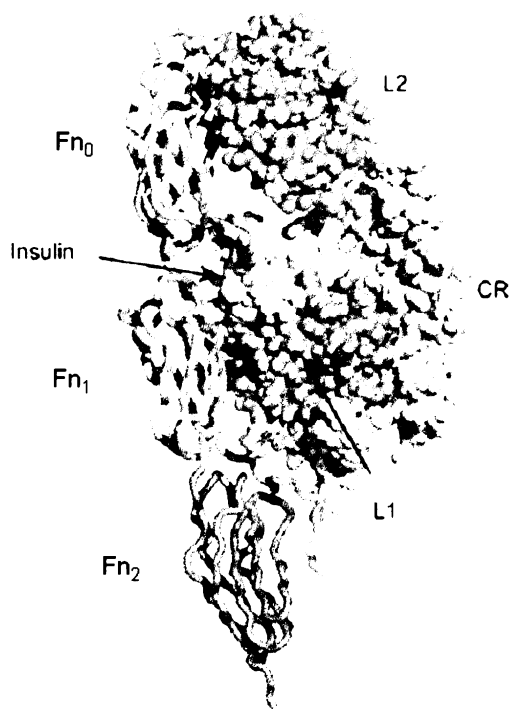
Místa na receptoru důležitá pro vazbu insulínu byla studována metodou náhrady jednotlivých aminokyselin alaninem (alaninová mutagenese či alaninový scanning). Jeden z navržených modelů interakce insulínu s receptorem je znázorněn na Obrázku 7. V doméně L1 se formují dvě oblasti důležité pro vazbu insulínu [39]. První z nich

obsahuje aminokyseliny Asp<sup>12</sup>, Arg<sup>14</sup>, Asn<sup>15</sup>, Gln<sup>34</sup>, Leu<sup>36</sup>, Leu<sup>37</sup>, Phe<sup>64</sup>, Glu<sup>97</sup>, Glu<sup>120</sup>, Lys<sup>121</sup>. Druhá oblast, zformovaná zbytky Leu<sup>87</sup>, Phe<sup>89</sup>, Asn<sup>90</sup>, Tyr<sup>91</sup>, vytváří jakousi „výdut“. Tato oblast byla studována pomocí záměny Phe<sup>89</sup> za Leu<sup>89</sup> [40]. Navíc bylo prokázáno, že postranní řetězce aminokyselin Ile<sup>13</sup>, Phe<sup>39</sup>, Arg<sup>42</sup>, Pro<sup>43</sup> jsou také součástí vazebného povrchu. Centrální část L1 domény je velmi důležitá pro vazbu ligandu k receptoru, z toho Ile<sup>13</sup>, Arg<sup>14</sup>, Asn<sup>15</sup>, Gln<sup>34</sup>, Leu<sup>37</sup>, Phe<sup>39</sup> a Phe<sup>64</sup> jsou pravděpodobně nejvýznamnější [41]. Metoda alaninové mutagenese prokázala, že i C-konec podjednotky  $\alpha$  (aminokyseliny 704-715) hraje důležitou roli při vazbě receptoru a insulinu [42]. Další místo, které zatím nebylo zmapováno metodou alaninové mutagenese, je lokalizováno v úseku kódovaném exony 6-8. Jde o C-konec L2 domény a také o první úsek Fn<sub>0</sub> domény (Obrázek 6). Toto místo je rozpoznáváno autoimunitními protilátkami u pacientů trpících *diabetem mellitus* I. typu [43]. Molekula insulinu je tedy k receptoru vázána nesymetricky, prostřednictvím obou  $\alpha$ -podjednotek a k vazbě dochází ve dvou krocích. K tomu je zapotřebí spolupráce různých  $\alpha$ -částí dimeru insulinového receptoru. Právě v takovém případě je jedna molekula insulinu poutána s vysokou afinitou [44]. Monomerní  $\alpha\beta$  receptor také váže insulin, ovšem jen s nízkou afinitou [45]. To potvrzuje myšlenku spolupráce dvou dimerů insulinového receptoru v případě vysokoafinitní vazby.



Obrázek 7. Místa důležitá pro vazbu insulinu k receptoru: Modře-L1 domény, zeleně-CR domény, oranžově-L2 domény, červeně-Fn<sub>0</sub> úseky. Navíc je zobrazena i molekula insulinu: žlutě-klasický vazebný povrch, červeně-oblast obsahující aminokyseliny Ser<sup>A12</sup>, Leu<sup>A13</sup>, Glu<sup>A17</sup>, His<sup>B10</sup>, Glu<sup>B13</sup>, Leu<sup>B17</sup>. Převzato z De Meyts a kol. [15].

Podle nejnovějších studií skupiny C. Warda z Austrálie byl navržen odlišný model vazby insulinu k insulinovému receptoru (Obrázek 8). První místo pro nízkoafinitní vazbu je lokalizováno v souladu s prvním modelem (Obrázek 7) v L1 doméně. Druhé místo pro vysokoafinitní vazbu peptidu je ovšem lokalizováno na C-konci první fibronektinové domény typu III (Fn<sub>0</sub>) receptoru [31]. Bylo zjištěno, že místa navrhovaná v původním modelu (Obrázek 7) jsou od sebe pravděpodobně dosti vzdálená, a tudíž není možné, aby se insulin vázal na obě tato místa zároveň. Také bylo prokázáno, že některé z protilátek, v jejichž komplexu byla část insulinového receptoru vykrytalizována, inhibují vazbu insulinu k receptoru. Šlo o protilátky navázané pouze k Fn<sub>0</sub>. V roce 2006 byl také navržen podrobnější model interakce L1 domény insulinového receptoru s insulinem [41]. Podle tohoto návrhu dochází k interakci mezi Gly<sup>A1</sup> až Val<sup>A3</sup> insulinu a Phe<sup>88</sup>, Phe<sup>89</sup> receptoru, které jsou na okraji hydrofobní kapsy. Tyr<sup>A19</sup>, Val<sup>B12</sup> a Tyr<sup>B16</sup> jsou v kontaktu s centrem hydrofobní oblasti. Val<sup>B12</sup> pravděpodobně interaguje s Phe<sup>64</sup> a Tyr<sup>B16</sup> leží mezi Leu<sup>37</sup> a Phe<sup>39</sup>. Phe<sup>B25</sup> je vystaven přímé interakci s C-koncem  $\alpha$ -podjednotky. Aminokyseliny Val<sup>A3</sup> a Thr<sup>A8</sup> mohou kontaktovat vloženou doménu  $\alpha$ -podjednotky.

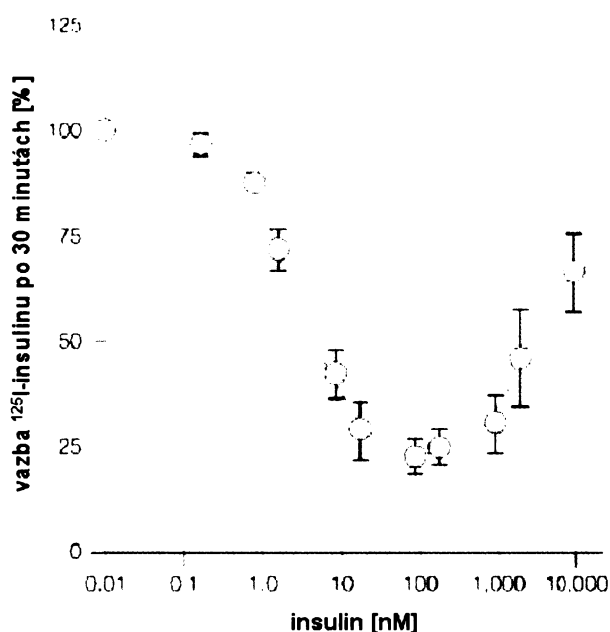


Obrázek 8. Nejnovější model vazby insulinu k receptoru. Bíle-insulin, hnědě-L1, žlutě-CR, zeleně-L2, fialově-Fn<sub>0</sub>, světle modře-Fn<sub>1</sub>, tmavě modře-Fn<sub>2</sub>. Převzato z McKern a kol. [31].



### 1.4.3. Negativní kooperativita

Četné studie ukázaly, že receptor je schopen vázat více než jednu molekulu insulínu (odstavec 1.4.2.). Například rozpustná extracelulární část insulinového receptoru má možnost nízkoafinitní interakce se dvěma molekulami insulínu [46]. Další studie prokázaly, že vysokoafinitní navázání první molekuly brání rovnocennému přístupu molekuly druhé, která je tudíž vázána nízkoafinitně. Naopak kontakt druhé molekuly s receptorem vede k oslabení vazby první molekuly a k její snazší disociaci [47]. Tento mechanismus je nazýván „negativní kooperativita“. Závislost stupně disociace navázaného insulínu působením různých koncentrací volných molekul má tvar obráceného zvonu a je znázorněna na Obrázku 9. Při působení volného insulínu o koncentraci vyšší než 100 nM dochází k snížení stupně disociace navázaných molekul značeného insulínu.



Obrázek 9. Disociační křivka značeného insulínu ( $^{125}\text{I-Tyr}^{\text{A14}}$ -insulin). Převzato z De Meyts a kol. [20].

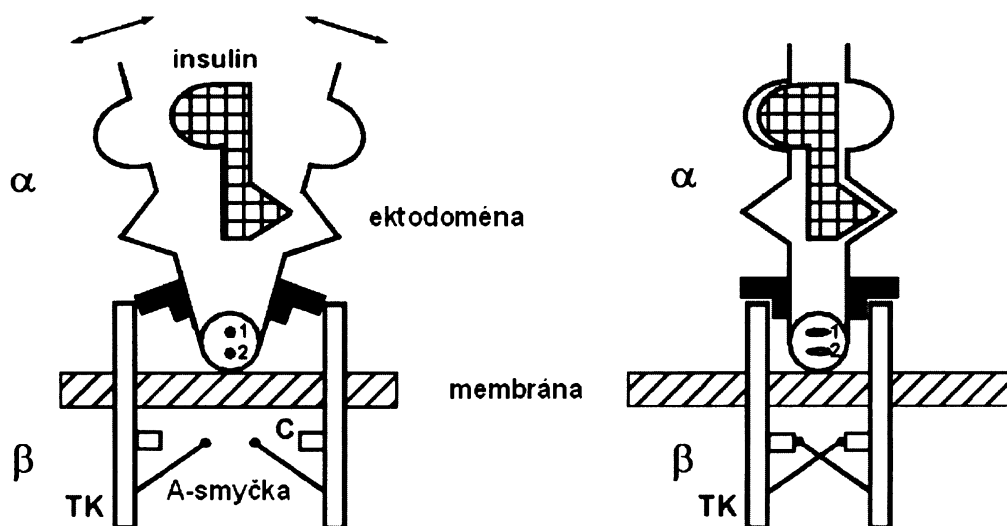
Mechanismus negativní kooperativity byl objeven v první polovině 70. let Pierrem De Meytsem. Aminokyseliny zodpovědné za negativní kooperativitu jsou umístěny v polohách A21 a B22-B26 molekuly insulínu [15,47].

## 1.5. Účinek insulinu

Hlavní úlohou insulinu je udržovat hladinu krevní glukózy na přiměřené úrovni (okolo 5 mmol/l). Kromě regulace koncentrace glukózy, insulin ovlivňuje lipogenezi a podporuje přechod aminokyselin do buněk. Navíc insulin stimuluje růst, syntézu DNA a buněčnou replikaci. Poslední zmíněné funkce insulin sdílí společně se strukturně podobnými IGF 1, IGF 2 a relaxinem.

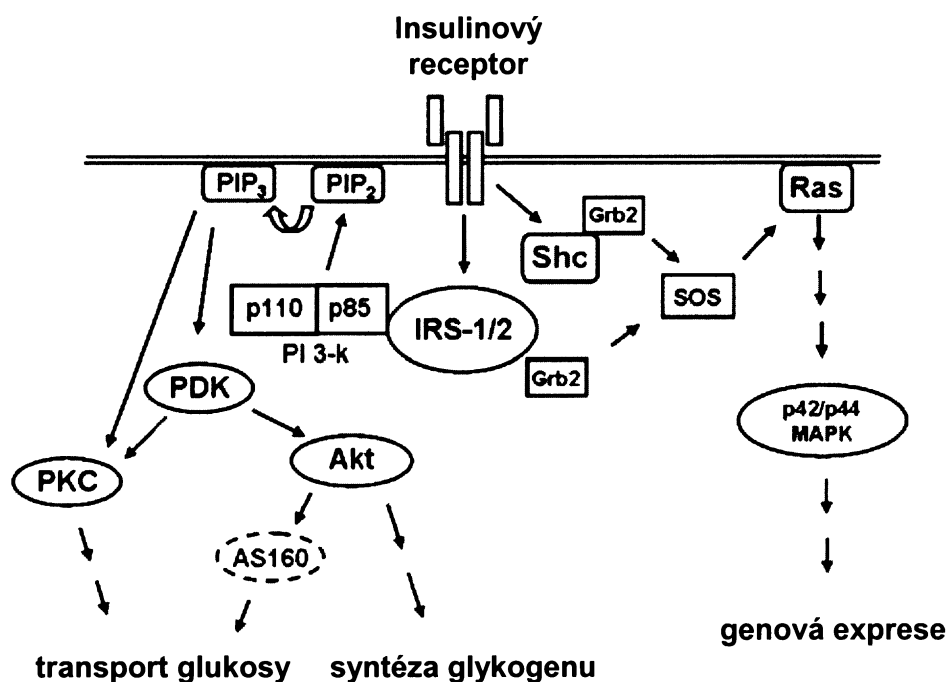
Sekrece insulinu v  $\beta$ -buňkách pankreatu je regulována hladinou glukózy v cytoplazmě. Zvýšená koncentrace monosacharidu vede k nárůstu koncentrace cAMP. Dále dochází k inhibici  $K^+$  kanálů. Výsledkem je depolarizace buněčné membrány, která umožňuje vtékání  $Ca^{2+}$  do buňky. Výše uvedené změny vyvolávají sekreci insulinu. Hormon se mechanismem exocytózy dostává do oběhu a krví je dopraven k cílovým buňkám. Mezi orgány, které jsou nejvíce zásobované insulinem, patří játra, svaly a tuková tkáň [48].

Kontakt molekuly insulinu s receptorem způsobí konformační změny, dojde k přiblížení částí dimeru a s ním i aktivačních a katalytických smyček [49] (Obrázek 10).



Obrázek 10. Znáornění přiblížení částí dimeru insulinového receptoru při vazbě ligandu. A: pozice před navázáním insulinu, B: po vazbě insulinu, A-smyčka-aktivační smyčka, C-katalytická smyčka, TK-tyrosinkinázová doména. Převzato z Ottensmeyer a kol. [49].

Poté je umožněno navázání ATP na specifická místa  $\beta$ -podjednotek, což způsobí aktivaci autofosforylace na hydroxylových skupinách tyrosinů. Tři hlavní oblasti, na nichž dochází k autofosforylaci jsou Tyr<sup>1158</sup>, Tyr<sup>1162</sup>, Tyr<sup>1163</sup> v tyrosinkinázové doméně, Tyr<sup>960</sup>, Tyr<sup>972</sup> v oblasti přiléhající k buněčné membráně, Tyr<sup>1328</sup> a Tyr<sup>1334</sup> na C-konci  $\beta$ -podjednotky [50]. Fosforylací tyrosinů  $\beta$ -podjednotek se v buňce aktivují signalizační dráhy [50,51] vedoucí až k výše zmíněným dějům, které insulin ovlivňuje (Obrázek 11). Fosforylovaný Tyr<sup>960</sup> je rozpoznáván proteiny skupiny IRS (substráty insulinového receptoru). IRS-1/2 aktivuje enzym PI3K (fosfoinositol 3-kináza). Kináza je složena ze dvou podjednotek. Regulačním úsekem (p85) se váže s IRS-1 a katalyzační oblast (p110) způsobuje fosforylací fosfatidylinositolu-bisfosfátu v membráně (PIP<sub>2</sub>). Dále dochází k aktivaci dalších intracelulárních serin/threoninových kináz: PDK (fosfoinositol-dependentní proteinkináza), PKC (proteinkináza C), Akt (proteinkináza B) a substrátů (AS160) a výsledkem této kaskády je přesunutí intracelulárních váčků s glukózovými přenašeči směrem k membráně a možnost vstupu glukózy do buňky.



Obrázek 11. Signalizační dráhy aktivované vazbou molekuly insulinu k receptoru. Převzato z Björnholm a kol. [51].

Tato kaskáda je spojena i s aktivací mechanismů vedoucích k syntéze glykogenu. Autofosforylace insulinového receptoru způsobuje i aktivaci Shc tyrosinové fosfatázy, na kterou se dále napojuje signální dráha směřující k ovlivnění genové exprese. Její součástí

jsou proteiny Grb2 (protein-2 vázající receptor růstového faktoru), Sos, Ras (G-protein asociovaný s buněčnou membránou) a další, které vedou k aktivaci MAP kináz a následně k regulaci transkripce.

## 1.6. Glukózové přenašeče

Glukózové přenašeče [52] jsou membránové proteiny obsahující 12 transmembránových  $\alpha$ -šroubovic. Oba konce přenašečů směřují do cytoplazmatického prostoru buňky. Místo pro vazbu glukózy může být otočeno buď ven nebo naopak dovnitř, směrem do cytoplazmy. Navázání glukózy vně buňky vede ke konformačním změnám v molekule přenašeče a k uvolnění monosacharidu na opačné straně membrány. Vnitřní a vnější místa pro vazbu glukózy jsou pravděpodobně umístěna na 9., 10. a 11. transmembránovém segmentu. Již bylo identifikováno 13 glukózových přenašečů, které byly rozděleny do několika skupin podle sekvenčních podobností. Nejznámější a nejlépe charakterizovaná je první skupina skládající se ze čtyř členů (GLUT 1-4). GLUT 1 je obsažen v tkáních plodu a v dospělosti se vyskytuje v erytrocytech. Buňky jaterní tkáně a  $\beta$ -buňky mají ve svých membránách především přenašeč GLUT 2. GLUT 3 je nejvíce exprimován v neuronech. GLUT 4 se nachází v tukové a svalové tkáni (kosterní i srdeční). Právě tento přenašeč je jediný insulin-dependentní. Bez přítomnosti insulinu je oddělen od membrány a skladován uvnitř buňky ve formě vezikulů. Po působení insulinu dojde k přesunutí přenašeče na membránu a dále dochází k pasivní difúzi glukózy po koncentračním spádu směrem do buňky.

## 1.7. Modifikace insulinu v C-koncové části B-řetězce

Jak bylo řečeno v odstavcích 1.2.2. a 1.4.1., C-konec B-řetězce je velmi důležitý pro tvorbu insulinového dimeru a pro vazbu peptidu k receptoru. Navíc bylo zjištěno, že některé patogenní formy insulinu jsou mutovány právě ve výše zmíněné oblasti; insulin Chicago (Phe<sup>B25</sup>  $\rightarrow$  Leu<sup>B25</sup>) a insulin Los Angeles (Phe<sup>B24</sup>  $\rightarrow$  Ser<sup>B24</sup>) [53,54,55]. Studium analogů insulinu pozměněných právě v této části se zabývalo mnoho vědeckých skupin. Bylo připraveno a otestováno mnoho modifikovaných molekul, analogů, a proto si lze vytvořit poměrně dobrou představu o důležitosti jednotlivých aminokyselin v této oblasti

insulinu. Tabulka 1. uvádí některé tyto analogy, jejich vazebnou schopnost a biologickou aktivitu v porovnání s lidským insulinem.

Tabulka 1. Biologické aktivity a afinity některých analogů insulinu s modifikacemi v C-konci B-řetězce (především v poloze B26).

| insulinový analog                                    | biologická aktivita [%] | afinita [%] | odkaz |
|--|-------------------------|-------------|-------|
| lidský insulin                                       | 100                     | 100         |       |
| [D-Tyr <sup>B26</sup> ]-insulin                      |                         | 63          | [56]  |
| [Ala <sup>B26</sup> ]-insulin                        |                         | 82          | [57]  |
| [D-Ala <sup>B26</sup> ]-insulin                      |                         | 18          | [58]  |
| [D-Phe <sup>B24, B25</sup> ]-insulin                 | < 1                     | 0.8         | [59]  |
| [Tyr <sup>B24</sup> , Phe <sup>B26</sup> ]-insulin   |                         | 2           | [56]  |
| [Tyr <sup>B25</sup> , Phe <sup>B26</sup> ]-insulin   |                         | 82          | [56]  |
| [D-Tyr <sup>B24</sup> , Phe <sup>B26</sup> ]-insulin |                         | 163         | [56]  |
| [D-Tyr <sup>B25</sup> , Phe <sup>B26</sup> ]-insulin |                         | 0.1         | [56]  |
| [Tyr <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            |                         | 110         | [60]  |
| [D-Tyr <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>          |                         | 203         | [58]  |
| [Gly <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            |                         | 280         | [57]  |
| [Ala <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            |                         | 273         | [57]  |
| [D-Ala <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>          | 967                     | 1252        | [58]  |
| [Ser <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            | 225                     | 306         | [58]  |
| [Glu <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            | 204                     | 449         | [58]  |
| [Sar <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>            |                         | 1100        | [57]  |

Poznámka: Měření afinity k receptoru bylo provedeno metodou vytěšňování radioaktivně značeného insulinu neznačenými analogy na psích jaterních buňkách nebo na lidských IM-9 lymfocytech. Testování biologické aktivity spočívalo v určení schopnosti analogu stimulovat přenos radioaktivně značené glukózy do potkaních tukových buněk. DTI-NH<sub>2</sub>: Destreptid(B27-B30)-insulinB26-amid.

Z hodnot uvedených v tabulce lze předpokládat, že Tyr<sup>B26</sup> se přímo neúčastní vazby insulínu k receptoru. Dobře je v této poloze tolerován aromatický (D-Tyr) i alifatický (Ala) řetězec. Postranní řetězce aminokyselin B27–B30 nejsou nezbytné pro vazbu hormonu k receptoru, což bylo prokázáno testováním analogů obsahujících glyciny, které nemají žádný postranní řetězec [57]. Peptidová vazba B26-B27 je, zdá se, významná pro konformační změny, ke kterým dochází při vysokoafinitní interakci insulínu s receptorem [61]. Analogy s modifikací v poloze B26 a zároveň se zkráceným řetězcem o čtyři aminokyseliny vykazují vyšší afinitu než má lidský insulín, za podmínky, že záporný náboj COOH skupiny konce B-řetězce je neutralizován amidací. Z výsledků je opět patrné, že poloha B26 je velmi tolerantní a zkrácení insulínu o čtyři aminokyseliny má výrazně pozitivní vliv na vazbu k receptoru [58]. Podrobnější studie, které by objasnily funkci C-konce B-řetězce zatím nebyly provedeny. Methylace peptidové vazby vede k ztrátě možnosti tvořit vodíkové můstky (jak ve struktuře hormonu, tak při vazbě k receptoru) a omezuje lokální flexibilitu. Z vysoké afinity zkráceného analogu se sarkosinem (methylovaný glycin) v poloze B26 lze předpokládat, že vodík peptidové vazby B25-B26 není potřebný pro vazbu insulínu k receptoru [57].

## 1.8. Insulinové analogy v praxi

U nediabetických jedinců vede přijímání potravy k vzestupu koncentrace insulínu na maximum přibližně po 30 až 45 minutách. Na základní hladinu klesne množství hormonu za 2 až 3 hodiny. Během noci a v době mezi jídly je udržována hladina insulínu na nízké úrovni. Největší snahou při léčbě diabetu je dosažení podobného koncentračního profilu. Toho ovšem nelze docílit jen s použitím přirozeného lidského insulínu, což byl důvod k různým strukturním úpravám molekuly. Do praxe bylo zatím uvedeno několik analogů [62], které ulehčují pacientům obtíže spojené s frekvencí příjmu insulínu, dobou mezi aplikací a jídlem a následným kolísáním koncentrace glukosy v krvi. Pro klasický průběh dne je optimální kombinace lidského insulínu a analogů z následujících dvou skupin.

### 1.8.1. Analogy s okamžitým účinkem

Nutnost aplikovat insulin 30 až 60 minut před jídlem je pro pacienty omezující, a proto jsou k dispozici analogy, na jejichž účinek není třeba tak dlouho čekat. Zároveň jejich koncentrace v séru relativně rychle klesá, což redukuje riziko pozdní hypoglykémie. Tak je pacientům umožněna větší flexibilita a volnost v každodenní dietě.

Insulin **Lispro®** (či **Humalog®**) byl prvním rychle působícím analogem zavedeným do praxe. Změna ve struktuře spočívá v záměně aminokyselinových zbytků Pro<sup>B28</sup> a Lys<sup>B29</sup> (Lys<sup>B28</sup>, Pro<sup>B29</sup>-insulin). Toto snižuje schopnost molekul se sdružovat (tvořit dimerní a vyšší struktury) a výsledkem je rychlejší absorpce i nástup účinku. Mutace neovlivňuje doménu důležitou pro vazbu k insulinovému receptoru, a tudíž se analog váže podobně jako lidský insulin. Afinita k IGF 1 receptoru je mírně zvýšená, ovšem tento jev nemá na buňky žádný vliv [63]. Farmakokinetické studie prokazují, že insulin Lispro začíná působit po 15 minutách, maximální účinek nastává přibližně 1 hodinu po aplikaci a k odeznění dojde po 2 až 4 hodinách [64,65]. Imunitní systém se k insulinu Lispro chová podobně jako k lidskému insulinu, specifické protilátky se vyskytují jen zřídka [66].

Insulin **Aspart®** je pozměněn v poloze B28. Původně přítomný prolin je nahrazen asparagovou kyselinou (Asp<sup>B28</sup>-insulin). Záporný náboj postranního řetězce brání sdružování molekul analogu, a tudíž může dojít k rychlejší absorpci [67]. Analog je absorbován dvakrát rychleji než lidský insulin a jeho účinek je kratší [68]. Studie prokázaly, že síla vazby k insulinovému i IGF 1 receptoru je shodná s lidským insulinem [69]. Stejně jako Lispro insulin redukuje tento analog výskyt pozdní hypoglykémie.

Insulin **Glulisin®** je nejnovějším analogem této skupiny uvedeným do praxe. Obsahuje záměnu aminokyselinových zbytků na dvou místech oproti lidskému insulinu. V poloze B3 je namísto asparaginu lysin a lysin v poloze B29 je nahrazen glutamovou kyselinou (Lys<sup>B3</sup>, Glu<sup>B29</sup>-insulin). Chování analogu vůči receptoru je shodné s lidským insulinem. Aktivace receptoru nastává přibližně 10 minut po aplikaci. Bylo zjištěno, že insulin Glulisin má dokonce nižší mitogenní aktivitu na lidské prsní buňky než lidský insulin [70].

### 1.8.2. Analogy s dlouhou dobou působení

Tyto analogy jsou důležité pro dobu mezi jídly a v noci, kdy by měly udržovat hladinu glukózy na normální úrovni. Zároveň mají pacientům umožnit co nejmenší počet nutných injekcí během dne. Prodlouženého účinku insulínu je možno dosáhnout oddálením interakce molekuly s insulinovým receptorem, čehož lze docílit několika způsoby. První z nich je změna izoelektrického bodu insulínu (pI) z hodnoty 5,4 blíže k neutrální hodnotě. Za tímto účelem jsou připravovány analogy s více pozitivně nabitými postranními řetězci aminokyselinových zbytků. Po aplikaci takového analogu do tkáně dojde, vzhledem k snížené rozpustnosti, ke krystalizaci a tím k oddálení nástupu účinku [71]. Další způsob spočívá v navázání mastné kyseliny na molekulu insulínu a v následné zvýšené afinitě analogu k albuminu. V této formě je velké procento aplikované látky blokováno v plamě vazbou na albumin a k uvolňování dochází postupně.

Insulin **Glargin**® (HOE 901) obsahuje v poloze A21 místo asparaginu glycin a C-konec B-řetězce je navíc prodloužen o dva argininové zbytky (Gly<sup>A21</sup>, Arg<sup>B31</sup>, Arg<sup>B32</sup> - insulin). Uvedené změny přibližují izoelektrický bod analogu k neutrálnímu pH. Po aplikaci insulínu Glargin dojde ke vzniku mikroprecipitátů, ze kterých je látka postupně uvolňována. Při interakci s receptorem se tento analog chová podobně jako lidský insulin, jeho afinita k IGF 1 receptoru je jen nepatrně zvýšená [72,73,74]. Efekt na snižování glukózy má insulin Glargin přibližně po dobu 24 hodin po aplikaci, je tedy užíván jednou denně. Riziko hypoglykémie je shodné nebo o trochu nižší než u lidského insulínu NPH (Neutral Protamin Hagedorn–insulin; lidský insulin vázaný na zásaditou bílkovinu protaminsulfát, s příměsí zinku) [75]. Dokonce i reakce v místě vpichu a tvorba protilátek jsou podobné NPH insulínu.

Insulin **Detemir**® je analog, u něhož je oddálená doba interakce s receptorem opět zajištěna jeho zvýšenou afinitou k transportnímu proteinu albuminu. Vazbu k proteinu zajišťuje kyselina myristová (C14), která je amidovou vazbou připojena k Lys<sup>B29</sup>. Aminokyselinový zbytek Thr<sup>B30</sup> je odštěpen. Navíc je u tohoto analogu podpořena tvorba hexamerů. Studie prokázaly, že insulin Detemir má v porovnání s lidským insulinem sníženou afinitu jak k insulinovému receptoru tak k IGF 1 receptoru. Užívání tohoto preparátu vede u pacientů k zřetelné redukci hypoglykemických stavů. Nežádoucí účinky jsou srovnatelné s lidským insulinem. Podle potřeb pacienta je insulin aplikován jednou či dvakrát denně, doba působení je přibližně 20 hodin [76].



## 1.9. Výsledky některých výzkumů v oblasti insulinových analogů modifikovaných v C-koncové části B-řetězce

Insulinové analogy připravené v posledních letech v laboratoři RNDr. Jiráčka v ÚOCHB AV ČR měly za úkol poodhalit úlohu a důležitost tyrosinu v poloze B26. Vzhledem k nejasné roli aminokyselin B27-B30 a zajímavým výsledkům u analogů zkrácených právě o tyto čtyři aminokyseliny byly syntetizovány destetrapeptid(B27-B30)-insulinové analogy s amidací karboxylové skupiny v poloze B26 [77]. Mimo jiné se jednalo i o analogy [His<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, které ve výsledcích projevily velmi silnou vazebnou afinitu k insulinovému receptoru, a to 529% a 5250% v porovnání s lidským insulinem. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit nezkrácené analogy lidského insulinu s His či NMeHis v poloze B26. Cílem bylo zjistit, jaký je vliv těchto modifikací, které se pozitivně projeví u zkrácených analogů (destetrapeptid(B27-B30)-insulinB26-amidů), na aktivitu insulinových analogů plné délky.

V minulosti Leyer a kol. [57] publikovali přípravu analogu [Sar<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, který vykázal 1100% vazebné afinity vůči receptoru vzhledem k lidskému insulinu. O tři roky později Kurapkat a kol. [58] připravili další zkrácený analog, [D-Ala<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, jehož vazebná afinita byla dokonce 1252 % vzhledem k lidskému insulinu. Z těchto důvodů jsme se rozhodli připravit a zjistit vazebnou afinitu strukturně podobného [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a rovněž i nezkráceného analogu se stejnou modifikací v poloze B26.

Jedna z našich posledních studií byla věnována zjištění strukturně-funkčních souvislostí mezi insulinem a IGF 1. IGF 1 je totiž v určitých úsecích podobný insulinu a navíc se nízkoafinitně váže k insulinovému receptoru [41]. Studie provedené s analogy insulinu se strukturními motivy vyskytujícími se v IGF 1 mohou pomoci vyjasnit důvod, proč má insulin převážně metabolickou aktivitu a IGF 1 převážně růstové efekty na organismus. Z tohoto důvodu byl v minulosti připraven insulinový analog [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>]-insulin, kde bylo vyměněno aminokyselinové obsazení poloh B25 a B26 a přidána methylace dusíku na Phe<sup>B26</sup> [78]. Afinita analogu k insulinovému receptoru byla snížena v porovnání s lidským insulinem (25%), což potvrzuje důležitost Phe v poloze B25. Krystalografické studie neprokázaly původně předpokládaný ohyb řetězce v poloze B26 po vzoru IGF 1, ale prohnutí části B23-B29 směrem k jádru molekuly, k aminokyselinám A1 a A2. Rozhodli jsme se tedy připravit a ve spolupráci

s laboratoří Strukturní biologie na Univerzitě v Yorku (Velká Británie) krystalizovat a vyřešit 3D-strukturu [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu. Předpokladem bylo, zda dodatečná záměna aminokyselin Lys a Pro vyvolá očekávaný strukturní ohyb v C-konci B-řetězce.

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Příprava a biologická charakterizace nezkrácených insulinových analogů [**His<sup>B26</sup>**]-insulinu a [**NMeHis<sup>B26</sup>**]-insulinu.
2. Příprava a zjištění vazebné afinity a biologické aktivity [**NMeAla<sup>B26</sup>**]-DTI-NH<sub>2</sub> a [**NMeAla<sup>B26</sup>**]-insulinu.
3. Příprava a charakterizace [**Tyr<sup>B25</sup>NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>**]-insulinu.
4. Krystalizace a určení 3D-struktury (pomocí rentgenové difrakce) [**Tyr<sup>B25</sup>NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>**]-insulinu a popřípadě i dalších insulinových analogů.

## 3. METODY PRÁCE

### 3.1. Klíčové materiály

Výchozí látkou pro přípravu DOI byl vepřový insulin (šarže 1603/06) od firmy SPOFA (Česká republika). Na štěpení insulinu a enzymovou semisyntézu byl použit TPCK-Trypsin (T-1426) dodaný od firmy Sigma-Aldrich (Německo) nebo TPCK-Trypsin (TRTVMF) od firmy Worthington (USA). Aminokyseliny potřebné pro syntézu oligopeptidů byly zakoupeny u firmy NovaBiochem (Švýcarsko): Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-MeAla-OH, Fmoc-MePhe-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. Aminokyselina Fmoc-MeHis(Trt)-OH byla dodána od firmy Anaspec (Japonsko). Fmoc-Lys(Pac)-OH byl připraven v laboratoři Dr. Zyký v ÚOCHB AV ČR [81]. Další materiály potřebné pro syntézu peptidů, Sieber amidová pryskyřice, 2-Cl-tritylová pryskyřice, kondenzační činidla HBTU, PyBrop byly také zakoupeny u firmy NovaBiochem. Enzym, penicillin G acyláza z *E. coli* (E.C.3.5.1.11), použitý při odchránění  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinu byl dodán firmou Fluka (Sigma-Aldrich, Německo). *In vitro* testování bylo provedeno s použitím značeného vepřového insulinu mono- $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{\text{A14}}$ -insulin (NEN) nebo značeného lidského insulinu mono- $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{\text{A14}}$ -insulin (Amersham).

### 3.2. Použité přístroje

Byly použity tyto přístroje: centrifuga Jouan CR3i (Francie), filtrační přístroj Brandel (Gaithersburg, USA), filtry Whatman GF/B (Velká Británie), frakční sběrač Waters MILIPORE (Japonsko), lyofilizační přístroj Heto FD3 (Dánsko), peristaltická pumpa Gilson Minipuls 2 (Francie), spektrofotometr JENWAY 6105 (Velká Británie), vakuová odparka Heidolph WB 2000 (Německo), vysokoučinná kapalinová chromatografie: přístroje firmy Waters (USA) - Waters 600 Controller, Detektor Waters 2487,  $\gamma$ -counter Wizard 1470 (Perkin Elmer, USA).

### 3.3. Seznam použitých zkratek

BSA - hovězí sérový albumin

DIPEA - N,N-diisopropylethylamin

DCM - dichloromethan

DMF - N,N-dimethylformamid

DOI - desoktapeptid(B23-B30)-insulin

DTI-NH<sub>2</sub> - destetrapeptid(B27-B30)-insulinB26-amid

Fmoc - 9-fluorenylmethoxykarbonyl

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

NMP - N-methyl-2-pyrrolidon

Pac - fenylacetyl

PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid

PyBrop - bromo-tris-pyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfat

tBu - *tert*-butyl

TFA - trifluoroctová kyselina

TFE - 2, 2, 2-trifluorethanol

TIS - triisopropylsilan

Tris/HCl - 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol hydrochlorid

Trt - trityl

### **3.4. Příprava desoktapeptid(B23 – B30)insulinu (DOI)**

#### **3.4.1. Odstranění $Zn^{2+}$ z komerčně dodaného insulinu**

Odstranění  $Zn^{2+}$  z krystalického insulinu bylo provedeno podle Carpentera a kol. [80]. 1 g vepřového insulinu byl rozpuštěn v 70 ml 0,25M HCl. Přilítí 1 litru vychlazeného acetonu (4 °C) způsobilo vysrážení insulinu. Směs byla ponechána přes noc v místnosti s teplotou 4 °C. Druhý den byla směs přenesena do centrifugačních kyvet a odstředěna (20 minut, 2000 × g). Peleta byla promyta vychlazeným acetonem a opět odstředěna. K 20 ml supernatantu bylo přidáno 50 ml vychlazeného acetonu, aby došlo k ověření úplného vysrážení insulinu. Po vyschnutí byla peleta v centrifugačních kyvetách rozpuštěna v 10% (v/v) kyselině octové a vzniklý roztok lyofilizován.

#### **3.4.2. Enzymové štěpení insulinu po odstranění $Zn^{2+}$**

Insulin byl štěpen metodou podle Bromera a kol. [81]. 500 mg insulinu po odstranění  $Zn^{2+}$  bylo rozpuštěno v 100 ml 0,05M Tris/HCl (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol hydrochlorid) pufru pH 9,0-9,2. Bylo odváženo 10 mg TPCK-trypsinu a rozpuštěno v 10 ml 0,1M  $CaCl_2$ . Roztok enzymu byl přidán k roztoku insulinu a reakce se nechala probíhat při pokojové teplotě za stálého míchání. Po uplynutí 20 hodin bylo pH směsi upraveno přidáním 1M HCl na hodnotu 5,4, čímž došlo vysrážení produktů reakce. Směs byla přenesena do centrifugačních kyvet a odstředěna (20 minut při 2000 × g). Supernatant byl oddělen a peleta obsahující DOI byla rozpuštěna v 10% kyselině octové a zlyofilizována.

#### **3.4.3. Purifikace DOI**

Lyofilizát byl rozpuštěn v malém množství 10% kyseliny octové a nanesen na chromatografickou kolnu obsahující Sephadex G50 (Medium) (120 × 3,4 cm). Jako mobilní fáze sloužila 10% kyselina octová. Gelová chromatografie probíhala při pokojové teplotě, rychlost průtoku byla 1 ml za minutu. Pro sbírání frakcí byl použit automatický frakční sběrač. Do každé zkumavky byl jímán objem 15 ml. Absorbance jednotlivých frakcí byla změřena při vlnové délce 276 nm. Frakce které obsahovaly DOI byly spojeny a lyofilizovány.

## 3.5. Příprava peptidů

### 3.5.1. Příprava tetrapeptidů

K syntéze tetrapeptidů, které obsahují na svém C-konci amidovou skupinu, byla použita Sieber amidová pryskyřice. Syntetická reakce probíhala v injekční stříkačce se zabudovanou fritou v prostředí NMP (N-methyl-2-pyrrolidon). Molární množství aminokyselin vstupujících do reakce odpovídalo trojnásobku molárního množství použité pryskyřice. Dále bylo do reakce zařazeno kondenzační činidlo HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát), rovněž v trojnásobném množství k pryskyřici a DIPEA (N,N-diisopropylethylamin) v šestinásobném množství [82,83]. Aminokyseliny i HBTU byly rozpuštěny v 500 ml NMP. Všechny komponenty reakce byly do stříkačky nasávány prostřednictvím jehly. Reakce probíhala alespoň 1,5 hodiny. Kontrola úplnosti navázání aminokyselin byla provedena prostřednictvím Kaiserova testu na přítomnost primárních aminoskupin [84]. Podle výsledků testu se buď zopakovala kondenzační reakce se stejnou aminokyselinou nebo se přistoupilo k odchránění aminoskupiny právě navázané aminokyseliny. Primární aminoskupiny aminokyselin byly blokovány prostřednictvím Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl) chránicí skupiny, což znemožnilo nechtěné prodlužování řetězce. Odštěpení těchto skupin probíhalo opakovaným působením 30% piperidinu v DMF (N,N-dimethylformamid). Absorbance dibenzofulven-piperidinového komplexu, vznikajícího po odštěpení Fmoc skupin, byla proměřena na spektrofotometru při 301 nm a z ní byla vypočítána účinnost reakce ( $\epsilon=7040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Některé tetrapeptidy obsahovaly methylovanou aminoskupinu. U aminokyselin, které následovaly za těmito methylovanými aminokyselinami, bylo pro navázání použito kondenzační činidlo PyBrop (bromo-tris-pyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfat) ve stejném poměru k pryskyřici jako výše zmíněné činidlo HBTU [85]. Vzhledem k obecně horší účinnosti, kondenzační reakce takového typu probíhaly přinejmenším třikrát po dobu nejméně tří hodin. Tetrapeptid byl odštěpen od pryskyřice ve dvou krocích. Oba druhy štěpení probíhaly ve skleněném reaktorku. Nejprve byla použita směs obsahující 5% TFA (trifluoroctová kyselina), 2,5% TIS (triisopropylsilan) a 2,5% H<sub>2</sub>O v DCM (dichloromethan). Tato frakce byla odpařena na vakuové odparce dosucha, promyta diethyletherem, rozpuštěna v 10% kyselině octové a přečištěna na RP-HPLC. Druhé štěpení tetrapeptidu od pryskyřice probíhalo prostřednictvím směsi obsahující 50% TFA; 2,5% TIS a 2,5% H<sub>2</sub>O

v DCM. Další postup s touto frakcí byl stejný jako v předchozím případě štěpení. Identita produktu byla ověřena pomocí hmotnostní spektroskopie (viz. 3.9.).

### 3.5.2. Příprava oktapeptidů

Pro syntézu oktapeptidů byla použita 2-Cl-tritylová pryskyřice [86]. Na rozdíl od tetrapeptidů probíhalo navázání první aminokyseliny na pryskyřici ve skleněném reaktoru. K pryskyřici byl přidán 1 ekvivalent aminokyseliny s 6 ekvivalenty DIPEA v DCM. Směs reagovala 2 hodiny. Po navázání aminokyseliny byla pryskyřice ponechána 15 minut ve směsi DCM : MeOH : DIPEA (17:2:1) za účelem zablokování zbývajících chloridových skupin. Dále už syntéza oktapeptidu pobíhala analogicky jako syntéza tetrapeptidu. Specialitou syntézy oktapeptidů je použití lysinu s  $\epsilon$ -aminoskupinou chráněnou fenylacetylem (Pac) odštěpitelným enzymově pomocí penicillin G acylázy (E.C.3.5.1.11). Od pryskyřice byl oktapeptid odštěpen působením 20 % AcOH, 20% TFE (2, 2, 2-trifluorethanol) v DCM. Produkt štěpení byl odpařen na vakuové odparce a poté rozpuštěn ve směsi 50% TFA, 2% TIS, 2% H<sub>2</sub>O v DCM, která způsobila odštěpení ostatních chránících skupin s výjimkou Pac skupiny na postranním řetězci lysinu. Poté byla reakční směs odpařena dosucha, promyta diethyletherem, rozpuštěna v 10% kyselině octové a přečištěna na RP-HPLC. Identita produktu byla ověřena pomocí hmotnostní spektroskopie (viz. 3.9.).

### 3.6. Enzymová semisyntéza

Enzymová semisyntéza byla provedena podle Žákové a kol. [79]. DOI a oligopeptid (tetrapeptid či oktapeptid) byly spojeny kondenzační reakcí katalyzovanou trypsinem. Semisyntéza probíhala v roztoku skládajícím se z 55% (v/v) DMF a 45% (v/v) 50 mM octanu vápenatého. Celkový objem reakční směsi byl 200  $\mu$ l. Oligopeptid (150 mM) byl rozpuštěn v 110  $\mu$ l DMF a 40  $\mu$ l 50 mM octanu vápenatého. K roztoku byl přidán DOI (30 mM). TPCCK-trypsin v molárním poměru enzym/DOI 1:50 byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l 50 mM octanu vápenatého a přidán do reakční směsi. pH reakční směsi bylo upraveno přidáním N-methylmorpholinu na hodnotu 6,9 až 7,1. Semisyntéza probíhala za neustálého míchání a její průběh byl sledován na analytické koloně pomocí RP-HPLC. K ukončení reakce došlo po přidání acetonu, který způsobil vysrážení peptidů. Sediment



byl rozpuštěn v 10% kyselině octové a jeho jednotlivé peptidové složky byly rozděleny na semipreparativní koloně RP-HPLC. Acetonová fáze, obsahující převážně výchozí oligopeptid, byla odpařena a rovněž preparována pomocí RP-HPLC. Jednotlivé frakce byly lyofilizovány a proměřeny pomocí hmotnostní spektroskopie (viz. 3.9.).

### **3.7. Odštěpení fenylacetylové skupiny z postranního řetězce lysinu analogů**

Tato část byla provedena podle Žákové a kol. [79]. 5 mg insulinového analogu s  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu chráněnou pomocí fenylacetylu bylo rozpuštěno v 1 ml 0,05 M K-fosfátovém pufru pH 7,5. Do roztoku bylo přidáno 5  $\mu$ l penicillin G acylázy (10 UI v 6,6  $\mu$ l pufru). Reakce probíhala při laboratorní teplotě a byla sledována pomocí analytické RP-HPLC. Po dokončení reakce byl produkt preparován použitím semipreparativní RP-HPLC. Získaná frakce byla lyofilizována a identita produktu ověřena pomocí hmotnostní spektroskopie (viz. 3.9.).

### **3.8. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Analytické kontroly průběhu reakcí a následné dělení produktů bylo prováděno metodou RP-HPLC na přístrojích firmy Waters. Pro analytická stanovení byla používána kolona Watrex (Nucleosil 120-5 C-18, 250  $\times$  4 mm, průtok 1 ml/min), pro purifikaci produktů semisyntéz kolona Watrex (Nucleosil 120-5 C-18, 250  $\times$  4 mm, průtok 3 ml/min) a pro purifikaci výchozích oligopeptidů kolona Luna (Phenomenex C-18, 250  $\times$  21,2 mm, průtok 9 ml/min). Proces vymývání z kolony byl zajištěn stoupajícím procentem acetonitrilu obsahujícím 0,1% (v/v) TFA v deionizované vodě s 0,1% (v/v) TFA. Gradient acetonitrilu měl pro různé oligopeptidy a analogy insulinu různý průběh. Detekce byla prováděna měřením absorpance při 258 a 218 nm.

### 3.9. Hmotnostní spektroskopie

Ověření kvality a čistoty meziproductů i výsledných analogů bylo provedeno v laboratoři hmotnostní spektroskopie ÚOCHB AV ČR. Měření relativní molekulové hmotnosti peptidů bylo provedeno pomocí dvou hmotnostně spektrometrických metod. Spektra syntetických oktapeptidů či tetrapeptidů byla měřena metodou FAB-MS na sektorovém hmotnostním spektrometru ZAB-EQ (VG Analytical), za použití xenonu a jako matrice byla použita směs thioglycerin: glycerin (1:1). Hmotnostní spektra analogů insulinu byla měřena metodou MALDI-MS na přístroji MALDI-TOF Reflex IV (Bruker-Daltonics). Byl použit dusíkový laser o vlnové délce 337 nm, jako matrice byla použita sinapová kyselina rozpuštěná v 50% vodném roztoku acetonitrilu a 0,1% TFA. Spektra byla měřena v refletronovém módu a akcelerační napětí bylo 20000 V.

### 3.10. Testování vazebné afinity insulinových analogů *in vitro*

#### 3.10.1. Izolace a zpracování potkaních tukových buněk

Tato část práce byla provedena podle Zórada [87]. Pro získání membrán tukových buněk byli použiti samci potkanů (kmen Wistar) o hmotnosti 210-250 g. Po usmrcení byl samcům vyjmut epididymální tuk, který byl homogenizován v izolačním pufru (250 mM sacharóza, 1 mM PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid), 1 mM benzamidin hydrochlorid a 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) pomocí ultra-turraxu (10 ml pufru na 5 g tuku). Poté byla směs odstředěna (15 minut, 3000 × g, 4 °C), supernatant slit do čistých kyvet a opět odstředěn (15 minut, 17000 × g, 4 °C). Dále byla zpracována peleta, která byla přenesena v 1 ml homogenizačního pufru (50 mM Tris/HCl, pH 7,6) do skleněného homogenizátoru a znovu homogenizována teflonovým pístem. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradfordové [88]. Membrány byly ředěny homogenizačním pufrům za účelem upravení koncentrace proteinů na hodnotu 50 µg/25 µl.

#### 3.10.2. Vazebné studie

Testování afinity insulinového analogu k insulinovému receptoru probíhá jako kompetice mezi analogem a insulinem značeným radioaktivním izotopem <sup>125</sup>I na tyrosinu A14. K testování byla použita metoda podrobně popsána v Žáková a kol. [79].

Do zkumavek bylo postupně napipetováno 180  $\mu\text{l}$  vazebného pufru (2 mM N-ethylmaleimid, 13,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% BSA (hovězí sérový albumin), 100 mM Tris/HCl, pH 7,6), 25  $\mu\text{l}$  roztoku insulinového analogu o různé koncentraci ( $10^{-12}$ - $10^{-5}$  M), 20  $\mu\text{l}$  roztoku  $^{125}\text{I}$ -insulinu (50 pM~57 000 dpm) a takový objem roztoku plazmatických membrán, aby obsahoval 50  $\mu\text{g}$  proteinů (obvykle 25  $\mu\text{l}$  roztoku). Celkový objem byl 250  $\mu\text{l}$ . Reakční směs byla inkubována 21 hodin v místnosti s teplotou 4  $^\circ\text{C}$ . Po uplynutí této doby byl obsah zkumavek zředěn vychlazeným 120 mM roztokem chloridu sodného a filtrován. Plazmatické membrány s určitým poměrem navázaného  $^{125}\text{I}$ -insulinu a neznačeného insulinového analogu byly zachyceny na filtrech, které byly následně proměřeny na přístroji  $\gamma$ -counter. Výsledky po měření radioaktivity byly zpracovány v programu MS Excel a Graph-Pad Prizm 3.

### 3.11. Testování insulinových analogů *in vivo*

Studie byly provedeny v laboratoři Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM, Praha) pod vedením Ing. Ludmily Kazdové, CSc. Pro testování byli použiti samci potkanů kmene Wistar (190-210 g). Byly připraveny roztoky insulinových analogů o koncentraci 4 mezinárodní jednotky (IU) na 1 ml roztoku. Jedna IU odpovídá 6 nmolům insulinu či analogu. Podle váhy potkanů byl vypočítán objem injektovaného roztoku tak, aby vždy připadly 4 IU na 1 kg váhy zvířete. V patnáctiminutových intervalech byla potkanům odebírána krev a měřena hladina krevní glukózy.

### 3.12. Krystalografické studie analogů insulinu

Krystalizace insulinových analogů [ $\text{Tyr}^{\text{B25}}$ , $\text{NMePhe}^{\text{B26}}$ , $\text{Lys}^{\text{B28}}$ , $\text{Pro}^{\text{B29}}$ ]insulinu a [ $\text{NMeAla}^{\text{B26}}$ ]DTI-NH<sub>2</sub> byla provedena v laboratoři Strukturní biologie na Univerzitě v Yorku ve Velké Británii pod vedením Dr. A. Marka Brzozowského. Krystaly byly získány metodou visící kapky. Roztok [ $\text{Tyr}^{\text{B25}}$ , $\text{NMePhe}^{\text{B26}}$ , $\text{Lys}^{\text{B28}}$ , $\text{Pro}^{\text{B29}}$ ]insulinu (5,8 mg/ml) v 20 mM HCl byl v kapce smíchán s mateřským roztokem v poměru 2:1 (1,6  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu a 0,8  $\mu\text{l}$  mateřského roztoku). Poměr roztoku analogu [ $\text{NMeAla}^{\text{B26}}$ ]DTI-NH<sub>2</sub> (7 mg/ml) v 20 mM HCl a mateřského roztoku byl 1:1 (0,8  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu a 0,8  $\mu\text{l}$  mateřského roztoku). Složení mateřských roztoků uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1. Složení mateřských roztoků pro krystalizaci insulinových analogů.

| analog  | mateřský roztok  |
|---|--|
| [Tyr <sup>B25</sup> ,NMePhe <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B28</sup> ,Pro <sup>B29</sup> ]insulin | 0,8 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,3 M Tris/HCl (pH 8,2)<br>60 mM citrát sodný<br>0,6 μM ZnAc <sub>2</sub><br>0,06 % fenol (w/v) |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]DTI-NH <sub>2</sub>   | 0,32 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,1 M NaAc (pH 3)<br>14,8 mM HCl   |

Krystalizace proteinů probíhala při teplotě 19°C. Krystaly byly zmrazeny v kapalném dusíku a proměřeny rentgenovou difrakcí. Ze získaných hodnot je v současnosti řešena 3D-struktura.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Příprava desoktapeptid(B23–B30)-insulinu (DOI)

#### 4.1.1. Odstranění $Zn^{2+}$ z komerčního vepřového insulinu

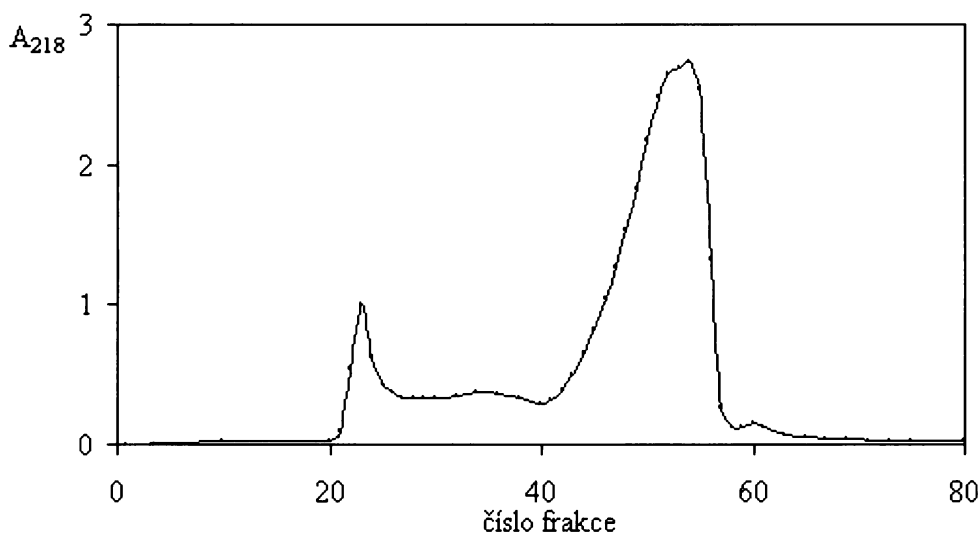
Insulin je dodáván ve formě vázající  $Zn^{2+}$  a v takovém případě se v roztoku vyskytuje jako hexamer. Před štěpením insulinu trypsinem je třeba  $Zn^{2+}$  odstranit, aby bylo místo pro štěpení enzymem dobře přístupné. Oddělení proteinu od  $Zn^{2+}$  je zajištěno precipitací insulinu acetonem. Doba uvedená v odstavci 3.4.1. byla dostačující pro kvantitativní průběh srážení proteinu. Výtěžek insulinu po odstranění  $Zn^{2+}$  byl 97%.

#### 4.1.2. Enzymatické štěpení insulinu po odstranění $Zn^{2+}$

Trypsin štěpí peptidové vazby za bazickými aminokyselinami Arg a Lys. Každá z těchto aminokyselin se v insulinovém řetězci vyskytuje jen jednou, a to v polohách Arg<sup>B22</sup> a Lys<sup>B29</sup>. Po ukončení enzymového štěpení insulinu byl ve směsi přítomný DOI, heptapeptid a aminokyselina Ala. Po odstředění byla peleta rozpuštěna v 10% kyselině octové a lyofilizována.

#### 4.1.3. Oddělení DOI od ostatních členů štěpící reakce

Po rozdělení produktů štěpení gelovou chromatografií (Obrázek 12) byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí při 218 nm. Frakce 40 až 58 byly spojeny a lyofilizovány. Výtěžek konečného produktu (DOI) byl 69% (vztaženo na výchozí molární množství insulinu zbaveného zinku). Čistota produktu byla ověřena pomocí RP-HPLC a hmotnostní spektroskopie (MALDI-TOF).



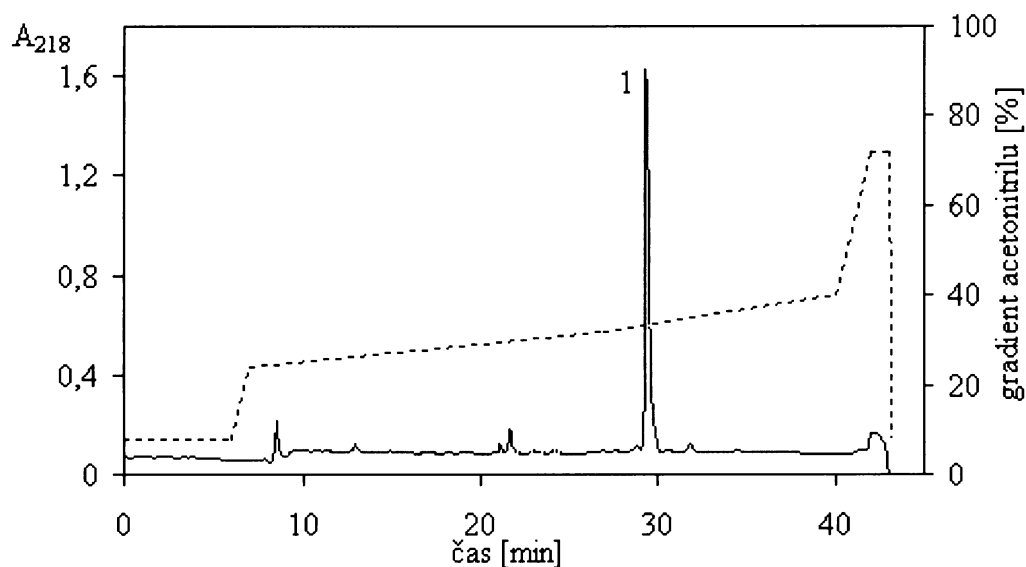
Obrázek 12. Absorbance frakcí získaných gelovou chromatografií. Frakce 40-58 obsahovaly čistý DOI.

## 4.2. Příprava peptidů

Syntézou na pevné fázi byly připraveny dva tetrapeptidy, jejichž koncová karboxylová skupina byla amidována, a čtyři oktapeptidy s volnou C-koncovou karboxylovou skupinou. Po purifikaci produktu syntetické reakce na RP-HPLC (příklad purifikace je uveden na Obrázku 13) a lyofilizaci byl výtěžek vypočítán vztahem k množství použité Sieber Amidové či 2-Cl-tritylové pryskyřice. Ověření identity produktu bylo provedeno hmotnostní spektroskopií, metodou FAB (Tabulka 2). Čistota peptidů byla ověřena pomocí RP-HPLC a v případě všech látek byla více než 95 %.

Tabulka 2. Výtěžky syntéz peptidů a příslušné teoretické a experimentální relativní molekulové hmotnosti (monoisotopické).

| oligopeptid               | výtěžek syntézy [%] | $[MH^+]_{\text{teor}}$ | $[MH^+]_{\text{exp}}$ |
|---------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| GFF(NMe)A-NH <sub>2</sub> | 53                  | 454,24                 | 454,40                |
| GFF(NMe)H-NH <sub>2</sub> | 29,6                | 520,26                 | 520,60                |
| GFFHTPK(Pac)T-OH          | 20,4                | 1052,51                | 1052,40               |
| GFF(NMe)HTPK(Pac)T-OH     | 21,7                | 1066,53                | 1066,80               |
| GFF(NMe)ATPK(Pac)T-OH     | 35,5                | 1000,51                | 1001,00               |
| GFY(NMe)FTK(Pac)PT-OH     | 24,6                | 1092,53                | 1092,70               |



Obrázek 13. Chromatografické „přečištění“ produktu syntetické reakce. Vrchol 1 je GFY(NMe)FTK(Pac)PT-OH. Zároveň je naznačen průběh gradientu acetonitrilu.

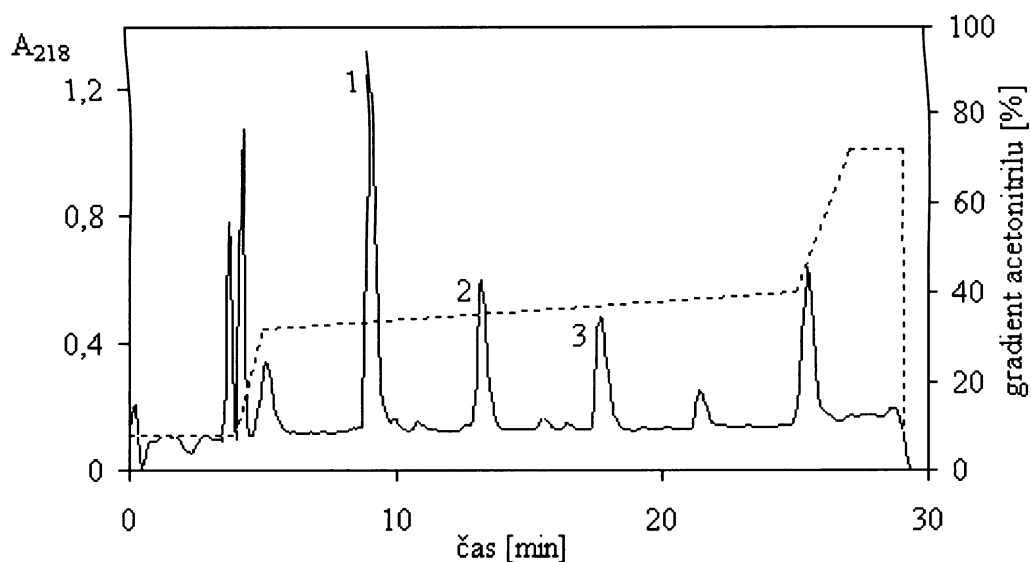
### 4.3. Enzymová semisyntéza

Kondenzační reakce oligopeptidů a DOI probíhala 7-30 hodin, podle nárůstu produktu, který byl sledován na analytické PR-HPLC koloně. Dělení reakční směsi bylo provedeno na semipreparativní koloně RP-HPLC.

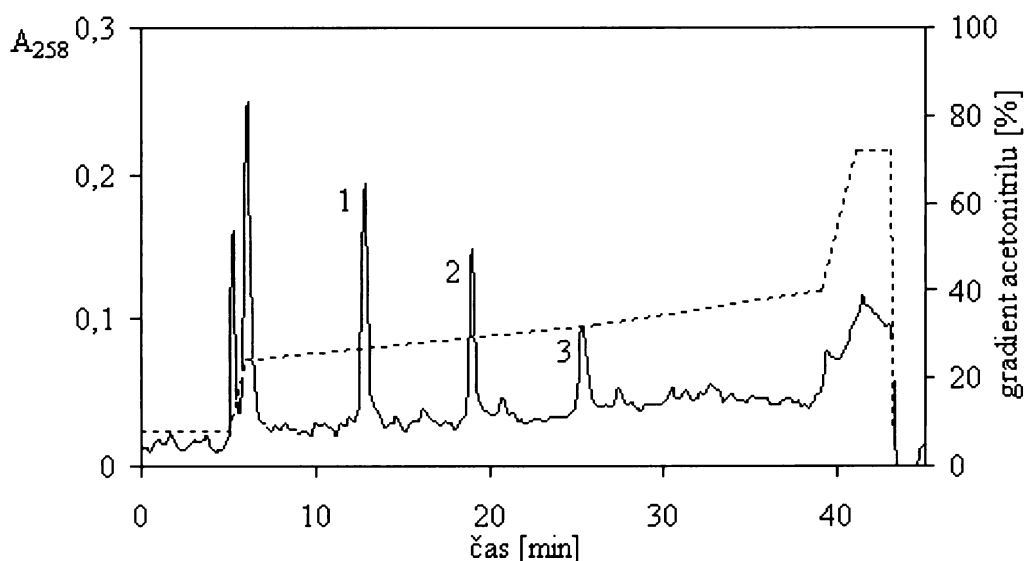
Tabulka 3. Doby trvání a výtěžky enzymových semisyntetických reakcí, teoretické a experimentální relativní molekulové hmotnosti (monoisotopické) insulinových analogů s Pac na N<sup>ε</sup>-Lys v poloze B29 nebo B28.

| insulinový analog   | doba reakce | výtěžek syntézy | $[MH^+]_{teor}$ | $[MH^+]_{exp}$ |
|---|-------------|-----------------|-----------------|----------------|
|   | [hod]       | [%]             |                 |                |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>  | 11          | 26              | 5298,47         | 5298,69        |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>  | 6           | 15              | 5364,49         | 5364,18        |
| [His <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B29</sup> (Pac)]-insulin  | 7           | 16              | 5896,67         | 5895,71        |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B29</sup> (Pac)]-insulin   | 24          | 12              | 5910,69         | 5910,80        |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B29</sup> (Pac)]-insulin   | 6,5         | 18              | 5844,66         | 5844,30        |
| [Tyr <sup>B25</sup> ,NMePhe <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B28</sup> (Pac),Pro <sup>B29</sup> ]-insulin | 31          | 11              | 5936,69         | 5936,75        |

Výtěžek reakce byl vztažen k počátečnímu množství DOI, který tvořil limitující faktor semisyntézy. Produkt reakce byl charakterizován hmotnostní spektroskopií, metodou MALDI-TOF. Doby reakcí, výtěžky a výsledky hmotnostní spektroskopie jsou zaznamenány v Tabulce 3. Příklady dělení dvou semisyntetických směsí jsou znázorněny na Obrázcích číslo 14, 15. Zároveň je v grafech naznačen průběh gradientu acetonitrilu.



Obrázek 14. Chromatografické dělení semisyntetické směsi: Vrchol 1-DOI, 2-oligopeptid GFY(NMe)FTK(Pac)PT-OH, 3-produkt [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>(Pac), Pro<sup>B29</sup>]-insulin.



Obrázek 15. Chromatografické dělení semisyntetické směsi: Vrchol 1-DOI, 2-oligopeptid GFF(NMe)HTPK(Pac)T-OH, 3-produkt [NMeHis<sup>B26</sup>,Lys<sup>B29</sup>(Pac)]-insulin.

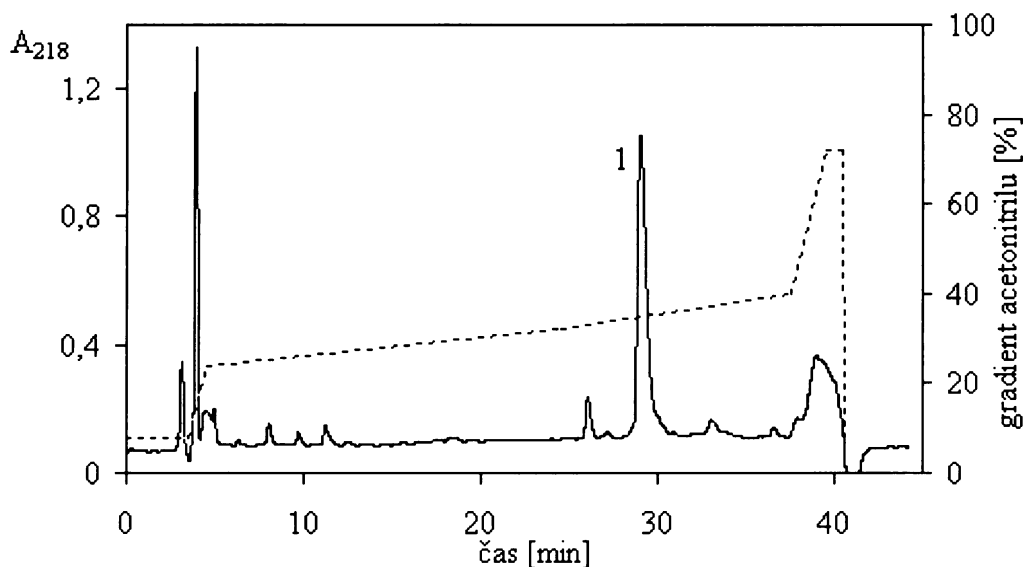


#### 4.4. Odštěpení fenylacetylové skupiny (Pac) z postranního řetězce lysinu analogů

Analogy insulínu s plnou délkou řetězce obsahovaly v poloze B29 nebo B28 Pac skupinu chránící  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu. K odštěpení byl použit enzym penicillin G acyláza. Průběh reakce byl sledován na analytické RP-HPLC a zastaven po kvantitativní přeměně chráněného analogu na nechráněný produkt. Produkt byl purifikován pomocí RP-HPLC, čistota a pravost produktu byly ověřeny s pomocí hmotnostní spektroskopie (MALDI-TOF). Doby reakcí u jednotlivých analogů, výtěžky a molekulové hmotnosti jsou uvedeny v Tabulce 4. Příklad přečištění konečného produktu je znázorněn na Obrázku 16.

Tabulka 4. Doby trvání a výtěžky reakcí pro odštěpení Pac chránící skupiny z  $\epsilon$ -aminoskupiny Lys<sup>B29</sup> analogů. Teoretické a experimentální relativní molekulové hmotnosti (monoizotopické) analogů.

| insulinový analog  | doba reakce<br>[hod] | výtěžek<br>[%] | $[\text{MH}^+]_{\text{teor}}$ | $[\text{MH}^+]_{\text{exp}}$ |
|--|----------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|
| [His <sup>B26</sup> ]-insulin  | 23                   | 39             | 5777,63                       | 5777,74                      |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-insulin   | 20                   | 53             | 5791,65                       | 5791,62                      |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-insulin   | 24                   | 46             | 5725,62                       | 5725,70                      |
| [Tyr <sup>B25</sup> ,NMePhe <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B28</sup> ,Pro <sup>B29</sup> ]-<br>insulin | 22                   | 60             | 5818,64                       | 5818,80                      |



Obrázek 16. Chromatografické dělení reakční směsi po odštěpení Pac chránící skupiny z  $\epsilon$ -aminoskupiny Lys<sup>B29</sup>. Vrchol 1-konečný produkt [His<sup>B26</sup>]-insulin.

## 4.5. Testování vazebné afinity insulinových analogů *in vitro*

### 4.5.1. Izolace a zpracování potkaních tukových buněk

Pro získání membrán tukových buněk bylo použito 30 potkanů. Po zpracování tkáně byla, podle metody Bradfordové [88], určena výsledná koncentrace membránových bílkovin v roztoku na 5,3  $\mu\text{g}$  v 1  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$  v 9,4  $\mu\text{l}$ ). Celkem bylo k dispozici 4800  $\mu\text{l}$  roztoku, který byl zředěn 8000  $\mu\text{l}$  izolačního pufru na výslednou koncentraci 50  $\mu\text{g}$  proteinů ve 25  $\mu\text{l}$  roztoku membrán. Konečný objem byl rozdělen do mikroskopických vavek po 550  $\mu\text{l}$  a uchováván do doby testování při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 4.5.2. Vazebné studie

Výsledky testů vazebných afinit insulinových analogů vůči insulinovému receptoru v adipocytárních membránách byly při zpracování porovnávány s hodnotami získanými pro lidský insulin. Každý analog byl měřen minimálně třikrát v duplikátech. V počítačovém programu Graph-Pad Prism 3 byly vytvořeny grafy, odvozeny hodnoty  $\text{IC}_{50}$ , vypočítány směrodatné odchylky a vazebné afinity analogů k insulinovému receptoru v porovnání s lidským insulinem. Výše zmíněné parametry jsou zaznamenány v Tabulkách 5 a 6.

Tabulka 5. Výsledky *in vitro* testování vazebné afinity insulinových analogů vůči receptoru insulinu v membránách potkaních adipocytů za pomoci radioaktivně značeného lidského insulinu. HI–lidský insulin, PI–vepřový insulin, SEM–směrodatná odchylka.

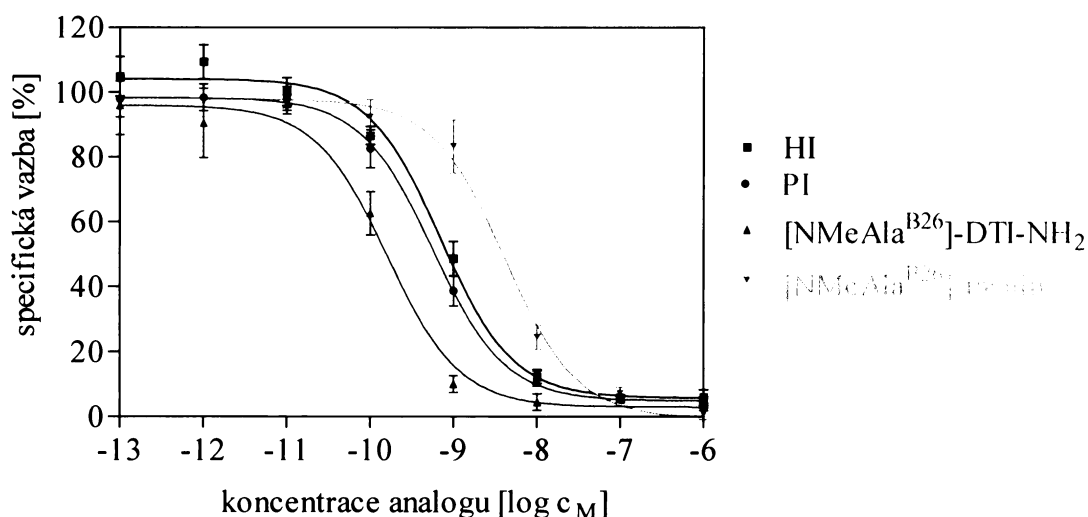
| insulinový analog  | IC <sub>50</sub> ± SEM<br>[nM] | afinita<br>[%] | počet<br>měření |
|--|--------------------------------|----------------|-----------------|
| HI   | 0,7000 ± 0,191                 | 100            | 5               |
| PI   | 0,5580 ± 0,124                 | 125            | 3               |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>   | 0,1604 ± 0,036                 | 436            | 5               |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>   | 0,3695 ± 0,055                 | 189            | 4               |
| [His <sup>B26</sup> ]-insulin  | 0,9004 ± 0,206                 | 77,7           | 4               |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-insulin   | 4,1330 ± 0,548                 | 16,9           | 4               |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-insulin   | 7,8620 ± 0,858                 | 11,23          | 3               |
| [Tyr <sup>B25</sup> ,NMePhe <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B28</sup> ,Pro <sup>B29</sup> ]-insulin | 17,360 ± 3,123                 | 4,03           | 3               |

Tabulka 6. Výsledky *in vitro* testování vazebné afinity insulinových analogů vůči receptoru insulinu v membránách potkaních adipocytů za pomoci radioaktivně značeného vepřového insulinu. HI–lidský insulin, PI–vepřový insulin, SEM–směrodatná odchylka.

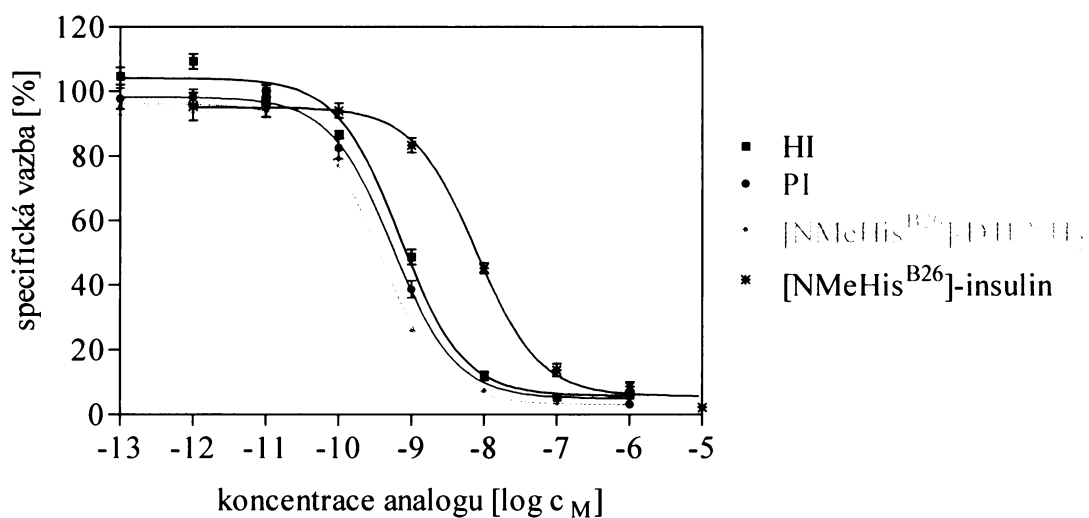
| insulinový analog  | IC <sub>50</sub> ± SEM<br>[nM] | afinita<br>[%] | počet<br>měření |
|--|--------------------------------|----------------|-----------------|
| HI   | 0,9247 ± 0,151                 | 100            | 3               |
| PI   | 0,7262 ± 0,127                 | 127            | 2               |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>   | 0,2874 ± 0,026                 | 322            | 3               |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-DTI-NH <sub>2</sub>   | 0,5274 ± 0,013                 | 175            | 3               |
| [His <sup>B26</sup> ]-insulin  | 2,1710 ± 0,367                 | 42,6           | 3               |
| [NMeAla <sup>B26</sup> ]-insulin   | 4,0100 ± 0,432                 | 23,06          | 3               |
| [NMeHis <sup>B26</sup> ]-insulin   | 12,700 ± 1,859                 | 7,28           | 3               |
| [Tyr <sup>B25</sup> ,NMePhe <sup>B26</sup> ,Lys <sup>B28</sup> ,Pro <sup>B29</sup> ]-insulin | n.d.                           | n.d.           | 0               |

Hodnoty zaznamenané v tabulkách ukazují, že vazebná afinita vepřového insulínu k insulinovému receptoru je mírně vyšší než vazebná afinita lidského insulínu. Důsledkem toho jsou hodnoty  $IC_{50}$  insulinových analogů testovaných za pomoci radioaktivně značeného vepřového insulínu zvýšené v porovnání s hodnotami stanovenými s pomocí radioaktivně značeného lidského insulínu (výjimku tvoří jen analog  $[NMeAla^{B26}]$ -insulin). Vazebné afinity insulinových analogů  $[His^{B26}]$ -insulínu a  $[NMeHis^{B26}]$ -insulínu byly, oproti dříve testovaným zkráceným analogům  $[NMeHis^{B26}]$ -DTI-NH<sub>2</sub> a  $[His^{B26}]$ -DTI-NH<sub>2</sub>, které dosahovaly 5250% a 529% v porovnání s lidským insulínem [77], nadměrně sniženy. Z tohoto důvodu byl opětovně připraven a testován zkrácený analog  $[NMeHis^{B26}]$ -DTI-NH<sub>2</sub>. Výsledky ukázaly, že vazebná afinita k insulinovému receptoru činí 189% při testování s radioaktivně značeným lidským insulínem a 175% při testování s radioaktivně značeným vepřovým insulínem. Nejsilnější analog testované řady je  $[NMeAla^{B26}]$ -DTI-NH<sub>2</sub>, jehož vazebná afinita je 436% při testování s radioaktivně značeným lidským insulínem a 322% při testování s radioaktivně značeným vepřovým insulínem. Nezkřácené insulinové analogy  $[NMeAla^{B26}]$ -insulin a  $[NMeHis^{B26}]$ -insulin prokázaly značně sníženou vazebnou afinitu k insulinovému receptoru oproti lidskému insulínu. Nemetylovaný nezkřácený analog  $[His^{B26}]$ -insulin projevil, v porovnání s lidským insulínem, mírně sníženou schopnost vazby k receptoru.

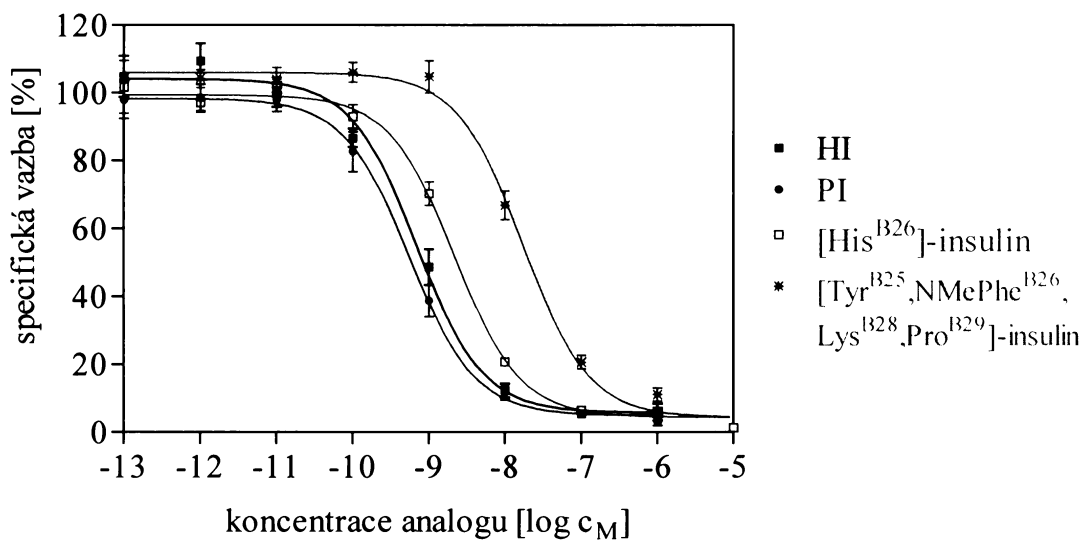
Vazebné křivky insulinových analogů jsou znázorněny na Obrázcích 18-22.



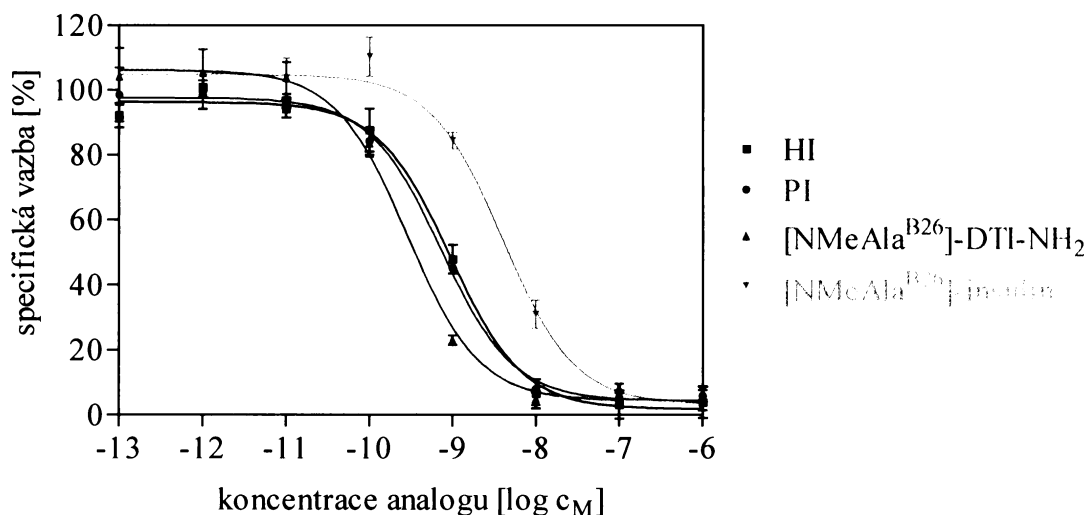
Obrázek 18. Vazebné křivky analogů  $[NMeAla^{B26}]$ -DTI-NH<sub>2</sub> a  $[NMeAla^{B26}]$ -insulínu v porovnání s lidským a vepřovým insulínem. Testováno s použitím radioaktivně značeného lidského insulínu.



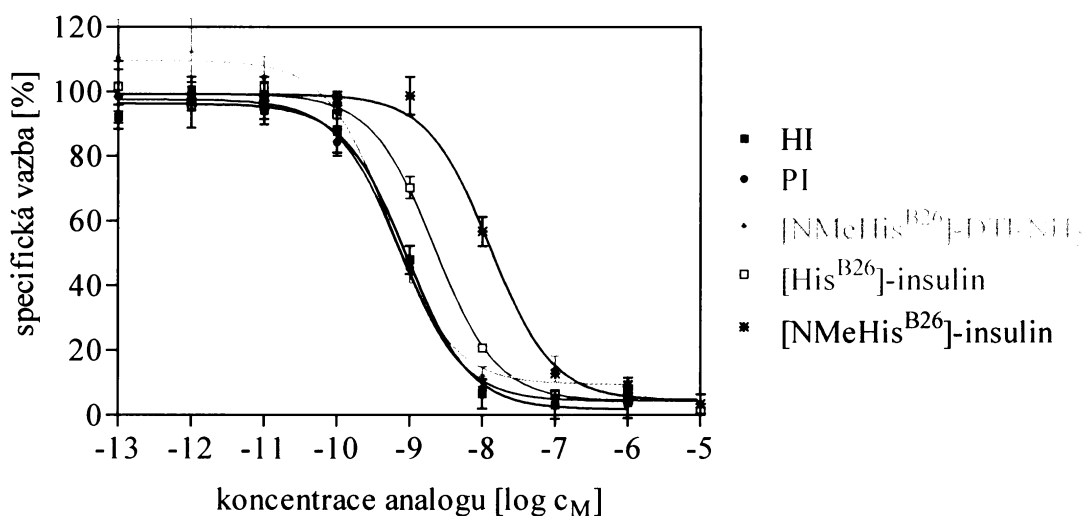
Obrázek 19. Vazebné křivky analogů [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Testováno s použitím radioaktivně značeného lidského insulinu.



Obrázek 20. Vazebné křivky analogů [His<sup>B26</sup>]-insulinu a [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Testováno s použitím radioaktivně značeného lidského insulinu.



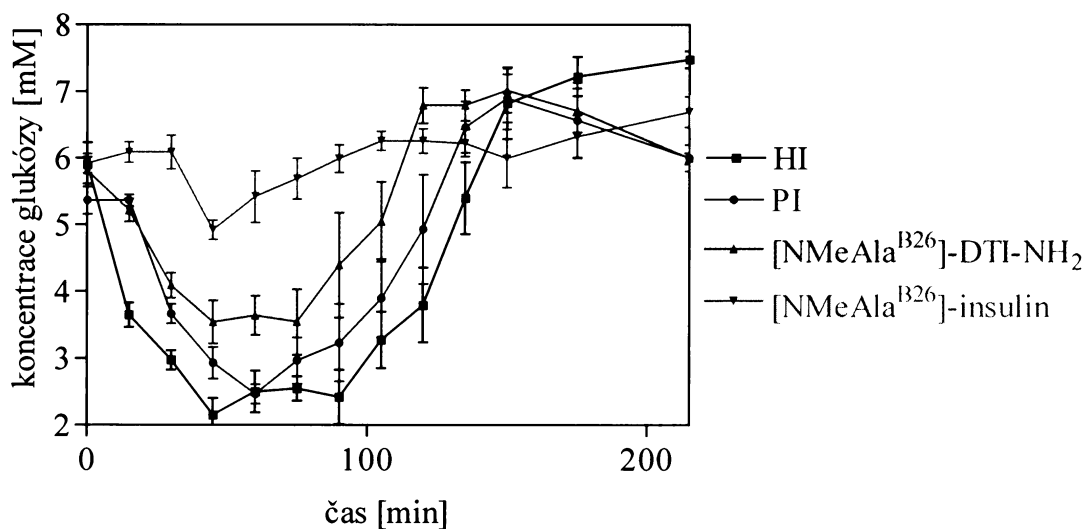
Obrázek 21. Vazebné křivky analogů [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeAla<sup>B26</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Testováno s použitím radioaktivně značeného vepřového insulinu.



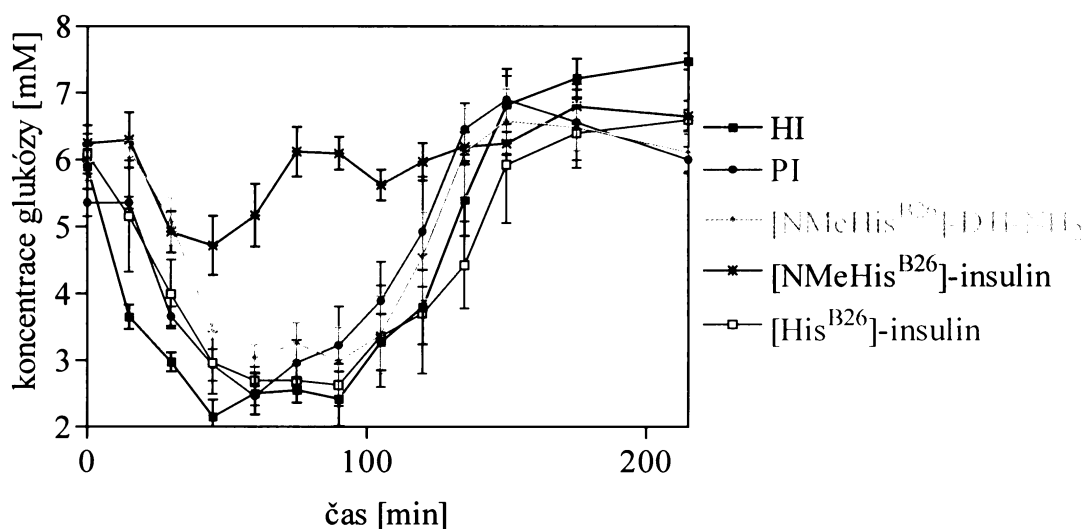
Obrázek 22. Vazebné křivky analogů [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu a [His<sup>B26</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Testováno s použitím radioaktivně značeného vepřového insulinu.

#### 4.6. Testování insulinových analogů *in vivo*

Při těchto pokusech byla zjišťována schopnost insulinových analogů snižovat hladinu krevní glukózy u potkanů. Zvířatům byl injektován roztok analogu a v patnáctiminutových intervalech byla měřena hladina glukózy v krvi. Každý insulinový analog byl proměřen alespoň třikrát (analog [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulin nebyl testován). Výsledky byly zpracovány v počítačovém programu Graph-Pad Prizm 3. Křivky zaznamenávající změnu koncentrace glukózy jsou zobrazeny na Obrázcích 23 a 24.



Obrázek 23. Křivky zobrazující hladinu krevní glukózy po podání insulinových analogů [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeAla<sup>B26</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Hodnoty jsou zobrazeny s  $\pm$  SEM.



Obrázek 24. Křivky zobrazující hladinu krevní glukózy po podání insulinových analogů [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu a [His<sup>B26</sup>]-insulinu v porovnání s lidským a vepřovým insulinem. Hodnoty jsou zobrazeny s ± SEM.

Po porovnání křivek dosažených vlivem jednotlivých insulinových analogů byla navržena řada přibližně znázorňující vzájemný poměr účinností analogů při snižování koncentrace krevní glukózy.

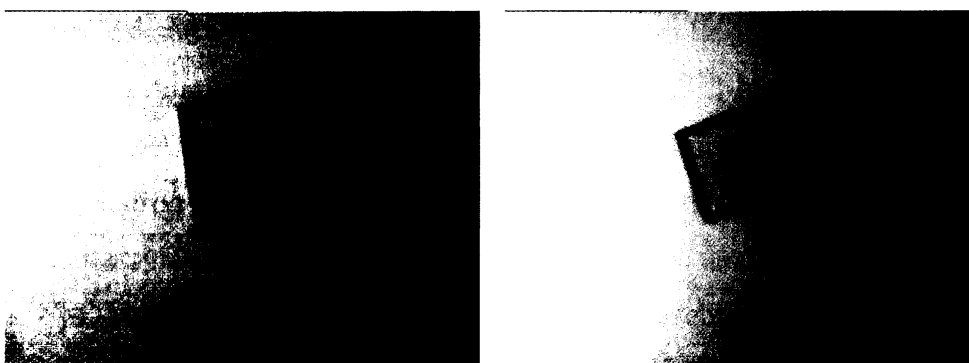
$$\text{HI} \geq [\text{His}^{\text{B26}}]\text{-insulin} \geq \text{PI} > [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 > [\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 > [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-insulin} \cong [\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-insulin}$$

Křivky ukazují, že nejúčinnější ve snižování koncentrace krevní glukózy je lidský insulin. Ačkoliv se vepřový insulin projevil ve vazbě mírně silnější než lidský insulin, jeho účinnost na snižování hladiny krevní glukózy je mírně nižší. Stejný závěr platí pro analogy [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, jejichž afinity k insulinovému receptoru jsou nejvyšší z testované skupiny insulinových analogů. [His<sup>B26</sup>]-insulin projevil překvapivě dobrou schopnost ve snižování krevní glukózy, ačkoliv je jeho vazebná afinita oproti lidskému insulinu snížena. Vliv nezkrácených methylovaných analogů [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu a [NMeAla<sup>B26</sup>]-insulinu na koncentraci krevní glukózy je minimální. Obecně by se dalo říci, že His či NMeHis v poloze B26 je účinnější než NMeAla.

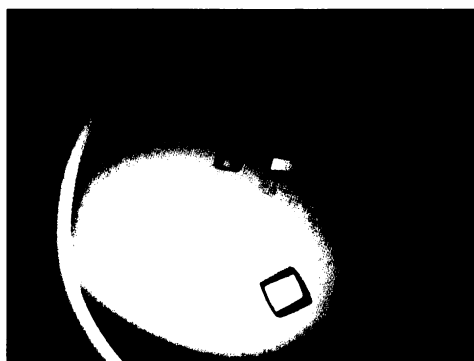


#### 4.7. Krystalografické studie analogů insulínu

Insulinové analogy [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulin a [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> byly úspěšně krystalizovány metodou visící kapky s použitím mateřských roztoků uvedených v odstavci 3.9. (Obrázky 25, 26, 27). Krystaly se podařilo zmrazit v kapalném dusíku a byly proměřeny rentgenovou difrakcí. 3D-struktura je předmětem řešení na pracovišti Dr. A. Marka Brzozowského v laboratoři Strukturní biologie na Univerzitě v Yorku (Velká Británie).



Obrázky 25, 26. Krystaly insulinového analogu [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu v mateřském roztoku.



Obrázek 27. Krystaly insulinového analogu [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> v mateřském roztoku.

## 5. DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo připravit a charakterizovat celkem 5 insulinových analogů, které by mohly přispět k objasnění významu polohy B26 a C-konce B-řetězce insulinu pro vazbu k insulinovému receptoru a pro schopnost snižovat koncentraci glukózy v krvi.

Výsledky vazebných studií insulinových analogů provedené s radioaktivně značeným lidským insulinem od firmy Amersham a s radioaktivně značeným vepřovým insulinem od firmy NEN byly srovnatelné. Z tohoto důvodu jsou v diskuzi zmiňovány pouze hodnoty získané testováním s radioaktivně značeným lidským insulinem.

Význam přípravy a charakterizace analogů [His<sup>B26</sup>]-insulinu a [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu spočíval ve zjištění vlivu plné délky řetězce na afinitu k insulinovému receptoru ve srovnání s již dříve připravenými a charakterizovanými zkrácenými analogy s amidací C-koncové karboxylové skupiny v poloze B26. Jednalo se o analogy [His<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, které vykazovaly velmi silnou vazebnou afinitu k insulinovému receptoru, konkrétně 529% a 5250% v porovnání s lidským insulinem [77]. Při testování síly vazby k receptoru bylo zjištěno, že nezkrácené analogy [His<sup>B26</sup>]-insulin a [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulin vykazují 77,7% a 11,23% vazebné afinity lidského insulinu. Zásadní snížení vazebné afinity obou nezkrácených analogů vzhledem k jejich zkráceným protějškům nás vedlo k opětovné syntéze insulinového analogu [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a k opakování vazebných pokusů s insulinovým receptorem v membránách potkaních adipocytů. Nové testování prokázalo, že vazebná afinita tohoto analogu je pouze 189%. Po důkladném prozkoumání všech okolností bylo zjištěno, že příčina rozdílných vazebných afinit [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> spočívá s velkou pravděpodobností v jakosti použitého radioaktivně značeného insulinu. Vysokých vazebných afinit bylo v minulosti dosaženo za použití nekomerčního vepřového <sup>125</sup>I-monoiodo-Tyr<sup>A14</sup>-insulinu dodávaného spolupracující zahraniční laboratoří. Tento značený insulin totiž nebyl purifikován za pomoci RP-HPLC a podle našich současných analýz obsahoval významné procento neznačeného vepřového insulinu, který spolu s testovaným analogem působil jako kompetitor vůči značenému insulinu. Afinity testovaného analogu byly tudíž posunuty k vysokým hodnotám.

Výsledky testování nezkráceného analogu [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu vzhledem k [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> ukazují negativní působení C-konce B-řetězce na jinak pozitivní

účinek modifikace v poloze B26 na vazebnou afinitu. Vliv C-konce B-řetězce v nezkráceném insulinovém analogu [His<sup>B26</sup>]-insulinu pravděpodobně není tak velký, neboť analog nevykazuje prudké snížení afinity k insulinovému receptoru. Možnou příčinou je, že N-methylace dusíku peptidové vazby B25-B26 vede ke konformačním změnám C-konce B-řetězce (aminokyseliny B26-B30), což negativně ovlivňuje vazbu na receptor. Pokud není peptidová vazba B25-B26 methylována, k výrazné konformační změně nedochází a na afinitu k receptoru působí pouze záměna aminokyseliny, což se, např. u [His<sup>B26</sup>]-insulinu, projevuje menším snížením vazebné afinity vůči lidskému insulinu než [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulinu. Zvýšená vazebná afinita [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (189%) může mít pravděpodobně i jinou příčinu než pouze konformační změnu (ohyb) peptidového řetězce. V úvahu přichází ztráta vodíkové vazby NH-skupiny, sterický vliv CH<sub>3</sub> skupiny či jiná orientace postranního řetězce aminokyseliny v poloze B26.

DTI-NH<sub>2</sub> analogy mají tendenci ke zvýšené vazebné afinitě. Příkladem jsou analogy [D-Ala<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (1252%) [58], [Sar<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (1100%) [57], [Ala<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (273 %) [57], [D-Tyr<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (203 %) [58] či DTI-NH<sub>2</sub> (110 %) [60], přičemž je patrný výrazně pozitivní vliv aminokyseliny s malým postranním řetězcem, D-aminokyseliny či N-methylované aminokyseliny. Z tohoto důvodu jsme mimo [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> připravili a testovali zkrácený insulinový analog [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a nezkrácený [NMeAla<sup>B26</sup>]-insulin. Analog [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> v naší studii vykazuje 436% vazebné afinity v porovnání s lidským insulinem a váže se silněji než podobný analog bez methylace, [Ala<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (273 %) [57]. Domníváme se, že N-methylace vazby B26-B27 tudíž může vést ke konformační změně, předpokládáme že k ohybu, která nasměruje postranní řetězec Ala do pozice výhodné pro kontakt s receptorem. Zdá se, že aminokyseliny s malým či žádným postranním řetězcem jako Ala či Gly jsou, u zkrácených analogů, výhodnější než His či Tyr. Tato hypotéza je v současnosti ověřována ve spolupracující laboratoři Dr. A. M. Brzozowského (University of York) neboť se podařilo připravit difraktující krystaly [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> (tato práce, kapitola 4.7.). V případě nezkrácených a v poloze B26 N-methylovaných analogů se aminokyseliny B26-B30 dostávají ohybem do jiné interakce s receptorem než v případě lidského insulinu. Navíc je, v této pozici, znemožněna tvorba peptidové vazby a methylová skupina se může dostat do nevýhodné konformace. [NMeAla<sup>B26</sup>]-insulin totiž opět, jako [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulin, dosahuje nižších vazebných afinit než lidský insulin a to 16,9%.

Insulinový analog [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulin, jenž měl pomoci k vyjasnění strukturně-aktivitních podobností a rozdílů mezi insulinem a IGF 1, obsahoval více modifikací. Dříve připravený insulinový analog [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>]-insulin, jehož vazebná afinita byla stanovena na 25% v porovnání s lidským insulinem [78] potvrdil důležitost Phe v poloze B25. Další modifikace v polohách B28 a B29 vedly k většímu snížení afinity [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu k insulinovému receptoru, a to na 4,2%. Záměrem modifikace bylo vytvořit strukturní ohyb C-konce B-řetězce, a tím připodobnit tuto část molekuly insulinu struktuře molekule IGF 1. Tato hypotéza je v současnosti ověřována ve spolupracující laboratoři Dr. A. M. Brzozowského v Yorku, neboť se podařilo připravit difrakující krystaly [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu.

Porovnáním výsledků *in vivo* testů byla navržena velmi přibližná řada, která znázorňuje poměr účinností analogů při snižování koncentrace krevní glukózy. V potaz bylo bráno maximální snížení koncentrace glukózy jednotlivými insulinovými analogy, doba nástupu efektu a také doba trvání účinku:

#### *In vivo biologická aktivita*

$$HI \geq [\text{His}^{\text{B26}}]\text{-insulin} \geq \text{PI} > [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 > [\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 > [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-insulin} \cong [\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-insulin}$$

Zajímalo nás, zda bude výše uvedená řada v souladu s výsledky *in vitro* testování vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v membránách potkaních adipocytů. Z tohoto důvodu byla obdobná řada sestavena i pro vazebnou afinitu analogů:

#### *In vitro vazebná afinita*

$$[\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 \gg [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-DTI-NH}_2 > \text{PI} \geq \text{HI} > [\text{His}^{\text{B26}}]\text{-insulin} \gg [\text{NMeAla}^{\text{B26}}]\text{-insulin} > [\text{NMeHis}^{\text{B26}}]\text{-insulin}$$

Porovnáním *in vitro* a *in vivo* aktivit analogů bylo zjištěno, že vazebná afinita analogů zcela nesouvisí s jejich účinností při snižování koncentrace krevní glukózy. Analogy s nejvyšší vazebnou afinitou, [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>, nevykazují nejvyšší účinnost *in vivo*. Tento výsledek jasně poukazuje na důležitost

aminokyselin B27-B30 pro biologickou aktivitu, ale ne již zcela nutně pro vazebnou afinitu. Jinými slovy to znamená, že velmi silná vazebná afinita analogu ještě nemusí způsobit efektivní funkci receptoru, tzn. indukci jeho předpokládané konformační změny a tím aktivaci tyrosinkinázy a celé vnitrobuněčné kaskády vedoucí k transportu glukózy do buňky. Na druhou stranu ovšem záleží i na substituci v poloze B26. Z výsledků plyne, že NMeHis je v poloze B26 výhodnější pro *in vivo* biologickou aktivitu, zatímco NMeAla je jasně výhodnější pro vazebnou afinitu. Tuto tendenci lze pozorovat nejen u zkrácených analogů, ale i u málo aktivních nezkrácených analogů.

Další analog [His<sup>B26</sup>]-insulin vykazuje vazebnou afinitu jen o málo nižší než lidský či vepřový insulin a *in vivo* biologickou aktivitu naprosto srovnatelnou s lidským či vepřovým insulinem. V obou těchto parametrech je [His<sup>B26</sup>]-insulin výrazně silnější než [NMeHis<sup>B26</sup>]-insulin. Příčina jasně spočívá v N-methylaci vazby B25-B26 druhého analogu. Domníváme se, jak již bylo diskutováno výše, že N-methylace vazby B25-B26 způsobuje konformační změnu v oblasti B27-B30 a tím její interakci s receptorem, interakci nevýhodnou jak pro afinitu vazby tak pro iniciaci biologické aktivity. U analogů zkrácených o aminokyseliny B27-B30 a zároveň s amidací v poloze B26 se tato konformační změna ovšem týká jen aminokyseliny B26 a má spíše pozitivní efekt na vazebnou afinitu, přičemž biologická aktivita je redukována. Jak již bylo konstatováno dříve, předpokládanou konformační změnu v C-konci B-řetězce způsobenou N-methylací peptidové vazby v poloze B25-B26 je nutno ověřit na základě krystalové struktury analogů.

Pokusíme-li se shrnout dosažené výsledky, můžeme konstatovat, že aminokyseliny B27-B30 nejsou nezbytně nutné pro zachování silné vazby analogů k insulinovému receptoru, ale jsou důležité pro vyvolání plnohodnotné *in vivo* biologické aktivity, v našem případě vlivu analogů na pokles hladiny krevní glukózy u potkanů *in vivo*. Záleží nicméně i na substituci či N-methylaci v poloze B26. NMeAla v pozici B26 je výhodnější pro vazebnou afinitu než NMeHis či His. Pro *in vivo* biologickou aktivitu je naopak výhodnější His či NMeHis než NMeAla. Domníváme se, že N-methylace v poloze B26 může způsobit ohyb aminokyselin B27-B30, což je staví do polohy nevýhodné pro vazebnou afinitu i biologickou *in vivo* aktivitu.

## 6. ZÁVĚR

V této studii se nám podařilo objasnit příčinu nesrovnalostí ve vazebné afinitě analogu [NMeHis<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub>.

Za pomoci série zkrácených a nezkrácených analogů insulinu s modifikacemi v poloze B26 se nám podařilo poukázat na důležitost aminokyselin B26-B30 pro vazebnou a zejména biologickou aktivitu insulinu *in vivo*.

Podařilo se připravit difraktující krystaly analogů [NMeAla<sup>B26</sup>]-DTI-NH<sub>2</sub> a [Tyr<sup>B25</sup>,NMePhe<sup>B26</sup>,Lys<sup>B28</sup>,Pro<sup>B29</sup>]-insulinu. Doufáme, že vyřešení jejich krystalové struktury potvrdí předpokládanou existenci ohybu B-řetězce v poloze B25-B26.

Část výsledků obsažených v této diplomové práci bude publikována v časopise *Journal of Peptide Science* (Lenka Žáková, Daniel Zyka, Jan Ježek, Ivona Hančlová, Miloslav Šanda, Andrzej M. Brzozowski a Jiří Jiráček: „The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs“). Manuskript je přiložen. Hlavní část výsledků bude součástí dalších dvou publikací, které jsou v přípravě.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Rosenfeld, L.: Insulin: Discovery and Controversy. *Clinical Chemistry* 2002, **48**, 2270-2288.
2. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R.: The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J.* 1955, **60**, 541-556.
3. Zahn, H.: My journey from wool research to insulin. *J. Pept. Sci.* 2000, **6**, 1-10.
4. Katsoyannis, P. G.: Synthetic insulins. *Recent Prog. Horm. Res.* 1967, **23**, 505-563.
5. Du, Y. C., Zhang, Y. S., Lu, Z. X., Tsou, C. L.: Resynthesis of insulin from its glycyl and phenylalanyl chains. *Sci. Sin.* 1961, **10**, 84-104.
6. Abel, J. J.: Crystalline insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1926, **12**, 132-135.
7. Crowfoot, D. M.: X-ray single-crystal photography of insulin. *Nature* 1935, **135**, 591-592.
8. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., Sheat, S: Structure of rhombohedral 2Zn insulin crystals. *Nature* 1969, **224**, 491-495.
9. Blundell, T.L., Dodson, G.G., Hodgkin, D.C., Mercola, D.A.: Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv. Protein Chem.* 1972, **26**, 279-402.
10. Peking Insulin Structure Group: Insulin's crystal structure at 2,5 Å resolution. *Peking Rev.* 1971, **40**, 11-16.
11. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A. D.: Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, **76**, 106-110.
12. Brandenburg, D.: Insulin-structure, function, design. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1998, **107** (Suppl 2), S6-S12.
13. Baker, E., Blundell, T., Cutfield, J., Cutfield, S., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin D. C., Hubbard, R., Isaacs, N., Reynolds, C., Sakabe, K., Sakabe, N., Vijayan, M.: The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1,5Å resolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1988, **319**, 369-456.
14. Kaarsholm, N. C., Ko, H. C., Dunn, M. F.: Comparison of solution structural flexibility and zinc-binding domains for insulin, proinsulin, and miniproinsulin. *Biochemistry* 1989, **28**, 4427-4435.

15. De Meyts, P.: Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays* 2004, **26**, 1351-1362.
16. Bentley, G. A., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. C., Mercola, D.A.: The structure of insulin in 4Zn insulin. *Nature* 1976, **261**, 166-168.
17. Wan, Z. L., Xu, B., Chu, Y. C., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A.: Crystal structure of allo-Ile(A2)-insulin, an inactive chiral analogue: Implications for the mechanism of receptor binding. *Biochemistry* 2003, **42**, 12770-12783.
18. Petruzzelli, L. M., Ganguly, S., Smith, C. J., Cobb, M. H., Rubin, C. S., Rosen, O. M.: Insulin activates a tyrosine specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982, **79**, 6792-6796.
19. Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J., Masiarz, Kan, Y. W., Goldfine, I. D., Roth, R. A., Rutter, W. J.: The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1985, **40**, 747-758.
20. De Meyts, P., Whittaker, J.: Structural biology of insulin and IGF 1 receptors: Implication for drug design. *Nature Reviews* 2002, **1**, 769-783.
21. Seino, S., Seino, M., Nishi, S., Bell, G. I.: Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989, **86**, 114-118.
22. Seino, S., Bell, G. I.: Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989, **159**, 312-316.
23. Bass, J., Chiu, G., Argon, Y., Steiner, D. F.: Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J. Cell Biol.* 1998, **141**, 637-646.
24. Bajaj, M., Waterfield, M. D., Schlessinger, J., Taylor, W. R., Blundell, T. L.: On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, **916**, 220-226.
25. Garrett, T. P, McKern, N., Meizhen, L., Frenkel, M. J., Bentley, G. D., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Cosgrove, L. J., Ward, C. W.: Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin like growth factor receptor. *Nature* 1998, **394**, 395-399.
26. Ward, C. W.: Members of the insulin receptor family contain three fibronectin type III domains. *Growth Factors* 1999, **16**, 315-322.
27. Marino-Buslje, C., Mizuguchi, K., Siddle, K., Blundell, T. L.: A third fibronectin type III domain in the extracellular region of the insulin receptor family. *FEBS Lett.* 1998, **441**, 331-336.



28. Schäffer, L., Ljungquist, L.: Identification of a disulfide bridge connecting alpha subunits of the extracellular domain of the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992, **189**, 650-653.
29. Sparrow, L., McKern, N., Gorman, J., Strike, M., Robinson, CH., Bentley, J., Ward, C.: The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 29460-29467.
30. Hubbard, S. R., Till, J. H.: Protein tyrosine kinase structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 2000, **69**, 373-398.
31. McKern, N., Lawrence, M., Streltsov, V., Lou, M.-Z., Adams, T., Lovrecz, G., Ellman, T., Richards, K., Bentley, J., Pilling, P., Hoyne, P., Cartledge, K., Pham, T., Lewis, J., Sankovich, S., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, CH., Frenkel, M., Sparrow, L., Fernley, R., Epa, V. CH., Ward, C.: Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 2006, **443**, 218-221.
32. Pullen, R. A., Lindsay, D. G., Wood, S. P., Tickle, I. J., Blundell, T. L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J., Gammeltoft, S.: Receptor binding region of insulin. *Nature* 1976, **259**, 369-373.
33. Mirmara, R. G., Tager, H. S.: Role of the phenylalanine B24 side chain in directing insulin interaction with its receptor. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 6349-6354.
34. Nakagawa, S. H., Tager, H. S.: Role of the phenylalanine B25 side chain in directing insulin interaction with its receptor. *J. Biol. Chem.* 1986, **261**, 7332-7341.
35. Nakagawa, S. H., Tager, H. S.: Role of the COOH-terminal B-chain domain in insulin-receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 1987, **262**, 12054-12058.
36. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Bing, X., Markussen, J.: X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J. Mol. Bio.* 1991, **220**, 425-433.
37. De Meyts, P.: The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signaling. *Diabetologia* 1994, **37** (Suppl. 2), 135-148.
38. Jensen, A.-M.: Analysis of structure-activity relationship of the insulin molecule by alanine-scanning mutagenesis (diplomová práce, 2000) v De Meyts, P.: Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays* 2004, **26**, 1351-1362.
39. Williams, P. F., Mynarcik, D. C., Qin, Y. G., Whittaker, J.: Mapping of an NH<sub>2</sub>-terminal binding site of the insulin receptor by alanine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 3012-3016.
40. De Meyts, P., Gu, J. L., Shybko, R. M., Kaplan, B. E., Bell, G. I., Whittaker, J.: Identification of a ligand binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. *Mol. Endocrinol.* 1990, **4**, 409-416.

41. Lou, M., Garret, T., McKern, M., Hoyne, P., Epa., V. CH., Bentley, J., Lovretz, G., Cosgrove, L., Frenkel, M., Ward, C.: The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor1 receptor in the regions governing ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, **103**, 12429-12434.
42. Mynarcik, D. C., Yu, G. Q., Whittaker, J.: Alanine-scanning mutagenesis of a C-terminal ligand binding domain of the insulin receptor  $\alpha$  subunit. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 2439-2442.
43. Zhang, B., Roth, R. A.: A region of the insulin receptor important for ligand binding (residues 450–601) is recognized by patient autoimmune antibodies and inhibitory monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, **88**, 9858-9862.
44. Schäffer, L.: A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur. J. Biochem.* 1994, **221**, 1127-1132.
45. Sweet, L. J., Morrison, B. D., Pessin, J.: Isolation of functional  $\alpha$ - $\beta$  heterodimers from the purified human placental  $\alpha$ 2– $\beta$ 2 heterotetrameric insulin receptor concept. Structural basis for high affinity ligand binding. *J. Biol. Chem.* 1987, **262**, 6939-6942.
46. Markussen, J. M., Halstrom, J., Wiberg, F., Schäffer, L.: Immobilized insulin for high capacity affinity chromatography of insulin receptors. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 18814-18818.
47. De Meyts, P., Van Obberghen, E., Roth, J., Wollmer, A., Brandenburg, D.: Mapping of the residues responsible for the negative cooperativity of the receptor-binding region of insulin. *Nature* 1978, **273**, 504-509.
48. Žáková, L., Jiráček, J.: Biosyntéza, sekrece a degradace insulinu. *Chem. Listy* 2005, **99**, 772-781.
49. Ottensmeyer, F. P., Beniac, D. R., Luo, R. Z., Yip, C. C.: Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 2000, **39**, 12103-12112.
50. Kido, Y., Nakae, J., Accili, D.: The insulin receptor and its cellular targets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, **86**, 972-979.
51. Björnholm, M., Zierath, J. R.: Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in type II diabetes. *Biochemical Society Transactions* 2005, **33**, 354-357.
52. Voet, D., Voet, J.: Biochemistry (3rd edition, 2004). Kapitola 20.2. Kinetics and mechanism of transport. Wiley, USA, ISBN 0-471-19 350-x, 727-738.

53. Shoelson, S., Haneda, M., Blix, P., Nanjo, A., Sanke, T., Inouye, K., Steiner, D., Rubenstein, A.H., Tager, H.: Three mutant insulins in man. *Nature* 1983, **302**, 540-543.
54. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E.T., Rubenstein, A.H., Tager, H.: Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine-for-phenylalanine substitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983, **80**, 7390-7394.
55. Haneda, M., Chan, S. J., Kwok, S. C., Rubenstein, A. H., Steiner, D. F.: Studies on mutant human insulin genes: identification and sequence analysis of gene encoding [SerB24]-insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983, **80**, 6366-6370.
56. Mirmira, R. G., Nakagawa, S. H., Tager, H. S.: Importance of the character and configuration of residues B24, B25 and B26 in insulin-receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 1428-1436.
57. Leyer, S., Gattner, H. G., Leithäuser, M., Brandenburg, D., Wollmer, A., Höcker, H.: The role of the C-terminus of the insulin B-chain in modulating structural and functional properties of the hormone. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1995, **46**, 397-407.
58. Kurapkat, G., Siedentop, M., Gattner, H.-G., Hagelstein, M., Brandenburg, D., Grötzinger, J., Wollmer, A.: The solution of a superpotent B-chain-shortened single-replacement insulin analogue. *Protein Science* 1999, **8**, 499-508.
59. Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiráček, J., Velek, J., Bláha, I., Ubik, K., Kašička, V., Pospíšek, J., Hrbas, P.: Semisynthetic insulin analogues modified in positions B24, B25 and B29. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1994, **375**, 373-378.
60. Lenz, V., Gattner, H. G., Sievert, D., Wollmer, A., Engels, M., Höcker, H.: Semisynthetic des-(B27-B30)-insulins with modified B26-tyrosine. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1991, **372**, 495-504.
61. Nakagawa, S., Tager, H.: Role of the COOH-terminal domain in insulin-receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 1987, **262**, 12054-12058.
62. Mooradian, A., Bernbaum, M., Albert, S.: Narrative review: A rational approach to starting insulin therapy. *Ann. Intern. Med.* 2006, **145**, 125-134.
63. Sliker, L. J., Sundell, K.: Modifications in the 28-29 position of the insulin B-chain alter binding to the IGF-I receptor with minimal effect on insulin receptor binding. *Diabetes* 1991, **40** (Suppl 1), 168A.
64. Howey, D. C., Bowsher, R. R., Brunelle, R. L., Woodworth, J. R.: [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin: A rapidly absorbed analog of human insulin. *Diabetes* 1994, **43**, 396-402.

65. Torlone, E., Fanelli, C., Rambotti, A. M., Kassi, G., Modarelli, F., Di Vincenzo, A., Epifano, L., Ciofetta, M., Pampanelli, S., Brunetti, P.: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and glucose counterregulation following subcutaneous injection of the monomeric insulin analog [Lys(B28), Pro(B29)] in IDDM. *Diabetologia* 1994, **37**, 713-720.
66. Roach, P., Varshavsky, J. A., Gantner, K., Anderson, J. H.: Insulin antibody formation during treatment with human insulin or insulin Lispro does not affect insulin dose requirements. *Diabetes* 1996, **45** (Suppl 2), 261A.
67. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L.: Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* 1988, **333**, 679-682.
68. Heinemann, L., Weyer, C., Rauhaus, M., Heinrichs, S., Heise, T.: Variability of the metabolic effect of soluble insulin and the rapid-acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care* 1998, **21**, 1910-1914.
69. Drejer, K.: The bioactivity of insulin analogs from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab. Rev.* 1992, **8**, 256-286.
70. Hennige, A. M., Strack, V., Metzinger, E., Seipke, G., Häring, H.-U., Kellerer, M.: Effects of new insulin analogues HMR1964 (insulin glulisine) and HMR1423 on insulin receptors. *Diabetologia* 2005, **48**, 1891-1897.
71. Roskamp, R. H., Park, G.: Long-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 1999, **22** (Suppl 2), B109-B113.
72. Berti, L., Bossenmaier, B., Kellerer M., Seffer, E., Seipke, G., Haring, H.: Comparison of the human insulin analogs HOE 901 and Asp B10 : characteristics of receptor binding, activation and tyrosine phosphorylation of different substrate proteins. *Diabetologia* 1995, **38** (Suppl. 1), A191.
73. Berti, L., Kellerer, M., Bossenmaier, B., Seffer, E., Seipke, G., Haring, H. U.: The long acting human insulin analog HOE 901: characteristics of insulin signalling in comparison to Asp(B10) and regular insulin. *Horm. Metab. Res.* 1998, **30**, 123-129.
74. Bähr, M., Kolter, T., Seipke, G., Eckel, J.: Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analog [GlyA21, ArgB31, ArgB32] insulin (HOE901) in muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, **320**, 259-265.
75. Matthews, D. R., Pfeiffer, C.: A new long acting insulin (HOE901) demonstrates less nocturnal hypoglycemia when compared with protamine insulin in a clinical trial. *Diabetologia* 1998, **41** (Suppl 1), A245.
76. Soran, H., Younis, N.: Insulin detemir: a new basal insulin analogue. *Diabetes Obes. Metab.* 2006, **8**, 26-30.

77. Žáková, L., Barth, T., Barthová, J., Zórad, Š.: Shortened insulin analogues: Marked changes in biological activity resulting from replacement of Tyr<sup>B26</sup> and N-methylation of peptide bonds in the C-terminus of the B-chain. *Biochemistry* 2004, **43**, 2323-2331.
78. Žáková, L., Brynda, J., Au-Alvarez, O., Dodson, E., Dodson, G., Whittingham, J., Brzozowski, A.: Toward the insulin-IGF-I intermediate structures: Functional and structural properties of the [Tyr<sup>B25</sup>NMePhe<sup>B26</sup>]insulin mutant. *Biochemistry* 2004, **43**, 16293-16300.
79. Žáková, L., Zyka, D., Ježek, J., Hančlová, I., Šanda, M., Brzozowski, M., Jiráček, J.: The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J. Pept. Sci.* 2007, **13**, 334-341.
80. Carpenter, F. H.: Partition column chromatography of insulin in 2-butanol-aqueous acid systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, **78**, 539-545.
81. Bromer, W. W., Chance, R. E.: Preparation and characterization of desoctapeptide insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1967, **133**, 219-223.
82. Fields, G. B., Noble, R. L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, **35**, 161-214.
83. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Gillessen, D.: New coupling reagents in peptide chemistry. *Tet. Lett.* 1989, **30**, 1927-1930.
84. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I.: Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 1970, **34**, 595-598.
85. Coste, J., Frerot, E., Jouin, P., Castro, B.: Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-methylated amino-acids. *Tet. Lett.* 1991, **32**, 1967-1970.
86. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G.: 2-Chlorotriylchloride resin-studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, **37**, 513-520.
87. Zórad, S., Golda, V., Fickova, M., Macho, L., Pinterova, L., Jurcovicova, J.: Terguride treatment attenuated prolactin release and enhanced insulin receptor affinity and GLUT 4 content in obese spontaneously hypertensive female, but not male rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, **967**, 490-499.
88. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248-254.

# The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs

LENKA ŽÁKOVÁ,<sup>a</sup> DANIEL ZYKA,<sup>a</sup> JAN JEŽEK,<sup>a</sup> IVONA HANČLOVÁ,<sup>a</sup> MILOSLAV ŠANDA,<sup>a</sup>  
ANDRZEJ M. BRZOWSKI<sup>b</sup> and JIŘÍ JIRÁČEK<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic

<sup>b</sup> York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, University of York, York YO10 5YW, UK

Received 15 November 2006; Revised 30 January 2007; Accepted 31 January 2007

**Abstract:** In this paper, we present the detailed synthetic protocol and characterization of Fmoc-Lys(Pac)-OH, its use for the preparation of octapeptides H-Gly-Phe-Tyr-*N*-MePhe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH and H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr-OH by solid-phase synthesis, trypsin-catalyzed condensation of these octapeptides with desoctapeptide(B23-B30)-insulin, and penicillin G acylase catalyzed cleavage of phenylacetyl (Pac) group from *N*<sup>ε</sup>-amino group of lysine to give novel insulin analogs [TyrB25, *N*-MePheB26, LysB28, ProB29]-insulin and [HisB26]-insulin. These new analogs display 4 and 78% binding affinity respectively to insulin receptor in rat adipose membranes. Copyright © 2007 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** insulin analogs; semisynthesis; phenylacetyl; penicillin G acylase

## INTRODUCTION

Despite that almost all medical applications of insulin are provided by its recombinant production, the synthetic or semisynthetic approach still remains important for the preparation of various insulin analogs. The advantage of chemical synthesis or semisynthesis of insulin analogs results from the possibility of a rapid incorporation of noncoded amino acids into insulin molecules [1–3]. Such nonstandard modifications may provide new insights into research on insulin function–structure relationships. Hence, insulin analogs may provide an excellent tool in the systematic study of insulin–insulin receptor interaction, and in the search for the ‘active conformation’ of insulin upon binding to the receptor [4,5]. Insulin analogs may also become new drugs for the treatment of diabetes or other diseases related to the impaired function of insulin or insulin receptor molecule [6,7].

The total chemical synthesis is the most flexible way for the preparation of insulin analogs [5,8,9], however, its low yield, extensive costs and laborious protocols prohibit its wide use. On the contrary, semisynthesis of this hormone is an elegant and relatively straightforward method. Semisynthesis of insulin analogs uses either the entire or some parts of the insulin molecule for chemical modifications, e.g. natural chain A is combined with a chemically prepared analog of chain B [10].

Enzymatic semisynthesis, one of the most interesting semisynthetic approaches, employs enzymes for cleavage and/or formation of covalent bonds in the insulin molecule and may be combined with the chemical synthesis of different insulin fragments. The disadvantage of the enzymatic semisynthesis is its limitation to changes only in the C-terminus of the B-chain due to restricted specificity of available enzymes, e.g. to ArgB22 and LysB29 sites for trypsin [11], LysB29 for *Achromobacter* protease I [12] and PheB25-TyrB26 site for pepsin [13]. Papain, chymotrypsin, and thermolysin are also used for formation of the peptide bond after cleavage by pepsin [14]. Fortunately, the C-terminus of the B-chain of insulin molecule is one of the most important segments, which is directly involved in the interaction of insulin with its receptor [15] and in the formation of insulin dimers [16]. The C-terminal octapeptide of the B-chain can be cleaved from insulin and attached again to desoctapeptide(B23-B30)insulin (DOI) with the use of trypsin [10,17,18]. This approach offers an extremely large variety of possible modifications that may produce interesting analogs.

Nevertheless, the method of enzymatic semisynthesis of insulin is fraught with several difficulties. One of the main problems is the necessity to protect the amino group of LysB29 upon the trypsin-catalyzed condensation of DOI and C-terminal synthetic peptide to avoid side reactions [19,20]. The major problem is the formation of undesirable condensation products via *N*<sup>ε</sup>-amino group of lysine [21]. If *N*<sup>ε</sup>-amino group of LysB29 is not protected during trypsin-catalyzed semisynthesis it can react with the carboxyl group of ArgB22. The protection of LysB29 is much more important than the protection of PheA1 and GlyB1

\* Correspondence to: Jiří Jiráček, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic; e-mail: jiracek@uochb.cas.cz

because the synthetic peptide is in high molar excess compared to DOI [18]. In the 1970s, the first semisyntheses of insulin were carried out with lysine  $N^\epsilon$ -protected by Boc [10,22–28] or Tfa [29,30] group. Moreover, PheA1 and GlyB1 of DOI were  $N^\alpha$ -protected by Boc groups or by methylsulfonyl ethoxycarbonyl (Msc) groups [31]. Later, the PheA1 and GlyB1 protection turned out to be redundant, because only minor side reactions with the involvement of these residues were observed [18]. The protection of LysB29 by chemically cleavable groups as Boc, Tfa or Msc is not suitable because of the possible damaging effect of cleavage reagents on the insulin structure. Moreover, the instability of Boc in TFA or Tfa/Msc in piperidine complicates, or even disables, the solid-phase synthesis of peptides with such  $N^\epsilon$ -Lys protection. This initiated a search for better protecting groups, which could be removed from the lysine side-chain under mild conditions. The enzymatically removable group seemed to be a method of choice for this purpose.

The enzymes usually operate at wide-ranging pH values and in many cases combine a high selectivity for the catalyzed reaction with a broad substrate tolerance [32,33]. Chymotrypsin and trypsin were first used for deprotection of  $N$ -protected peptides. For instance, the Bz group is removed from Bz-Phe by chymotrypsin [34] and the Z group is removed from Z-Arg by trypsin [35,36]. The disadvantage of using chymotrypsin and trypsin is that these endopeptidases catalyze the hydrolysis of specific peptide bonds, often present in synthesized peptide analogs.

Requirements for an enzymatically cleavable protecting group for primary amines and a 'deprotective' enzyme without peptidase activity are fulfilled by the penicillin G acylase (penicillin amidohydrolase or penicillin amidase, PA) from *Escherichia coli* (E.C.3.5.1.11). This enzyme, widely used in industry for large-scale synthesis of semisynthetic penicillin, attacks phenylacetyl amides and esters but does not hydrolyze peptide bonds [32,33,37]. Moreover, PA works under neutral conditions (pH 7–8), at room temperature (RT) and leaves other groups such as methyl, allyl, benzyl or *tert*-butyl esters unaffected [38–41]. An important condition for application of PA is that the enzyme must not be contaminated by endo- or exopeptidases [42]. Nowadays, PA is commercially available as an immobilized enzyme or as a soluble protein. The advantage of phenylacetyl protection of primary amines results from its relatively easy introduction and high chemical stability [38,39]. The disadvantage, however, is some level of racemization if phenylacetyl is introduced to  $\alpha$ -amino groups of amino acids (about 6%) [38,39], but this problem can be overcome if phenylacetyl moiety is introduced through an enzymatic route [43].

The concept of the use of  $N^\epsilon$ -Pac-protected lysine in the synthesis of peptides was introduced in 1981 by Brtnik *et al.* [37]. They prepared, and successfully used,

Z-Lys(Pac)-OH for the solution synthesis of deamino-lysine vasopressin. The Z group was cleaved by HBr in acetic acid and the final cleavage of the phenylacetyl group was achieved by PA isolated from *E. coli*. The disadvantage of Z-Lys(Pac)-OH is that it is hardly applicable in the solid-phase synthesis due to the necessity of cleavage of the Z group by hydrogenation or by HBr in acetic acid.

The phenylacetyl protection applied in insulin chemistry was first reported by the group of Wang *et al.* [44] in 1986. They examined the nonselective phenylacetyl protection of amines in the insulin molecule and subsequent cleavage by PA without apparent damage of the protein backbone. The authors proposed a phenylacetyl group and PA-deprotection for the semisynthetic preparation of protein and large peptide analogs.

For several years, our research team has been involved in the synthesis of insulin analogs with modification in the C-terminus of the B-chain. We prepared shortened or full-length insulin using the above described enzymatic semisynthesis [45–48]. The analogs of C-terminal octapeptide of the B-chain are synthesized by solid-phase synthesis chemistry using Fmoc-Lys(Pac)-OH if peptides contain lysine. However, the preparation of this amino acid derivative as well as the detailed description of PA-catalyzed cleavage of phenylacetyl from protected insulin analog has not been published as yet.

In this paper, we present the detailed synthetic protocol and characterization of ( $N^\alpha$ -fluorenylmethoxycarbonyl,  $N^\epsilon$ -phenylacetyl)-L-lysine, its use for the preparation of synthetic octapeptides H-Gly-Phe-Tyr-*N*-MePhe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH and H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr-OH by solid-phase synthesis, trypsin-catalyzed condensation of these octapeptides with DOI and penicillin G acylase catalyzed cleavage of phenylacetyl group from  $N^\epsilon$ -amino group of lysine to give novel insulin analogs [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin and [HisB26]-insulin.

## EXPERIMENTAL

### Materials

For abbreviations see Ref [49]. All amino acids used were in their L form. Fmoc-Lys(Boc)-OH was purchased from Bachem. Other Fmoc-protected amino acids, HBTU and 2-chlorotrityl resin were purchased from Novabiochem. *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)-treated bovine trypsin was purchased from Sigma-Aldrich (T-1426 or T-8802) and from Worthington (TRTVMF). PA immobilized on Eupergit C and soluble PA were from *E. coli* and purchased from Fluka (product code 76 429 and 76 427, respectively). All other chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka. Human  $^{125}$ I-monoiodotyrosylA14-insulin was purchased from Amersham.

## Fmoc-Lys(Pac)-OH

Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates and visualized under UV light (254 nm) and/or by heating with phosphomolybdic-acid solution in ethanol. Preparative column chromatography was carried out on Merck silica gel 60. <sup>1</sup>H-NMR spectra were measured on a Bruker Avance 400 spectrometer with TMS as an internal standard. Multiplicities are designated singlet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet (m), or broad singlet (br s). Positive-ion FAB mass spectra were acquired on a ZAB-EQ (VG Analytical, UK) spectrometer. IR spectra (wavenumbers in cm<sup>-1</sup>) were recorded on a Bruker IFS 88 spectrometer. Elemental analyses were determined on a PE 2400 Series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer, USA). Optical rotations were run on an Autopol IV (Rudolph Research Analytical, USA) polarimeter. Melting points were obtained using a Kofler block and are uncorrected. Solvents were evaporated using vacuum rotary evaporator at 30 °C. Analytical samples were dried at 6.5 Pa and 40 °C for 8 h.

**Method A.** H-Lys(Pac)-OH, was prepared in the yield of 64.9% according to the modified procedure of Brtník *et al.* [37], using aqueous EDTA disodium salt instead of hydrogen sulfide for decomposition of the bis[Lys(Pac)]copper(II) complex [50,51]. Fmoc-OSu (5060 mg, 15.0 mmol) and 1 M NaOH (to maintain pH 9.5) were added portion-wise within 30 min to a stirred slurry of H-Lys(Pac)-OH (3965 mg, 15.0 mmol) in a mixture of 1 M NaOH (15.0 ml), water (35.0 ml) and 1,4-dioxane (50.0 ml) at RT. The mixture was stirred at RT for 2 h and dioxane was removed *in vacuo*. The residue was partitioned between EtOAc and 1 M KHSO<sub>4</sub>. Organic phase was washed by 10% NaCl, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated *in vacuo*. The solid residue was purified by chromatography on a silica gel column in EtOAc-HCOOH 100 : 1 to afford 5678 mg (77.8%) of Fmoc-L-Lys(Pac)-OH as a white crystalline powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ<sub>ppm</sub> 12.58 (br s, 1H, COOH), 8.02 (t, 1H, *J* 5.4 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 7.89 (d, 2H, *J* 7.6 Hz, fluorene), 7.73 (d, 2H, *J* 7.6 Hz, fluorene), 7.61 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, NHCH), 7.41 (t, 2H, *J* 7.3 Hz, fluorene), 7.32 (t, 2H, *J* 7.3 Hz, fluorene), 7.15–7.30 (m, 5H, Ph), 4.28 (d, 2H, *J* 6.3 Hz, CHCH<sub>2</sub>O), 4.23 (t, 1H, *J* 6.5 Hz, CHCH<sub>2</sub>O), 3.88–3.93 (m, 1H, NHCH), 3.38 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 2.97–3.09 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.55–1.74 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.24–1.46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). mp 145.5–146.5 °C (EtOAc). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> – 11.99 deg ml dm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (c = 0.21 in DMF). Anal. calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (486.57): C 71.59%, H 6.21%, N 5.76%, O 16.44%; found: C 71.26%, H 6.22%, N 5.59%. FAB-MS (thioglycerol-glycerol): *m/z* 487.2 (M + H)<sup>+</sup>. IR (KBr): 3341 (NH), 1729, 1699 (C = O), 1654 (amide I), 1615 (phenyl ring), 1602 (fluorene ring), 1535 (amide II).

**Method B.** Fmoc-Lys(Boc)-OH (7028 mg, 15.0 mmol) was treated with TFA and lyophilized from 1,4-dioxane. The crude Fmoc-Lys-OH.TFA was dissolved in a mixture of dichloromethane-1,4-dioxane (1 : 1, 100 ml), cooled to 0 °C and triethylamine (8.4 ml, 60.4 mmol) followed by phenylacetyl chloride (2.4 ml, 18.1 mmol) was added drop-wise. The mixture was stirred at RT overnight. Solvents were evaporated *in vacuo*. The identical work up used as in Method A afforded 3650 mg (50%) of Fmoc-Lys(Pac)-OH as a white crystalline powder. An analytical sample was crystallized from EtOAc. The analytical data were in accordance with those of the product prepared by Method A.

## H-Gly-Phe-Tyr-(N-Me)Phe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH and H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr-OH

The octapeptides were synthesized on a 2-chlorotrityl resin [52] using Fmoc-protected amino acids with *t*Bu protection of side-chains of Thr and Tyr and Trt protection of the side-chain of His [53]. Similar synthetic protocol was used for both peptides. Coupling was carried out using HBTU/DIPEA reagents [54] in 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP). Coupling after *N*-MePhe was performed with bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBrop)/DIPEA reagents [55]. The completeness of the synthetic reaction was controlled by Kaiser test [56] and by measuring the absorbance of piperidine-dibenzofulvene complex after Fmoc group deprotection using extinction coefficient 7040 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 301 nm [57]. The peptide was cleaved from the resin with a mixture of AcOH : TFE : DCM (2 : 2 : 6) (v/v/v) for 2 h [52]. The residue was evaporated to dryness and treated with a mixture of TFA : triisopropylsilane (TIS) : DCM : H<sub>2</sub>O (50 : 2 : 48 : 2) (v/v/v/v) for 30 min. The mixture was evaporated *in vacuo* and treated with diethylether. The solid residue after diethylether extraction was dissolved in 10% AcOH and peptide was purified using RP-HPLC (Phenomenex column Luna C-18, 250 × 21.2 mm, 10 μm). The purity of the peptides was controlled using analytical Nucleosil 120-5 C-18 column (250 × 4 mm, Watrex Praha, Czech Republic). The identity of the peptides was confirmed with MALDI-TOF mass spectrometry.

## Enzymatic Semisynthesis of (TyrB25,N-MePheB26,Lys(Pac)B28,ProB29)-insulin and (HisB26,Lys(Pac)B29)-insulin

The semisyntheses of these full-length insulin analogs were performed according to the method of Svoboda *et al.* [45] with a few modifications. The same protocol was used for both peptides. DOI was prepared from porcine insulin as described previously [47]. Typically, H-Gly-Phe-Tyr-(*N*-Me)Phe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH or H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr-OH peptide (150 μm) and DOI (30 μm) were dissolved in a solution (the total volume of 200 μl) containing 55% aq. dimethylformamide, 20 mM calcium acetate and 4.7 mg of TPCK-trypsin (enzyme/substrate molar ratio of 1 : 30). The pH value was adjusted by *N*-methylmorpholine (usually 0.5–6 μl) to 6.9–7.0 and checked by ISFET pH Meter IQ125 (IQ Scientific Instruments, Carlsbad, CA, USA) or by pH testing paper. The resulting reaction mixture was incubated at RT (20–25 °C). After 7–24 h, the reaction, monitored by analytical RP-HPLC, was stopped by the addition of acetone (4 °C). The sediment was dissolved in 10% acetic acid and the product was separated from trypsin, DOI and side products by preparative RP-HPLC using gradient of acetonitrile. The peptide was purified by RP-HPLC (Nucleosil 120-5 C-18 column, 250 × 8 mm, Watrex Praha, Czech Republic). The purity of peptide was verified using analytical RP-HPLC (Nucleosil 120-5 C-18 column, 250 × 4 mm, Watrex Praha, Czech Republic). The fractions containing the product were pooled and lyophilized. The identity of insulin analog was confirmed with MALDI-TOF mass spectrometry (Reflex IV, Bruker).



## Enzymatic Deprotection of (TyrB25,N-MePheB26,Lys(Pac)B28,ProB29)-insulin and (HisB26,Lys(Pac)B29)-insulin

[TyrB25,N-MePheB26, Lys(Pac)B28,ProB29]-insulin or [HisB26,Lys(Pac)B29]-insulin (5 mg) was dissolved in 1 ml of 50 mM K-phosphate buffer pH 7.5 and soluble PA (10 IU in 6.6  $\mu$ l of the buffer) or PA immobilized on Eupergit C (30 mg of the resin prewashed with the buffer) was added. The reaction proceeded at RT (22°C) and the progress of the reaction was followed with RP-HPLC. If needed, another portion of PA was to be added. After completion of the deprotection (12–24 h), the insulin analog was purified and characterized as described above.

## Isolation of Rat Adipose Tissue Plasma Membranes

Plasma membranes [58] were prepared from epididymal adipose tissue of adult male Wistar rats weighing 210–250 g. The adipose tissue (5–6 g) was homogenized using ultra-turrax with 20 ml of buffer consisting of 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)/HCl, 250 mM sucrose, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and 1 mM benzamidine, pH 7.4. The mixture was centrifuged at 3000  $\times$  g for 15 min at 4°C and then the supernatant was centrifuged again at 17 000  $\times$  g for 15 min at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 1 ml of 0.05 M Tris/HCl buffer, pH 7.6, and the protein concentration was determined according to Bradford [59].

## Receptor Binding Studies

Plasma membranes (50  $\mu$ g of proteins) were incubated in 5 ml tubes with  $^{125}$ I-insulin at a concentration of about  $5 \times 10^{-10}$  M ( $\sim$  57 000 dpm) and various concentrations (range,  $10^{-13}$  –  $10^{-5}$  M) of insulin or insulin analogs in the buffer composed of 100 mM Tris/HCl, 2 mM N-ethylmaleimide, 13.2 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.1% (w/v) BSA, pH 7.6, in a total volume of 250  $\mu$ l. The solution was incubated at 4°C for 21 h and then the reaction was terminated by the addition of ice-cold 120 mM NaCl followed by a quick filtration on a Brandel cell harvester (Biochemical Research and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Bound radioactivity was determined by  $\gamma$ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding (the binding in the absence of the competitor) was 8–10% of the total radioactivity. The nonspecific binding (the binding in the presence of  $10^{-5}$  M insulin) was determined to be about 30% of the total binding.

## Analysis of Binding Data

Competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Prizm 3 Software (San Diego, CA, USA), comparing best fits for single-binding site models. Half-maximal inhibition values of binding of  $^{125}$ I-insulin to receptor (IC<sub>50</sub>) were obtained from nonlinear regression analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

We used two different synthetic protocols for the preparation of Fmoc-Lys(Pac)-OH. Method A employed modified the procedure of Brtník *et al.* [37] for the preparation of H-Lys(Pac)-OH starting from H-Lys-OH. We used aqueous EDTA disodium salt solution instead of toxic and malodorous hydrogen sulfide for decomposition of the bis[Lys(Pac)]copper(II) complex [50,51]. Our procedure gave a somewhat better yield (65%) than the original protocol (50%). Subsequent introduction of N $^{\alpha}$ -Fmoc group proceeded in a satisfactory yield of 78%.

Method B started from commercially available Fmoc-Lys(Boc)-OH and involved the cleavage of N $^{\epsilon}$ -Boc group and introduction of N $^{\epsilon}$ -phenylacetyl protecting group. This route is simpler and much less laborious than Method A. The relatively moderate yield of 50% is probably caused by a partial cleavage of base-labile N $^{\alpha}$ -Fmoc group in the course of the introduction of phenylacetyl group in the presence of triethylamine. The fact that Method B is more straightforward than Method A compensates the higher cost of Fmoc-Lys(Boc)-OH compared to free lysine.

Recently, Žáková *et al.* [48] published the synthesis, binding affinity and the crystal structure of [TyrB25, N-MePheB26]-insulin analog. The analog was designed to address the problem of structural and biological switch from mostly metabolic activity of insulin to predominant growth factor activities of insulin-like growth factor I IGF-I. The modifications were expected to introduce a kink in the main chain, as observed at residue PheB25 in the IGF-I structure. Surprisingly, the changes are well accommodated within insulin R6 hexamer. Only one molecule of each dimer in the hexamer responds to the structural TyrB25 and N-MePheB26 alterations, the other remains very similar to the wildtype insulin. In this study, we decided to synthesize and characterize the binding potency of insulin analog in which the swap TyrB26  $\leftrightarrow$  PheB25 and the N-methylation of resulting PheB26 is accompanied with the swap LysB29  $\leftrightarrow$  ProB28. LysB29  $\leftrightarrow$  ProB28 swap was shown to cause the monomerization of insulin [60]. X-ray crystallography study should confirm if the more IGF-I-like sequence of [TyrB25, N-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin is followed by IGF-like conformational distortion of the B-chain.

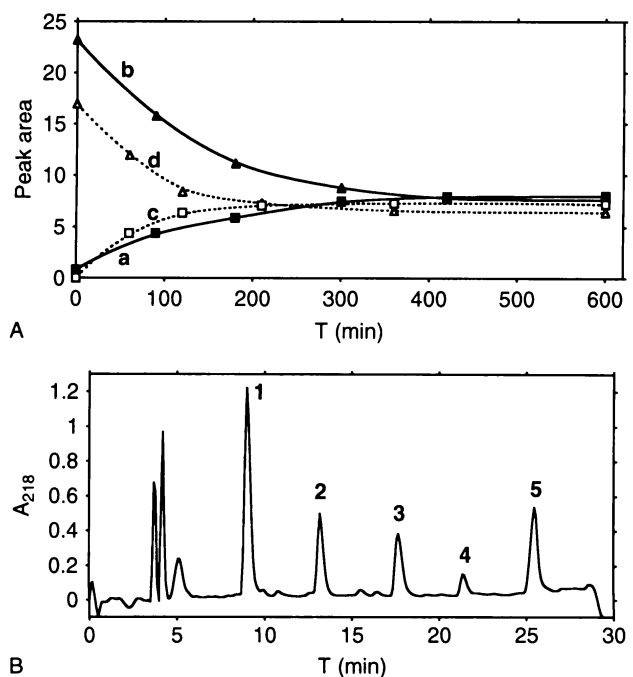
Recently, we published a series of novel des-tetrapeptide(B27-B30)-shortened insulin analogs (B26-amides) [47]. We demonstrated that the substitution of TyrB26 with His or N-MeHis resulted in potent shortened insulin analogs. In this study, we decided to synthesize full-length insulin analog with His in the position B26 and to investigate its binding affinity for insulin receptor in rat adipocyte membranes.

The solid-phase synthesis of H-Gly-Phe-Tyr-(N-Me)Phe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH or H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Pro-Lys(Pac)-Thr-OH requires coupling with

Fmoc-Lys(Pac)-OH as a third or second synthetic step, respectively. We observed fully satisfactory couplings using this lysine derivative as proved by monitoring the absorbance of piperidine–dibenzofulvene complex after Fmoc group deprotection (see Experimental). We found similar satisfactory results for the coupling of protected threonine or proline in the course of the subsequent synthetic step. The octapeptides were obtained in the yield of 40–45% after HPLC purification (150  $\mu$ mol synthetic scale).

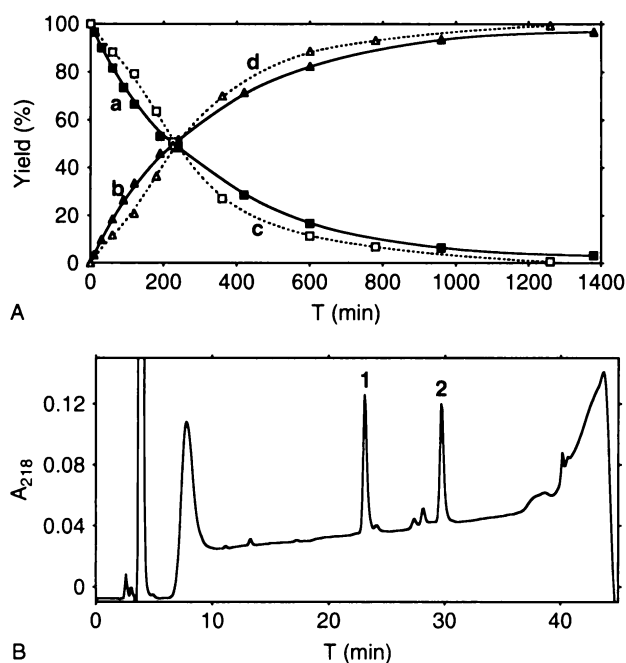
The crucial step in our semisynthetic approach is the trypsin-catalyzed condensation of DOI with synthetic peptide. We performed the semisynthesis of [TyrB25, N-MePheB26, Lys(Pac)B28, ProB29]-insulin ten times and the synthesis of [HisB26, Lys(Pac)B29]-insulin six times in a 200 or 100  $\mu$ l synthetic scale (see Experimental). The time-courses of typical semisynthetic reactions of both insulin analogs are shown in Figure 1(A). The concentration of DOI in a reaction mixture progressively decreases and the concentration of a product increases. Figure 1(B) shows HPLC chromatogram of purification of [TyrB25, N-MePheB26, Lys(Pac)B28, ProB29]-insulin from a semisynthetic reaction mixture. During semisynthesis not only the desired product (peak 3 in Figure 1(B)) was formed, but also various side products appeared as well (peaks 4 and 5 in Figure 1(B)), with the products of selfcondensation of DOI as the most frequent species. The coupling of the carboxyl group of ArgB22 either with the N-terminus of the same molecule results in SC-DOI (single-chain DOI) or with the N-terminus of another DOI molecule gives (DOI)<sub>2</sub> (covalent DOI dimer) [17,18,45]. The average yield of our semisyntheses of [TyrB25, N-MePheB26, Lys(Pac)B28, ProB29]-insulin was about 11% calculated from the starting amount of DOI, which is a limiting reactant. However, in some cases the yield was as high as 32% or as low as 2%. The average yield of semisyntheses of [HisB26, Lys(Pac)B29]-insulin was about 15% (3–26%). In general, the yield of semisynthesis of any insulin analog strongly depends on the quality of trypsin and on the structure and length of the peptide. We have been using several different TPCk-treated tryptins (see Materials). Interestingly, we observed that after some time, trypsin may lose its 'synthetic' activity but still keeps its hydrolytic capacity; in such a case it is necessary to purchase a fresh batch of this enzyme.

The enzymatic cleavage of phenylacetyl group from [Lys(Pac)]-insulin is the final step of the preparation of a new analog. Our laboratory has the experience with the use of several different forms of PA. At the beginning of 1990s, we used PA isolated from *E. coli* by affinity chromatography [42] and immobilized on porous glass [61]. These enzyme preparations were of a relatively low specific activity and it was necessary to circulate the solution of substrate through a column of Dowex 1  $\times$  8 (OH<sup>-</sup> form), devised to trap



**Figure 1** (A) The time-course of the trypsin-catalyzed enzymatic semisynthesis of [TyrB25, N-MePheB26, Lys(Pac)B28, ProB29]-insulin (■ and a) from DOI (▲ and b) and H-Gly-Phe-Tyr-(N-Me)Phe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH peptide (not shown) calculated from integration of respective peaks at 218 nm. The time-course enzymatic semisynthesis of [HisB26, Lys(Pac)B29]-insulin (□ and c) from DOI (Δ and d) and H-Gly-Phe-Phe-His-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH peptide is also shown. (B) RP-HPLC chromatogram of the purification of [TyrB25, N-MePheB26, LysB28(Pac), ProB29]-insulin from the semisynthetic reaction mixture. Peak 1 is DOI, peak 2 is H-Gly-Phe-Tyr-(N-Me)Phe-Thr-Lys(Pac)-Pro-Thr-OH peptide, peak 3 is the product and peaks 4 and 5 are side-products. For details see Experimental and Results.

the released phenylacetyl acid, which can inhibit the immobilized PA [45]. However, the addition of an anion exchange support had a negative effect on the isolation yields of the deprotected insulin analog. We have also been using commercial preparations of PA, *E. coli* enzyme immobilized on Eupergit C and soluble PA (see Materials). The use of these preparations is simple and due to the high specific activity does not require additional application of the Dowex resin for removal of the inhibiting phenylacetyl acid. Interestingly, both PAs, soluble and insoluble, give similar results and yields but soluble PA is overall simpler to handle. The use of soluble PAs is not accompanied by the generation of byproducts and we have not observed any insulin degradation. The time courses for deprotections of [TyrB25, N-MePheB26, Lys(Pac)B28, ProB29]-insulin and of [HisB26, Lys(Pac)B29]-insulin are shown in Figure 2(A). There is no significant difference between the courses of both reactions. The yield of phenylacetyl deprotection was usually between 60 and 80%, and any losses here are very likely due to the HPLC purification.



**Figure 2** (A) The time-course of the soluble PA-catalyzed enzymatic deprotection of [TyrB25,*N*-MePheB26,Lys(Pac)B28,ProB29]-insulin (■ and a) to yield [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin (▲ and b) expressed as a relative yield in % and calculated from integration of respective peaks at 218 nm. The time course of enzymatic deprotection of [HisB26,Lys(Pac)B29]-insulin (□ and c) to give [HisB26]-insulin (Δ and d) is also shown. (B) RP-HPLC analytical chromatogram of the deprotection mixture after 240 min. Peak 1 is [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin and peak 2 is [TyrB25,*N*-MePheB26,Lys(Pac)B28,ProB29]-insulin. For details see Experimental.

Figure 2(B) shows HPLC analysis of the deprotection of [TyrB25,*N*-MePheB26,Lys(Pac)B28,ProB29]-insulin after 240 min.

The receptor-binding affinity of [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin is only 4% of that of human insulin (Table 1 and Figure 3). This affinity is as low as the affinity of previously published [TyrB25,*N*-MePheB26]-insulin analog [48]. Hence it will be very interesting to investigate the structural and conformational changes occurring in this new mutant insulin. These experiments are in progress.

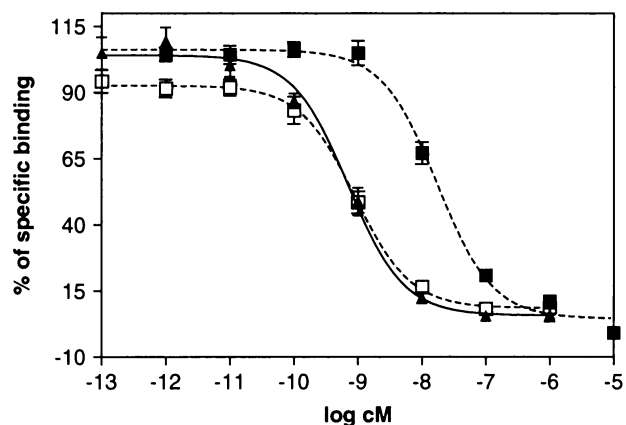
The receptor-binding affinity of [HisB26]-insulin is about 78% of that of human insulin (Table 1 and Figure 3). During the preparation of this manuscript, we found out that DiMarchi *et al.* had already mentioned the same analog in the 19th American Peptide Symposium Proceedings [62]. They reported a 75% binding affinity on membranes from the engineered cells, which is in close agreement with our results. Our results show that the substitution which leads to a very potent shortened insulin analog (des-tetrapeptide(B27-B30)-B26-amide) [47] has not the same positive effect in the case of a full-length analog.

**Table 1** Values of IC<sub>50</sub><sup>a</sup> and Relative Receptor Binding Affinities<sup>b</sup> of Human Insulin, [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin and [HisB26]-insulin

| Ligand   | IC <sub>50</sub> ± SEM (nM) | n | Potency (%) |
|--|-----------------------------|---|-------------|
| Human insulin                                      | 0.70 ± 0.19                 | 5 | 100         |
| [TyrB25, <i>N</i> -MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin | 17.36 ± 3.12                | 3 | 4.03        |
| [HisB26]-insulin                                   | 0.90 ± 0.21                 | 4 | 77.7        |

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values represent concentrations of insulin or the analog causing half-maximal inhibition of binding of human <sup>125</sup>I-monoiodotyrosylA14-insulin to the insulin receptor. Each value represents the mean ± SEM of multiple determinations (n).

<sup>b</sup> Relative receptor binding affinity defined as (IC<sub>50</sub> of human insulin/IC<sub>50</sub> of analog) × 100. For details see Experimental.



**Figure 3** Inhibition of binding of <sup>125</sup>I-insulin to adipose tissue plasma membranes by human insulin (▲), [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin analog (■) and [HisB26]-insulin analog (□). Quantitative information is provided in Table 1. For details, see Experimental.

## CONCLUSIONS

In this paper, we present the detailed synthetic protocol and characterization of Fmoc-Lys(Pac)-OH, its use for the preparation of two different synthetic octapeptides by solid-phase synthesis, trypsin-catalyzed condensation of respective octapeptides with desoctapeptide(B23-B30)-insulin and penicillin G acylase catalyzed cleavage of phenylacetyl group from *N*<sup>ε</sup>-amino group of lysine to give novel insulin analogs. The first prepared analog is [HisB26]-insulin, which has about 78% binding potency compared to human insulin. We applied the above described strategy also for the preparation and characterization of a novel insulin analog [TyrB25,*N*-MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin in which the swap TyrB26 ↔ PheB25 and

the *N*-methylation of resulting PheB26 is accompanied with the swap LysB29 ↔ ProB28. The analog was designed to address the problem of a structural and biological switch from the mostly metabolic activity of insulin to the predominant growth factor activities of IGF-I. The modifications of [TyrB25, *N*-MePheB26, LysB28, ProB29]-insulin are expected to introduce IGF-like conformational distortion of the C-terminus of the B-chain. Experiments to determine the crystal structure of this novel insulin analog are in progress.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Chemical Genetics Consortium LC06077) and Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z40550506).

## REFERENCES

- Brandenburg D. Insulin-structure, function, design. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1999; **107** (Suppl. 2): S6–S12.
- Brandenburg D. Insulin chemistry. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag: Berlin, 1990; 3–22.
- Nakagawa SH, Tager HS. Perturbation of insulin-receptor interactions by intramolecular hormone cross-linking. Analysis of relative movement among residues A1, B1, and B29. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 272–279.
- Weiss MA, Nakagawa SH, Jia W, Xu B, Hua QX, Chu YC, Wang RY, Katsoyannis PG. Protein structure and the spandrels of San Marco: insulin's receptor-binding surface is buttressed by an invariant leucine essential for its stability. *Biochemistry* 2002; **41**: 809–819.
- Hua QX, Nakagawa S, Hu SQ, Jia WH, Wang SH, Weiss MA. Toward the active conformation of insulin—stereospecific modulation of a structural switch in the B chain. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 24900–24909.
- Brange J. The new era of biotech insulin analogues. *Diabetologia* 1997; **40**: S48–S53.
- Brange J, Volund A. Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; **35**: 307–335.
- Katsoyannis PG, Ginos J, Cosmatos A, Schwartz GP. A synthetic human insulin analogue modified at position B-22. [Lys-22-B] human insulin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1975; **1**: 464–466.
- Nakagawa SH, Hua QX, Hu SQ, Jia WH, Wang SH, Katsoyannis PG, Weiss MA. Chiral mutagenesis of insulin—contribution of the B20-B23 beta-turn to activity and stability. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 22386–22396.
- Inouye K, Watanabe K, Tochino Y, Kobayashi M, Shigeta Y. Semisynthesis and properties of some insulin analogs. *Biopolymers* 1981; **20**: 1845–1858.
- Young JD, Carpenter FH. Isolation and characterization of products formed by the action of trypsin on insulin. *J. Biol. Chem.* 1961; **236**: 743–748.
- Moriyama K, Muneyuki R, Oka T. Use of immobilized Achromobacter protease I for semisynthesis of human insulin. *Meth. Enzymol.* 1987; **136**: 162–170.
- Gattner HG. B-chain shortening of matrix-bound insulin by pepsin. I: preparation and properties of bovine des-pentapeptide(B26-30) insulin. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1975; **356**: 1397–1404.
- Zahn H, Gattner H-G, Fischer W, Jonczyk A, Wiese A. The use of enzymes in the semisynthesis of insulin analogues. *Adv. Biosci.* 1987; **65**: 167–174.
- Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Wollmer A, Krail G, Brandenburg D, Zahn H, Gliemann J, Gammeltoft S. Receptor-binding region of insulin. *Nature* 1976; **259**: 369–373.
- Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DM, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD, Sakabe K, Sakabe N, Vijayan NM. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B* 1988; **319**: 369–456.
- Kubiak T, Cowburn D. Trypsin-catalysed formation of pig des-(23–63)-proinsulin from desoctapeptide-(B23-30)-insulin. *Biochem. J.* 1986; **234**: 665–670.
- Kubiak T, Cowburn D. Enzymatic semisynthesis of porcine despen-tapeptide (B26-30) insulin using unprotected desoctapeptide (B23-30) insulin as a substrate. Model studies. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1986; **27**: 514–521.
- Markussen J, Jorgensen KH, Sorensen AR, Thim L. Single chain des-(B30) insulin. Intramolecular crosslinking of insulin by trypsin catalyzed transepeptidation. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1985; **26**: 70–77.
- Derewenda U, Derewenda Z, Dodson EJ, Dodson GG, Bing X, Markussen J. X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J. Mol. Biol.* 1991; **220**: 425–433.
- Cutfield J, Cutfield S, Dodson E, Dodson G, Hodgkin D, Reynolds C. Evidence concerning insulin activity from the structure of a cross-linked derivative. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1981; **362**: 755–761.
- Canova-Davis E, Carpenter FH. Semisynthesis of insulin: specific activation of the arginine carboxyl group of the B chain of desoctapeptide-(B23–30)-insulin (bovine). *Biochemistry* 1981; **20**: 7053–7058.
- Obermeier R, Geiger R. A new semisynthesis of human insulin. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1976; **357**: 759–767.
- Ruttenberg MA. Human insulin: facile synthesis by modification of porcine insulin. *Science* 1972; **177**: 623–626.
- Inouye K, Watanabe K, Tochino Y, Kanaya T, Kobayashi M, Shigeta Y. Semisynthesis and biological properties of the [B24-leucine]-, [B25-leucine]- and [B24-leucine, B25-leucine]-analogues of human insulin. *Experientia* 1981; **37**: 811–813.
- Inouye K, Watanabe K, Morihara K, Tochino Y, Kanaya T, Sakibara S, Emura J. Enzyme-assisted semisynthesis of human insulin. *J. Am. Chem. Soc.* 1979; **101**: 751–752.
- Gattner HG, Danho W, Behn C, Zahn H. The preparation of two mutant forms of human insulin, containing leucine in position B24 or B25, by enzyme-assisted synthesis. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1980; **361**: 1135–1138.
- Nakagawa SH, Tager HS. Role of the phenylalanine B25 side chain in directing insulin interaction with its receptor. Steric and conformational effects. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 7332–7341.
- Tager H, Thomas N, Assouan R, Rubenstein A, Saekow M, Olefsky J, Kaiser ET. Semisynthesis and biological activity of porcine [LeuB24]insulin and [LeuB25]insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; **77**: 3181–3185.
- Shoelson S, Fickova M, Haneda M, Nahum A, Musso G, Kaiser ET, Rubenstein AH, Tager H. Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine- for-phenylalanine substitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; **80**: 7390–7394.
- Leyer S, Gattner HG, Leithauser M, Brandenburg D, Wollmer A, Hocker H. The role of the C-terminus of the insulin B-chain in modulating structural and functional properties of the hormone. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1995; **46**: 397–407.
- Waldmann H, Sebastian D. Enzymatic Protecting Group Techniques. *Chem. Rev.* 1994; **94**: 911–937.
- Kadereit D, Waldmann H. Enzymatic protecting group techniques. *Chem. Rev.* 2001; **101**: 3367–3396.
- Holley RW. Enzymatic removal of the protecting group in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1955; **77**: 2552–2553.

35. Meyers C, Glass JD. Enzymes as reagents in peptide synthesis: enzymatic removal of amine protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975; **72**: 2193–2196.
36. Pande CS, Pelzig M, Glass JD. Camphorquinone-10-sulfonic acid and derivatives: convenient reagents for reversible modification of arginine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; **77**: 895–899.
37. Brtník F, Barth T, Jošt K. Use of phenylacetyl group for protection of the lysine N-epsilon-amino group in synthesis of peptides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1981; **46**: 1983–1989.
38. Waldmann H. The use of penicillin acylase for selective N-terminal deprotection in peptide-synthesis. *Tet. Lett.* 1988; **29**: 1131–1134.
39. Waldmann H. The phenylacetyl (Phac) group as enzymatically removable protecting function for peptides and carbohydrates—selective deprotections with penicillin acylase. *Liebigs Ann. Chem.* 1988; 1175–1180.
40. Fuganti C, Grasselli P, Casati P. Immobilized penicillinacylase—application to the synthesis of the dipeptide aspartame. *Tet. Lett.* 1986; **27**: 3191–3194.
41. Didziapetris R, Drabnig B, Schellenberger V, Jakubke HD, Svedas V. Penicillin acylase-catalyzed protection and deprotection of amino-groups as a promising approach in enzymatic peptide-synthesis. *FEBS Lett.* 1991; **287**: 31–33.
42. Jiracek J, Barth T, Velek J, Bláha I, Pospíšek J, Svoboda I. Purification of penicillin amidohydrolase, an enzyme for semisynthetic procedures. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1992; **57**: 2187–2191.
43. Widmer F, Ohno M, Smith M, Nelson N, Anfinsen CB. Enzymatic peptide synthesis. In *Peptides 1982*. Walter de Gruyter: Berlin, 1983; 375–379.
44. Wang QC, Fei J, Cui DF, Zhu SG, Xu LG. Application of an immobilized penicillin acylase to the deprotection of N-phenylacetyl insulin. *Biopolymers* 1986; **25**: S109–S114.
45. Svoboda I, Brandenburg D, Barth T, Gattner HG, Jiracek J, Velek J, Bláha I, Ubík K, Kasicka V, Pospíšek J. Semisynthetic insulin analogues modified in positions B24, B25 and B29. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1994; **375**: 373–378.
46. Cencialová A, Žáková L, Jiracek J, Barthová J, Barth T. Preparation and characterization of two LysB29 specifically labelled fluorescent derivatives of human insulin. *J. Pept. Sci.* 2004; **10**: 470–478.
47. Žáková L, Barth T, Jiracek J, Barthová J, Zórad S. Shortened insulin analogues: marked changes in biological activity resulting from replacement of TyrB26 and N-methylation of peptide bonds in the C-terminus of the B-chain. *Biochemistry* 2004; **43**: 2323–2331.
48. Žáková L, Brynda J, Au-Alvarez O, Dodson EJ, Dodson GG, Whittingham JL, Brzozowski AM. Toward the insulin-IGF-I intermediate structures: functional and structural properties of the [Tyr(B25)NMePhe(B26)] insulin mutant. *Biochemistry* 2004; **43**: 16293–16300.
49. Jones JH. Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary. *J. Pept. Sci.* 2006; **12**: 1–12.
50. Galpin IJ, Hancock FE, Handa BK, Jackson AG, Kenner GW, Ramage R, Singh B. Peptides XXXIV. Synthesis of the 1–16 fragment of a lysozyme analogue. *Tetrahedron* 1979; **35**: 2771–2778.
51. Yamashiro D, Li CH. Adrenocorticotropins. 44. Total synthesis of the human hormone by the solid-phase method. *J. Am. Chem. Soc.* 1973; **95**: 1310–1315.
52. Barlos K, Chatzi O, Gatos D, Stavropoulos G. 2-Chlorotriptyl chloride resin—studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991; **37**: 513–520.
53. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990; **35**: 161–214.
54. Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillissen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tet. Lett.* 1989; **30**: 1927–1930.
55. Coste J, Frerot E, Jouin P, Castro B. Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-methylated amino-acids. *Tet. Lett.* 1991; **32**: 1967–1970.
56. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 1970; **34**: 595–598.
57. Meienhofer J, Waki M, Heimer EP, Lambros TJ, Makofske RC, Chang CD. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1979; **13**: 35–42.
58. Zórad S, Golda V, Ficková M, Macho L, Pinterová L, Jurcovicova J. Terguride treatment attenuated prolactin release and enhanced insulin receptor affinity and GLUT 4 content in obese spontaneously hypertensive female, but not male rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; **967**: 490–499.
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; **72**: 248–254.
60. Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)]-Human insulin—a rapidly absorbed analog of human insulin. *Diabetes* 1994; **43**: 396–402.
61. Barth T, Anzenbacherová E, Capka M, Pospíšek J, Čzaková M, Bárta M. Immobilized form of penicillin amidohydrolase. *Czech. Patent Appl. PV* **164**: 1990.
62. Smiley DL, Boaquan M, Gelfanov VM, DiMarchi RD. Exploration and elaboration of reported insulin superagonism through site-selective replacement at TyrB26. In *Understanding Biology Using Peptides: Proceedings of the 19th American Peptide Symposium*. Blondelle SE (ed.). Springer: San Diego, 2006; 237–238.

„Souhlasím se zapůjčením této diplomové práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

| Jméno, příjmení a adresa vypůjčovatele | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|--|----------|-----------------|----------|
|  |          |                 |          |