

UŽITNÝ VZOR

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012 - 26680**
(22) Přihlášeno: **08.12.2011**
(47) Zapsáno: **04.03.2013**

(11) Číslo dokumentu:

24985

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 31/4192 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(73) Majitel:

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, v. v. i., Praha, CZ
The University of York, Heslington, GB

(72) Původce:

Jiráček Jiří Dr. CSc., Zeleneč, CZ
Žáková Lenka Dr. Ph.D., Praha, CZ
Vaněk Václav Mgr. Ph.D., Praha, CZ
Brzozowski Andrzej Marek Dr., York, GB

(74) Zástupce:

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd, v.v.i.; oddělení patentů a licencí,
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo náměstí 2/542, Praha 6, 16610

(54) Název užitého vzoru:

Deriváty insulinu s cyklickou strukturou v C-konci B-řetězce

CZ 24985 U1

Deriváty insulínu s cyklickou strukturou v C-konci B-řetězce

Oblast techniky

Technické řešení se týká nových derivátů insulínu s vysokou vazebnou afinitou vůči receptoru insulínu, způsobu jejich syntézy a případného použití *in vivo*.

5 Dosavadní stav techniky

Metabolické onemocnění diabetes mellitus, nebo-li cukrovka, postihuje ve světě miliony lidí. Statistické odhady hovoří jasně: počet lidí postižených diabetem bude neustále růst, přičemž v roce 2030 bude na světě asi 438 milionů diabetiků. Z tohoto důvodu je velmi důležitý výzkum interakce insulínu s receptorem insulínu, který by mohl vést k vývoji nových derivátů insulínu s vlastnostmi, zvyšujícími komfort diabetických pacientů.

Insulin je peptidový hormon jehož hlavní funkcí je regulace koncentrace glukózy v krvi a umožnění jejího vstupu do buňky. Mimo to má insulin zásadní vliv na metabolismus bílkovin a tuků. Primární struktura insulínu je tvořena peptidovými řetězci A (21 aminokyselin) a B (30 aminokyselin), které jsou navzájem spojeny dvěma intermolekulárními disulfidickými můstky (A7-B7 a A20-B19). Dále je jeden intramolekulární můstek přítomný v řetězci A (A6-A11). Sekundární a terciární struktura insulínu je schématicky znázorněna na Obrázku 1.

Řetězec A formuje dvě šroubovice. Řetězec B vytváří v tzv. T-stavu šroubovici jen ve své střední části. V tzv. R-stavu (který se vytváří pouze za přítomnosti malých cyklických alkoholů jako je např. fenol) tato šroubovice v B-řetězci pokračuje až k N-terminální aminokyselině B1. (Whittingham J. L., Edwards D. J. a spoluautoři *Biochemistry* 1998, 37, 11516). Fyziologický význam T-a R- konformací není doposud znám.

Jako monomer insulin existuje jen při nízkých koncentracích. Při vyšších koncentracích vytváří dimery a za přítomnosti zinečnatých iontů hexamery (Antolíková E., Žáková L. a spoluautoři 2011, *J. Biol. Chem.* 286, 36968).

25 Biologický účinek insulínu je primárně zprostředkován vazbou monomeru insulínu na receptor insulínu. Receptor insulínu je tetramerní membránový glykoprotein skládající se ze dvou extracelulárních podjednotek α a dvou transmembránových a intracelulárních podjednotek β . Podjednotky jsou navzájem spojeny několika disulfidickými můstky (McKern N. M., Lawrence M. C. a spoluautoři 2006, *Nature* 443, 218). Vazba insulínu na receptor aktivuje enzym tyrosinkinázu, který je součástí intracelulární části β -podjednotky, a poté dochází ke spuštění signalizační kaskády a biologických účinkům insulínu.

35 Insulin se pravděpodobně váže na extracelulární podjednotky α , nicméně struktura komplexu insulínu vázaného na receptor stále není známa. Předpokládá se, že molekula insulínu musí při vazbě na receptor podléhat jistým konformačním změnám (De Meyts P. 2004, *Bioessays* 26, 1351, Ludvigsen S., Olsen H. B. a Kaarsholm N. C. 1998, *J. Mol. Biol.* 279, 1, Hua Q. X., Shoelson S. E. a spoluautoři 1991, *Nature* 354, 238, Dodson E. J., Dodson G. G. a spoluautoři 1983, *Biopolymers* 22, 281). Jednou z předpokládaných konformačních změn oproti strukturám znázorněným na Obrázku 1 je odklon C-konce B-řetězce od centrální části molekuly insulínu (Obrázek 2).

40 Tento odklon má za důsledek odkrytí předtím skrytých aminokyselin A1-A3, které jsou podle všech dosavadních poznatků nezbytné pro vazbu insulínu na receptor a jsou součástí tzv. vazebného místa 1 v molekule insulínu (které tvoří aminokyseliny GlyA1, IleA2, ValA3, GlnA5, ThrA8, TyrA19, AsnA21, ValB12, TyrB16, GlyB23, PheB24, PheB25) (Mayer J. P., Zhang F. a DiMarchi R. D. 2007, *Biopolymers* 88, 687). Pro vazbu insulínu na receptor dále jsou nezbytné i aminokyseliny SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 and LeuB17, které tvoří tzv. vazebné místo 2 (Schaffer L. 1994, *Eur. J. Biochem.* 221, 1127, Conlon J. M. 2001, *Peptides* 22, 1183, Ward C. W. a Lawrence M. C. 2009, *Bioessays* 31, 422).

Deriváty či analogy insulínu jsou látky, které vycházejí svojí strukturou ze struktury molekuly lidského insulínu, avšak cílenými modifikacemi v aminokyselinové sekvenci A či B řetězce je u nich dosaženo pozměněných biologických účinků a rozdílné vazebné afinity vůči receptoru.

Deriváty insulínu jsou vyvíjeny především pro zlepšení kvality léčby diabetu a ke zvýšení komfortu pacientů. Dalším důležitým důvodem přípravy derivátů insulínu je snaha o vyjasnění interakce insulínu s receptorem insulínu, neboť jak již bylo výše zmíněno, doposud není interakce těchto dvou proteinů dopodrobna prozkoumána a krystalový komplex obou molekul nebyl doposud připraven.

V současné době je na trhu celkem 5 farmaceutických přípravků s obsahem těchto derivátů, využívaných v lékařské praxi (Mooradian A. D., Bernbaum M., Albert S. G. 2006, *Annals Intern. Med.* 145, 125). Tři z nich jsou tzv. rychle působící insulinové deriváty (Lispro, Aspart a Glulisine). Vyznačují se rychlejším nástupem a rychlejším odezněním účinku vzhledem k lidskému insulínu. Zbývající dva deriváty (Glargine a Detemir) patří mezi tzv. dlouhodobě působící deriváty a vyznačují se několikanásobně prodlouženou dobou účinku. Principem zmíněného působení těchto klinicky používaných derivátů je změna jejich rozpustnosti vzhledem k přirozenému insulínu. Té je docíleno především ovlivněním schopnosti dimerizace a tvorby hexamerů, změnou isoelektrického bodu (pI) molekul derivátů či zvýšením schopnosti vázat se na sérové proteiny.

Všechny tři klinicky používané deriváty s rychlým nástupem účinku (Lispro, Aspart a Glulisine) byly připraveny modifikacemi aminokyselin v primární struktuře molekuly lidského insulínu za účelem snížení schopnosti dimerizace molekuly a tím zvýšení rozpustnosti dané látky, vedoucí ke zrychlenému vstřebávání. Hlavním výhodou při aplikaci těchto látek je tak rychlejší snížení koncentrace glukózy v krvi při hyperglykemických stavech než při podání klasického lidského insulínu. Zároveň umožňují pacientům dřívější příjem potravy po aplikaci derivátu než po podání lidského insulínu. Insulin Lispro, první vyvinutý derivát s rychlým nástupem účinku (Howey D. C., Bowsher R. R. a spoluautoři 1994, *Diabetes* 43, 396), byl připraven záměnou aminokyselin lysinu a prolinu v pozicích 28 a 29 B-řetězce. Na trhu je dostupný od roku 1996 pod názvem Humalog (firma Eli Lilly). Insulin Aspart byl připravený záměnou aminokyseliny prolinu v pozici 28 B-řetězce za kyselinu asparagovou (Setter S. M., Corbett C. F. a spoluautoři 2000, *Annals Pharmacother.* 34, 1431). Pro klinické použití byl schválen v roce 2000 pod názvem Novalog (firma Novo Nordisk). V molekule derivátu Glulisine je v řetězci B substituovaná asparagová kyselina na pozici B3 lysinem a molekula lysinu na pozici B29 kyselinou glutamovou (Rave K., Klein O. a spoluautoři 2006, *Diabetes Care* 29, 1812). Insulin Glulisine je klinicky dostupný od roku 2004 pod názvem Apidra (firma Sanofi Aventis).

Dlouhodobě působící derivát Glargine je derivát insulínu s náhradou asparaginu glycinem v pozici 21 A-řetězce a přidáním dvěma molekulami argininu v pozici 30 B-řetězce (Rosenstock J., Schwartz S. L. a spoluautoři 2001, *Diabetes Care* 24, 631). Je komerčně dostupný od roku 2003 pod názvem Lantus (firma Sanofi Aventis). V případě Glarginu se projevuje zvýšení pI molekuly derivátu. Po jeho subkutánní aplikaci dochází k tvorbě precipitátů a pomalejšímu uvolňování do krve. Druhý dlouhodobě působící derivát insulínu, Detemir, vykazuje díky přítomnosti hydrofobního postranního řetězce vyšší schopnost tvorby hexamerů. To spolu s vyšší afinitou k plazmatickému albuminu přispívá k výslednému prodlouženému efektu této látky. Detemir byl připraven připojením kyseliny myristové na lysin pozici 29 B-řetězce (Plank J., Bodenlenz M. R. a spoluautoři 2005, *Diabetes Care* 28, 1107). Je komerčně dostupným od roku 2006 pod názvem Levemir (firma Novo Nordisk).

V nedávné době bylo připraveno několik vysoce aktivních derivátů insulínu s N--methylovanou aminokyselinou v poloze B26 (Žáková L., Kazdová L. a spoluautoři 2008, *Biochemistry* 47, 5858) a následně byly určeny i jejich krystalové struktury (Jiráček J., Žáková L. a spoluautoři 2010 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 107, 1966). Překvapivě bylo zjištěno, že tyto deriváty se vyznačují novým typem β -ohybu typu II v polohách B24-B26. Vytvoření tohoto ohybu vede k odkrytí předtím zakrytých aminokyselin A1-A3. Předpokládá se, že podobný β -ohyb se může vy-

skytovat v tzv. aktivované formě insulinu při vazbě hormonu na receptor. Přítomnost tohoto ohybu v C-konci B-řetězce insulinu, který je částí molekuly důležitou pro dimerizaci insulinu, má za následek, že tyto deriváty mají výrazně sníženou schopnost dimerizace (Jiráček J., Žáková L. a spoluautoři 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 1966) a v organismu tudíž vykazují rychlejší nástup fyziologického účinku než přirozený insulin.

Předkládané technické řešení popisuje rychle působící deriváty insulinu, jejichž účinek je, kromě snížení schopnosti dimerizovat, zprostředkován zejména výraznou afinitou k receptoru insulinu.

Podstata technického řešení

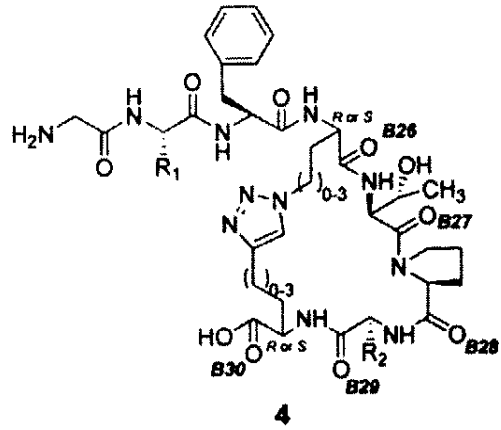
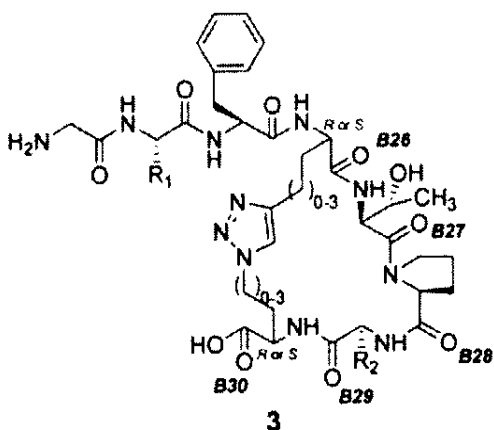
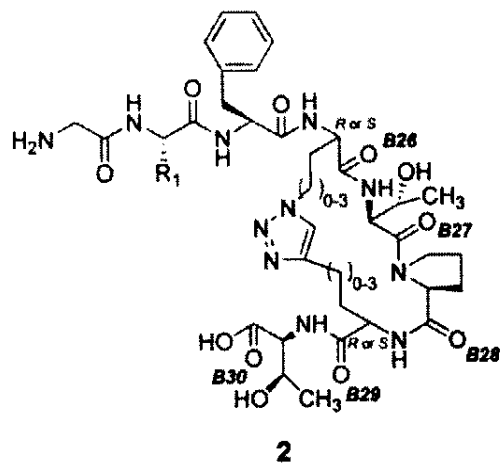
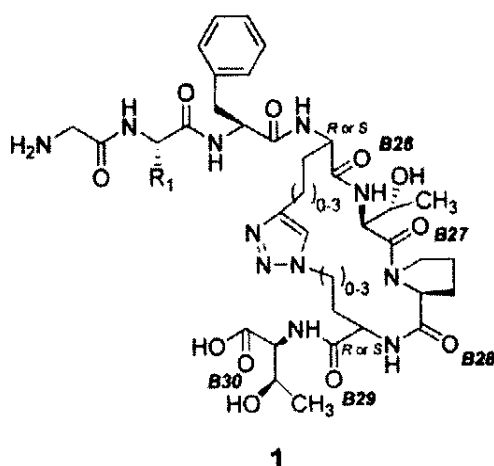
Technické řešení popisuje nové deriváty lidského insulinu obecného vzorce I, mající cyklickou strukturu v C-konci B-řetězce, které vykazují vysokou afinitu vůči receptoru insulinu a zároveň mají potlačenu schopnost tvořit dimery. Tyto vlastnosti nové deriváty insulinu obecných vzorců 1 předurčují k použití jako rychle působící insuliny, snižující hladinu glukózy *in vivo*. Výhodou těchto sloučenin je kromě snadné přípravy také modularita jejich struktury, která umožňuje do-
datečné přizpůsobení jejich biologických vlastností.

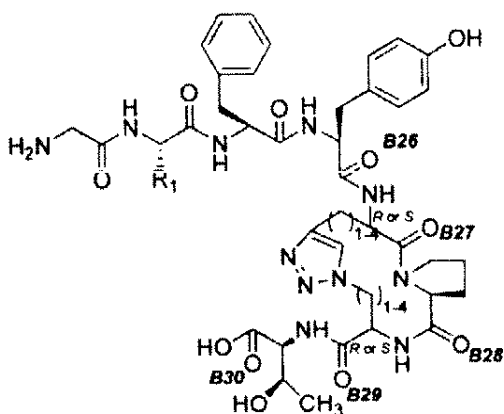
Předmětem tohoto technického řešení jsou deriváty insulinu obecného vzorce I,

DOI-X

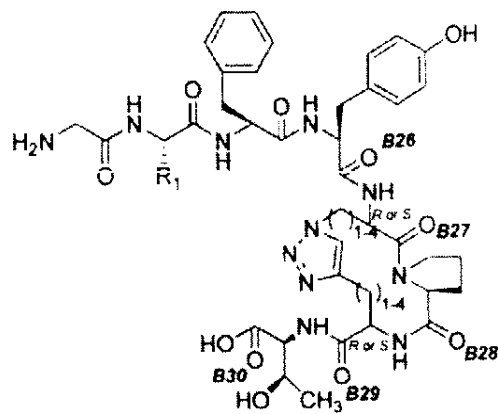
(I)

kde DOI je des(B23-B30)oktapeptid-insulin, což je lidský insulin bez C-terminálního oktapeptidu B23-B30, a X je modifikovaný oktapeptid zvolený ze skupiny, zahrnující následující oktapeptidy typů 1 až 8, napodobující sekvenci B23-B30 lidského insulinu, připojené k DOI amidovou vazbou mezi karboxylovou skupinou C-terminálního ArgB22 v molekule DOI a aminoskupinou N-terminálního GlyB23 v molekulách oktapeptidů 1-8, přičemž R_1 v molekulách oktapeptidů 1-8 je H či benzyl a R_2 je H či $(CH_2)_3-NH_2$.

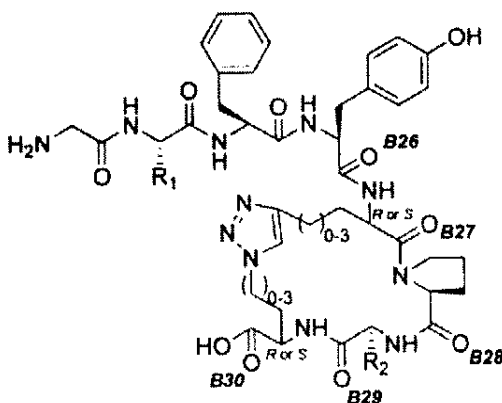




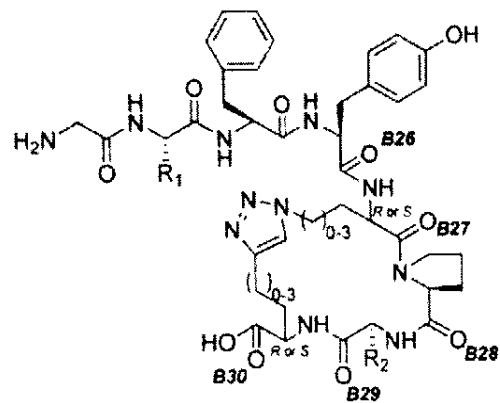
5



6



7



8

Sloučeniny vzorce I obsahují několik chirálních center v modifikovaném oktapeptidu, které mohou být v (*S*) či (*R*) konfiguraci. Jedná se především o C α -atomy aminokyselin v polohách B26, B27, B29 a B30.

- 5 Nové deriváty insulinu podle předkládaného technického řešení jsou připraveny cyklizací části molekuly insulinu pomocí Cu-katalyzované cykloadice mezi alkynem a azidem za vzniku triazolu, který se stává součástí struktury derivátu insulinu a stabilizuje tak sekundární strukturu v proteinu. Podle našich vědomostí se jedná o první deriváty nativního proteinu s triazolovým můstkem.
- 10 Jednou z výchozích surovin pro přípravu nových derivátů insulinu je DOI, který je připraven z vepřového insulinu tryptickým štěpením podle literatury (Young J. D. a Carpenter F. H. 1961, *J. Biol. Chem.* 236, 743, Bromer W. W. a Chance R. E. 1967, *Biochim. Biophys. Acta.* 133, 219, Žáková L., Barth T. a spoluautoři 2004, *Biochemistry* 43, 2323).
- 15 Lineární prekursori modifikovaných oktapeptidů 1-8 jsou připraveny podle literatury (Žáková L., Zyka D. a spoluautoři 2007, *J. Pept. Sci.* 13, 334) metodou syntézy na pevné fázi za použití 2-Cl-chlorotrytylové pryskyřice, komerčně dostupných N α -Fmoc-chráněných aminokyselin a kondenzačních činidel HBTU/DIPEA (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát/N,N-diisopropylethylamin) či DIC/HOBT (N,N-dicyklohexylkarbodiimid/N-hydroxybenzotriazol. Pro cyklizaci jsou do lineárních oktapeptidů v polohách B26, B27 a B29 či B30 umístěny aminokyseliny ((*R*)- či (*S*)-enantiomery) s postranním řetězcem obsahujícím azidoskupinu či terminální alkynovou skupinu. V případě azidoaminokyseliny obsahuje postranní řetězec
- 20

1 až 4 atomy uhlíku a v případě terminální alkyn obsahující aminokyseliny obsahuje její postranní řetězec 3 až 6 atomů uhlíku.

5 Intramolekulární cyklizace oktapeptidů za vzniku monomerních molekul je dosaženo Cu^I-katalyzovanou cykloadicí mezi alkynem a azidem za nízké koncentrace peptidu (asi 80×10^{-6} mol.l⁻¹) v prostředí t-butanol: H₂O (Isaad A. L., Papini A. M. a spoluautoři 2009, *J. Pept. Sci.* 15, 451).

Cyklické oktapeptidy jsou k DOI připojeny metodou enzymové semisyntézy za katalýzy trypsinem podle literatury (Žáková L., Zyka D. a spoluautoři 2007, *J. Pept. Sci.* 13, 334). Případně přítomná fenylacetylová chránicí skupina N^ε-aminoskupiny lysinu v poloze B29 je odstraněna enzymaticky pomocí penicilin G acylasy podle literatury (Žáková L., Zyka D. a spoluautoři 10 2007, *J. Pept. Sci.* 13, 334).

Předmětem technického řešení je i farmaceutický prostředek, obsahující deriváty insulínu obecného vzorce I.

Předmětem technického řešení je rovněž farmaceutický prostředek, obsahující deriváty insulínu obecného vzorce I, určený pro léčbu diabetu.

15 Kromě toho je předmětem tohoto technického řešení i farmaceutický prostředek, obsahující kromě derivátů insulínu obecného vzorce I také farmaceuticky přijatelné nosiče, excipienty a diluenty.

Farmaceuticky přijatelnými solemi se rozumí soli kationtů nebo aniontů spadajících do obecného vzorce I s příslušnými protionty, které jsou akceptovatelné pro použití ve farmacii. Příklady farmaceuticky přijatelných solí jsou soli alkalických kovů a alkalických zemin, amoniové soli, soli kovů, soli aniontů anorganických či organických kyselin, jako jsou například halogenidy, sírany, uhličitany, acetáty, sukcináty a mnohé další.

25 Solváty obsahují spolu s molekulou sloučeniny, spadající do obecného vzorce I, i molekuly vody či jiných látek, například rozpouštědel, které jsou přijatelné pro použití ve farmaceutických prostředcích.

Látky podle předkládaného technického řešení vykazují vysoké vazebné afinity vůči receptoru insulínu v membránách lidských IM-9 lymfocytů.

Dále tyto látky podle předkládaného technického řešení vykazují biologickou aktivitu in vivo v myších, která je dána poklesem hladiny glukózy v krvi.

30 Modularita struktury C-terminálních oktapeptidů B23-B30 derivátů insulínu a snadná syntéza spojováním těchto oktapeptidů s DOI umožňuje rozsáhlé strukturní variace sloučenin podle předkládaného technického řešení, které mohou vést k modulaci jejich biologické aktivity například ve smyslu rychlého nástupu účinku, prodlouženého účinku či zvýšené stability proti proteolytické degradaci.

35 Popis obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje schématicky struktury monomeru insulínu v T-stavu (vlevo) a v R-stavu (vpravo).

Obr. 2 znázorňuje předpokládaný odklon C-konce B-řetězce insulínu (tmavě šedá šipka) od centrální části molekuly.

40 Obr. 3 znázorňuje vazebné křivky lidského insulínu (●), derivátu insulínu 15 (▼) a derivátu insulínu 16 (■) na receptor insulínu v membránách lidských IM-9 lymfocytů. Na ose x je vyneseno log koncentrace testovaného insulínu, na ose y jeho vazebná afinita vzhledem k lidskému insulínu (v %).

45 Obr. 4 znázorňuje schopnost přirozeného insulínu (přerušovaná čára a ●, n = 10), derivátu insulínu 16 (plná čára a ■, n = 9) a insulinového derivátu Apidra® (Glulisine, tečkovaná čára a ▲, n

= 10) snižovat hladinu krevní glukózy v myších *in vivo*; n značí počet zvířat v pokusu. Na ose x je uveden čas (v minutách), na ose y koncentrace glukózy v krvi.

Obr. 5 znázorňuje porovnání uspořádání peptidových řetězců R6 monomeru lidského insulínu (1zj.pdb) a derivátu insulínu 15.

- 5 Obr. 6 detailní zobrazení nového typu ohybu v C-konci B-řetězce derivátu insulínu 15. Dvě vodíkové vazby mezi CO v pozici B27 a NH v pozici B30 a kyslíkovým atomem C-terminální COOH skupiny v pozici B30 jsou vyznačeny přerušovanými čarami.

Obr. 7 porovnání řetězců B23-B30 v nativním lidském insulínu a v derivátu insulínu 15. Pro zjednodušení jsou zobrazeny pouze postranní řetězce aminokyselin v polohách B24-B26.

10 Příklady provedení

Seznam uvedených zkratk:

	Bz	benzyl
	DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
	DCM	dichlormethan
15	DIC	N,N-dicyklohexylkarbodiimid
	DOI	des(B23-B30)oktapeptid-insulin
	DMF	N,N-dimethylformamid
	Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
	HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
20	HOBT	N-hydroxybenzotriazol
	NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
	TFE	2,2,2-trifluorethanol
	RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
	HR-ESI	hmotnostní spektroskopie o vysokém rozlišení, využívající elektronspray ionizaci
25	TPCK	p-tosyl-L-fenylalaninchlormetylketon
	HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan sulfonová kyselina
	EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
	BSA	hovězí sérový albumin
	MeOH	methanol
30	t-BuOH	t-butanol.

A) Příprava nových sloučenin

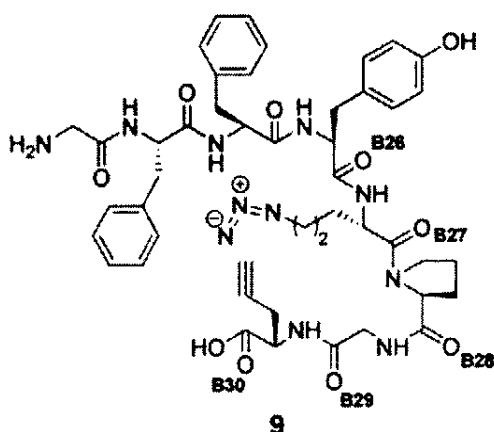
Obecná metoda přípravy lineárních prekursorů pro cyklické oktapeptidy

- Lineární oktapeptidy byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi. Jako polymerní nosič byla použita vysoce acidolabilní 2-Cl-tritylová pryskyřice firmy Merck-Novabiochem (obvykle v množství odpovídajícím 400×10^{-6} molu aktivních skupin). Manuální syntéza probíhala v plastové injekční stříkačce s fritou. Pro syntézu oktapeptidů byly použity aminokyseliny s primárními α -aminoskupinami chráněnými pomocí skupiny Fmoc a s chráněnými hydroxylovými skupinami postranních řetězců pomocí terciárního butylu (tBu). V případě použití lysinu v poloze B26 byl pro chránění N^ϵ -aminoskupiny použit fenylacetyl odštěpitelný enzymaticky za použití penicilin-G-acylasy (Fluka 76427) (Žáková L., Zýka D. a spoluautoři 2007, *J. Pept. Sci.* 13, 334). Navázání první aminokyseliny na pryskyřici bylo docíleno přidávkou aminokyseliny (1 ekvivalent) a DIPEA (3 ekvivalenty) k pryskyřici (1 ekvivalent) v DCM v celkovém objemu 1 ml. Reakce probíhala asi 2 hodiny za teploty místnosti. Poté byla pryskyřice s navázanou aminokyselinou ponechána cca 2 x 10 minut v 2 x 2 ml směsi DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1). Tím došlo k deaktivování a zablokování zbývajících nezreagovaných chloridových skupin pryskyřice. Chránicí skupina (Fmoc) primární α -aminoskupiny byla odstraněna opakovaným (5 a 20 min) působením 1 ml 30% (obj./obj.) roztoku piperidinu v DMF. Úspěšnost reakce byla hodnocena spektrofotometricky.

metricky měřením absorbance vzniklého dibenzofulven-piperidinového komplexu při vlnové délce 301 nm ($\epsilon = 7\,040\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Navázání další aminokyseliny bylo katalyzováno použitím kondenzačního činidla HBTU a DIPEA v 2 ml NMP. Reakce probíhala vždy nejméně 1 hodinu. Poměr látkových množství jednotlivých složek reakce (aminokyselina: HBTU:DIPEA) byl roven 3:3:6 vzhledem k aminoskupině přítomné na pryskyřici (1 ekvivalent). V alternativním případě, kdy byla směs ponechána reagovat přes noc, byla použita činidla HOBt a DIC v prostředí směsi rozpouštědel DCM a NMP v poměru 1:1 (1 ml). V tomto případě bylo látkové množství všech složek reakce ekvimolární. Kontrola úspěšného provedení reakce byla provedena Kaiserovým testem (Kaiser E., Colescott R. L. a spoluautoři 1970, *Anal. Biochem.* 34, 595) na přítomnost primárních aminoskupin. Podle výsledku testu se buď zopakovala reakce se stejnou aminokyselinou, nebo se přistoupilo k odstranění chránicí skupiny Fmoc poslední navázané aminokyseliny. Oktapeptid byl z polymerního nosiče pryskyřice odštěpen působením 5 ml směsi 20% (obj./obj.) TFE a 20% (obj./obj.) kyseliny octové v DCM po dobu 2 hodin. Následně byl produkt štěpení odpařen do sucha a zbylé chránicí skupiny (tBu) byly odstraněny působením 5 ml směsi 50% kyseliny trifluoroctové (TFA), 2% triisopropylsilanu a 2% H_2O v DCM po dobu hodiny, všechny procentní údaje jsou objemová procenta. Produkt byl poté opět odpařen do sucha, 3x promyt diethyletherem a rozpuštěn v 10% kyselině octové. Oktapeptid byl dále přečištěn pomocí IRP-HPLC, lyofilizován a identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie. V případě vysoké čistoty byl surový oktapeptid dále použit bez RP-HPLC purifikace.

Příklad 1

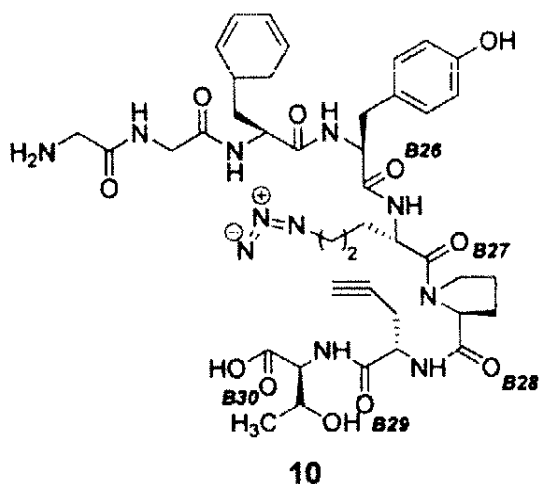
Oktapeptid 9



Lineární oktapeptid 9 jako prekursor cyklického oktapeptidu č. 12, kde $R_1 = \text{Bz}$, byl připraven metodou syntézy na pevné fázi za použití 400×10^{-6} molu 2-Cl-tritylové pryskyřice podle obecné metody popsané výše. Pro polohu B30 byla použita nepřírozená aminokyselina (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentynová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 00397) a pro polohu B27 (S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino)pentanová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 714291). Výtěžek po RP-HPLC purifikaci byl 21 % (77 mg, 84 μmol). HR-ESI $\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočteno 922,421, nalezeno 922,42.

Příklad 2

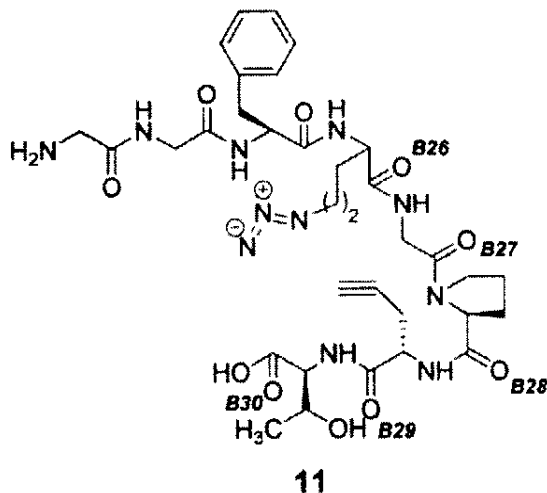
Oktapeptid 10



Lineární oktapeptid **10** jako prekursor cyklického oktapeptidu č. **13**, kde R₁ a R₂ = H, byl připraven metodou syntézy na pevné fázi za použití 400 x 10⁻⁶ molu 2-Cl-tritylové pryskyřice podle obecné metody popsané výše. Pro polohu B29 byla použita nepřírozená aminokyselina (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentynová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 00397) a pro polohu B27 (S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino)pentanová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 714291). Vzhledem k vysoké čistotě produktu nebyl oktapeptid preparován pomocí RP-HPLC. Výtěžek surového peptidu byl 66 % (231 mg, 264 μmol). **HR-ESI** C₄₆H₅₆N₁₁O₁₀ [M+H]⁺ vypočteno 876,401, nalezeno 876,40.

Příklad 3

Oktapeptid 11



15 Lineární oktapeptid **11** jako prekursor cyklického oktapeptidu č. **14**, kde R_1 a $R_2 = H$, byl připraven metodou syntézy na pevné fázi za použití 400 μ mol 2-Cl-tritylové pryskyřice podle obecné metody popsané výše. Pro polohu B29 byla použita nepřirozená aminokyselina (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentynová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 00397) a pro polohu B26 (S)-5-azido-2-(Fmoc-amino)pentanová kyselina (Sigma-Aldrich kat. číslo 714291). Výtěžek peptidu po RP-

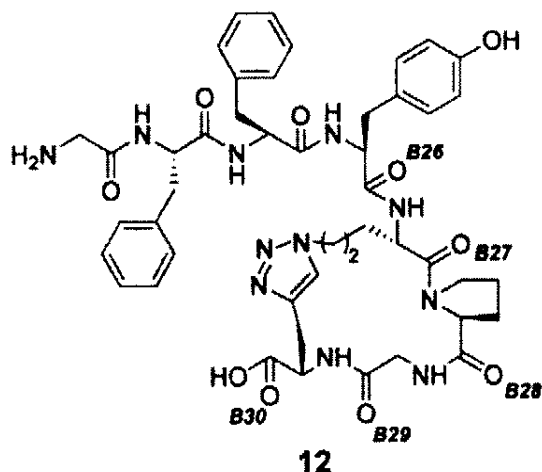
HPLC purifikaci byl 16 % (53 mg, 65 μ mol). **HR-ESI** $C_{46}H_{56}N_{11}O_{10}$ $[M+H]^+$ vypočteno 814,385, nalezeno 814,384.

Obecná metoda přípravy cyklických oktapeptidů

Lineární oktapeptid obecného vzorce **1-8** (50 mg, 1 molární ekvivalent) byl rozpuštěn v takovém objemu směsi voda:tBuOH (2:1) aby byla koncentrace peptidu 90×10^{-6} mol.l⁻¹. K roztoku byla přidána kyselina askorbová (14 ekvivalentů) a po jejím úplném rozpuštění $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (14 ekvivalentů) v takovém objemu směsi voda:tBuOH (2:1), aby byla výsledná koncentrace peptidu 80 μ mol.l⁻¹. Reakční směs byla po krátkém zamíchání ponechána stát při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl monitorován pomocí RP-HPLC před a 20 min po přidání $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Vznik cyklického produktu se projevil vymizením výchozího lineárního peptidu a vznikem nového produktu s kratším retenčním časem. Reakční směs (asi 600 ml) byla odpařena na rotační vakuové odparce do objemu asi 10 ml a peptid by odsolen na kolonce nosiče reverzní fáze (Chromabond® C-18, objem asi 12 ml). Odsolený oktapeptid byl dále přečištěn pomocí RP-HPLC, lyofilizován a identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie.

Příklad 4

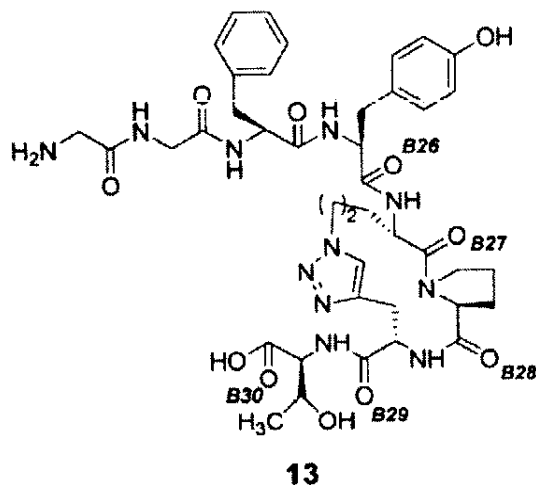
Oktapeptid **12**



Cyklický oktapeptid **12** (tj. oktapeptid spadající do obecného vzorce 7, kde $R_1 = Bz$ a $R_2 = H$) byl připraven z lineárního oktapeptidu **9** (50 mg, 0,054 mmol) podle obecného návodu uvedeného výše. Výtěžek po RP-HPLC purifikaci byl 50 % (25 mg, 0,027 mmol). **HR-ESI** $C_{46}H_{56}N_{11}O_{10}$ $[M+H]^+$ vypočteno 922,421, nalezeno 922,42.

Příklad 5

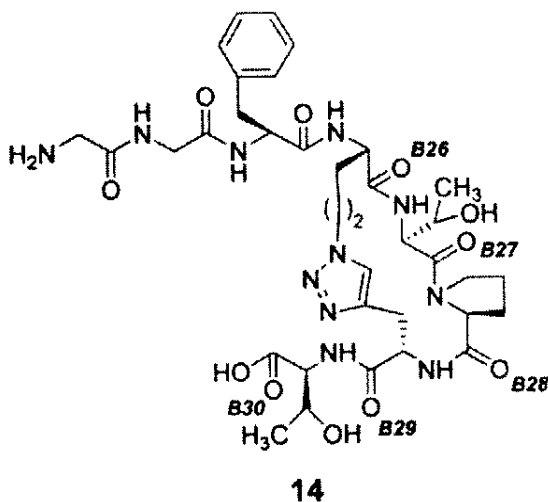
Oktapeptid 13



- 5 Cyklický oktapeptid **13** (tj. oktapeptid spadající do obecného vzorce **6**, kde R_1 a $R_2 = H$) byl připraven ze surového lineárního oktapeptidu **10** (150 mg, 0,171 mmol) podle obecného návodu uvedeného výše. Výtěžek po RP-HPLC purifikaci byl 39 % (58 mg, 0,066 mmol). **HR-ESI** $C_{46}H_{56}N_{11}O_{10} [M+H]^+$ vypočteno 876,401, nalezeno 876,40.

Příklad 6

Oktapeptid 14



10

Cyklický oktapeptid **14** (tj. oktapeptid spadající do obecného vzorce **2**, kde R_1 a $R_2 = H$) byl připraven ze surového lineárního oktapeptidu **11** (50 mg, 0,062 mmol) podle obecného návodu uvedeného výše. Výtěžek po RP-HPLC purifikaci byl 35 % (18 mg, 0,022 mmol). **HR-ESI** $C_{46}H_{56}N_{11}O_{10} [M+H]^+$ vypočteno 814,385, nalezeno 814,38.

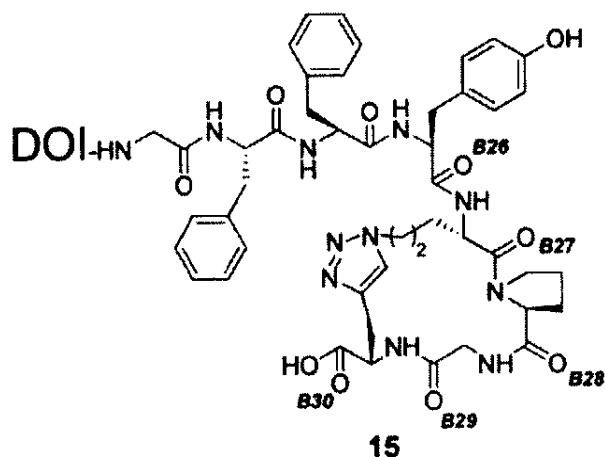
- 15 Obecná metoda přípravy derivátů insulinu s cyklickými strukturami v C-konci B-řetězce

Nové deriváty insulinu obecného vzorce **1** byly připraveny metodou enzymatické semisyntézy podle Žákové a kol. (Žáková I., Zyka D. a spoluautoři 2007, *J. Pept. Sci.* 13, 334). Cyklický oktapeptid (150×10^{-3} mol.l⁻¹) a DOI (30×10^{-3} mol.l⁻¹) byly rozpuštěny v směsi (celkový objem 200 µl) obsahující 55% (obj./obj.) DMF ve vodě, 20×10^{-3} mol.l⁻¹ octan vápenatý a 4,7 mg

TPCK trypsinu (Sigma-Aldrich, T-1426 či T-8802). pH roztoku bylo upraveno přidáním několika mikrolitrů N-methylmorpholinu na hodnotu 6,9 až 7,0. Reakční směs byla ponechána reagovat za míchání při laboratorní teplotě po dobu 4 až 24 hodin. Vznik produktů byl monitorován pomocí RP-HPLC. Reakce byla zastavena přidáním vychlazeného acetonu. Precipitát byl rozpuštěn v 10% (obj./obj.) kyselině octové ve vodě a produkt purifikován pomocí RP-HPLC. Identita produktu byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie na přístroji na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific.

Příklad 7

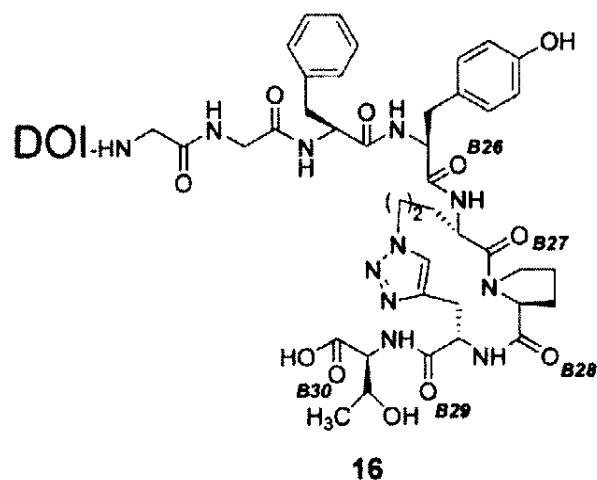
Derivát insulínu 15



Derivát insulínu **15** byl připraven za použití cyklického oktapeptidu **12** (27 mg) podle obecného postupu uvedeného výše. Výtěžek (vztažený k DOI jako k limitní složce reakce) po RP-HPLC purifikaci byl 14 % (4,9 mg, 0,85 μmol). HR-ESI $[M+H]^+$ vypočteno 5 766,58, nalezeno 5 766,58.

Příklad 8

Derivát insulínu 16

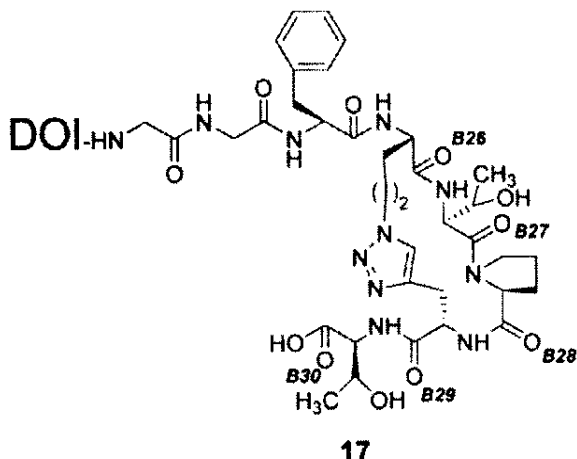


Derivát insulínu **16** byl připraven za použití cyklického oktapeptidu **13** (26 mg) podle obecného postupu uvedeného výše. Výtěžek (vztažený k DOI jako k limitní složce reakce) po RP-HPLC

purifikaci byl 14 % (4,9 mg, 0,86 μ mol). **HR-ESI** $[M+H]^+$ vypočteno 5 720,56, nalezeno 5 720,57.

Příklad 9

Derivát insulínu 17



5

Derivát insulínu 17 byl připraven za použití cyklického oktapeptidu 14 (18 mg) podle obecného postupu uvedeného výše. Výtěžek (vztahený k DOI jako k limitní složce reakce) po RP-HPLC purifikaci byl 17 % (4,4 mg, 0,78 μ mol). **HR-ESI** $[M+H]^+$ vypočteno 5 658,548, nalezeno 5 658,55.

10 B) Vazebná afinita derivátů insulínu

Principem testování vazebné afinity insulínových derivátů je kompetice derivátu s lidským insulinem, radioaktivně značeným na tyrosinu v pozici A14 pomocí isotopu 125 I (Perkin-Elmer, USA, 2200 Ci/mmol, $\tau = 60$ dní) o vazebné místo na insulinovém receptoru. Při testování byla použita metodika postupu podle De Meytse (De Meyts P. 1976, *Methods in Receptor Research*, M. Dekker, New York, 301). K testování vazebných afinit insulínových derivátů vůči receptoru insulínu *in vitro* byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese iso-

formy A insulinového receptoru. Buňky IM-9 byly pěstovány podle doporučeného postupu dodavatele (ATCC, Manassas, USA; LGC Standards, Polsko). Buňky rostly v podmínkách zvlhčené atmosféry s 5% obsahem CO_2 , při teplotě 37 °C, v komerčně dostupném médiu RPMI-1640 obsahujícím 10% fetální hovězí sérum (hmotn./obj.), 2×10^{-3} mol.l $^{-1}$ glutamin a 100 U/ml penicilinu/streptomycinu (všechny chemikálie od firmy Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA). Pro zajištění optimálních podmínek růstu byly buňky pasážovány 3x týdně. Buňky byly nejdříve spočítány a poté naředěny na koncentraci 2 miliony/ml.

Zásobní roztoky insulínu a derivátů byly připraveny v 0,1% kyselině octové. Koncentrace byly určeny měřením absorbance při 280 nm a extinkčních koeficientů (ϵ) 5 840 M $^{-1}$.cm $^{-1}$ pro lidský insulin a deriváty obsahující čtyři tyrosiny v molekule, respektive 4 560 M $^{-1}$.cm $^{-1}$ pro deriváty s pouze třemi tyrosiny. Ředěním vazebným pufrem (viz níže) byly následně připraveny roztoky o klesající koncentraci testovaného derivátu insulínu. V reakční směsi byly buňky inkubovány vždy s roztokem insulinového derivátu o příslušné naředěné koncentraci a o konstantním množství radioaktivně značeného insulínu (20 000 impulsů za minutu). Reakce probíhala po dobu 2,5 h, při teplotě 15 °C ve vazebném pufru o následujícím složení: 100×10^{-3} mol.l $^{-1}$ HEPES/NaOH pH 7,6; 100×10^{-3} mol.l $^{-1}$ NaCl, 5×10^{-3} mol.l $^{-1}$ KCl, $1,3 \times 10^{-3}$ mol.l $^{-1}$ MgSO $_4$, 1×10^{-3} mol.l $^{-1}$ EDTA, 10×10^{-3} mol.l $^{-1}$ glukóza, 15×10^{-3} mol.l $^{-1}$ octan sodný a 1% BSA (hmotn./obj.). Celkový reakční objem byl 500 μ l. Směs byla míchána každých 30 minut. Z každé

35

zkumavky byly vytvořeny duplikáty o objemu 200 μ l a reakce byla zastavena přidavkem 200 μ l vazebného pufru o teplotě 4 °C. Směs byla dále odstředována při 15 000 g po dobu 10 min, při 4 °C. Po odsátí supernatantu byla změřena radioaktivita pelety na γ -počítači. Získaná data byla vyhodnocena za použití modelu vazby do jednoho vazebného místa pomocí programu vytvořeného v aplikaci Excel a vyvinutého v laboratoři Pierre De Meytse (Groth A. V., Shymko R. M. 2008, Computer program: One-site model fitting), či za pomoci GraphPad Prism 5.0 za použití stejného modelu vazby do jednoho místa a určena byla hodnota disociační konstanty (K_d) derivátu či lidského insulínu vůči receptoru. Použitá koncentrace 125 I-radioaktivně značeného insulínu byla $0,01 \times 10^{-9}$ mol.l $^{-1}$. Jako K_d 125 I-značeného insulínu vůči receptoru bylo použita hodnota $0,3 \times 10^{-9}$ mol.l $^{-1}$.

Výsledky vazebné studie s deriváty insulínu 15-16 a lidským insulínem jsou uvedeny v Tabulce 1 a na Obrázku 3.

Tabulka 1

Hodnoty disociačních konstant (K_d) lidského insulínu a derivátů insulínu vůči receptoru insulínu v membránách lidských IM-9 lymfocytů. Relativní vazebná afinita derivátů je vyjádřena v % vůči lidskému insulínu (100 %) a definována jako (K_d lidského insulínu/ K_d derivátu insulínu) $\times$ 100. (n) je počet měření.

Látka	$K_d \pm \text{SEM}$ [$\times 10^{-9}$ mol.l $^{-1}$] (n)	Relativní vazebná afinita [%]
Lidský insulín	$0,369 \pm 0,031$ (5)	100
15	$0,364 \pm 0,056$ (4)	101,4
16	$0,176 \pm 0,016$ (4)	209,7

C) Schopnost derivátu insulínu 16 snižovat hladinu krevní glukózy u myši *in vivo*

Principem metody je měření hladiny krevní glukózy u myších samců, kterým bylo subkutánně (s.c.) podáno přesné množství insulínu či jeho derivátu. Samci myši kmene C57B1/6, staří 10 týdnů, dodaní firmou AnLab s.r.o. (Praha, Česká republika) byli chováni při teplotě 23 °C s denním cyklem 12 hodin světlo a 12 hodin tma (světlo od 6,00 hodin). Myši měly volný přístup k vodě a byly chovány na standardní dietě (ST-1 BERGMAN, Mlýn Kocanda, Jesenice, Česká republika). Veškeré *in vivo* experimenty byly konány v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Pět dní před experimentem byly myši odděleny samostatně do jednotlivých klecí a ráno před započítáním pokusu byly myši zváženy, byla jim odebrána potrava a voda ponechána *ad libidum*. Po 5 hodinách hladovění byla každé myši odstřižena špička ocasu a změřena hladina glukózy v krvi glukometrem (Glucocard X-meter od firmy Arkray Factory, Inc., Japonsko). Poté byl každé myši subkutánně aplikován lidský insulín, fyziologický roztok nebo derivát insulínu. Každou skupinu, které byl aplikován jeden druh látky, tvořilo 8 až 10 myší. Dávka insulínu/derivátu byla 0,75 U na 1 kg hmotnosti zvířete. Jedna jednotka insulínu či derivátu U je definována jako 6×10^{-9} molu látky. Dávka na jednotlivou myš byla spočítána z průměrné hmotnosti myši v pokusu a byla aplikována v s.c. objemu 100×10^{-6} litru fyziologického roztoku. Hladina glukózy v krvi byla následně měřena glukometrem v časech 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 a 150 minut od aplikace látky.

Výsledky *in vivo* pokusů s lidským insulínem, rychle působícím klinicky používaným derivátem Glulisine (Apidra) a derivátem insulínu 16 jsou znázorněny na Obr. 4. Z grafu plyne, že derivát insulínu 16 má stejně rychlý nástup účinku jako klinicky používaný derivát s rychlým nástupem účinku Glulisine (Apidra). Myší model použitý v tomto pokuse, na rozdíl od lidského, neumožňuje rozlišení rychlejšího nástupu derivátů ve srovnání s lidským insulínem.

D) Určení krystalové struktury derivátu insulínu 15

Derivát insulínu 15 byl rozpuštěn v 20 mmol.l⁻¹ HCl v koncentraci 9 mg/ml. Krystaly byly získány metodou „zavěšené kapky“ z roztoku získaného smícháním 1 ml roztoku derivátu 15 a 2 ml roztoku obsahujícího 0,6 mol.l⁻¹ Na₂SO₄, 0,3 mol.l⁻¹ Tris/HCl o pH 7,5, 0,6 x 10⁻³ mol.l⁻¹ acetát zinečnatý a 0,06% (w/v) fenol. Krystaly vyrostly během 3 až 4 týdnů a byly přiřazeny do skupiny P3₁ s rozměry prostorové buňky 6,1 nm, 6,1 nm a 8,2 nm, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$, a jedním R6 hexamerem derivátu 15 v asymetrické buňce. Krystaly derivátu 15 o velikosti asi 0,1 mm x 0,1 mm x 0,05 mm byly za pomoci kryosmyčky (Hampton Research, Velká Británie) přemístěny z krystalizačního roztoku do tekutého dusíku. Rentgenografická data byla získána na stanici ID23EH2 v ESRF v Grenoble (Francie) za použití detektoru mar225 CCD. Souhrn dat a statistických údajů o krystalu je v Tabulce 2.

Krystalová struktura byla vyřešena na základě modelu R6 hexameru lidského insulínu (struktura 1znj.pdb). Struktura byla dále upřesněna pomocí programů Refmac 5 (Murshudov G. N., Vagin A. A. a Dodson E. J. 1997, *Acta crystallogr.* D 53, 240) a CCP4 (Bailey S. 1994, *Acta Crystallogr.* D 50, 760). Model derivátu 15 byl vytvořen v programu COOT (Emsley P. a Cowtan K. 2004, *Acta Crystallogr.* D 60, 2126). Struktura derivátu insulínu 15 byla porovnána s jinými deriváty insulínu pomocí programu LSQKAB (Bailey S. 1994, *Acta Crystallogr.* D 50, 760) superpozicí C α atomů v polohách B9-B19.

Derivát 15 krystaloval pouze za přítomnosti fenolu jako R6 hexamer. Celková struktura R6 hexameru derivátu 15 se značně podobá struktuře R6 hexameru lidského insulínu (1znj.pdb/1mso.pdb) což se odráží v nízké rms odchylce (0,068 nm) mezi jejich vzájemnými atomy (Obr. 5).

Struktura monomeru derivátu 15 je odvozena ze struktury jeho R6 hexameru a je opět velmi podobná struktuře monomeru lidského insulínu odvozeného z jeho R6 hexameru (1mso.pdb) což se odráží v nízké odchylce (0,068 rms nm) mezi atomy těchto dvou oligomerů. Uspořádání a pozice atomů jejich hlavních peptidových řetězců je takřka shodná až po GlyB23.

Tabulka 2

Souhrn dat a statistických údajů o krystalu hexameru derivátu insulínu 15. Hodnoty v závorkách platí pro slupku s nejvyšším rozlišením

Sběr dat	
Paprsek	ESRF ID23EH2-mar225
Vlnová délka (nm)	0,087260
Prostorová grupa	P3 ₁
Rozměry buňky	
a, b, c (nm)	6,1; 6,1; 8,2
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (nm)	5,0-0,154 (0,157-0,154)
R_{sym}	0,068 (0,488)
<I / $\sigma(I)$>	21,6 (0,3)
Kompletnost (%)	100 (100)
Redundance	5,7 (5,7)
Wilsonův B faktor (nm²)	0,0152

Upřesňování	
Rozlišení (nm)	5,282-0,154
Počet reflexí	48163
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,1689/0,2104
Počet atomů	2949
Derivát	2559
Ligand/iont	16
Voda	374
<i>B</i> -faktory	
Derivát	20,59
Ligand/iont	12,83
Voda	31,739
Standardní odchylky (R.m.s.)	
Délky vazeb (nm)	0,0033
Vazebné úhly (°)	3,067
Ramachandranův diagram (%)	
Preferované/Povoleno/nepovoleno	99,25/0/0,75
Krystalizační podmínky	0.6 mol.l ⁻¹ Na ₂ SO ₄ , 0.3 mol.l ⁻¹ Tris pH 7.5, 0.6 x 10 ⁻³ mol.l ⁻¹ ZnAc, 0.06% (w/v) fenol
Kryoprotektant	-

Od této aminokyseliny se začínají obě struktury lišit přičemž vzdálenosti Cα atomů v pozicích B24, B25, B26, B27 a B28 v lidském insulinu a derivátu **15** jsou 0,067 nm, 0,137 nm, 0,120 nm, 0,309 nm a 0,260 nm. Důsledkem je, že řetězec B24-B28 derivátu **15** se vzdaluje od řetězce A o 0,07 až 0,30 nm ve srovnání s lidským insulinem. Díky přítomnosti triazolového můstku směřují aminokyseliny v pozicích B29 a B30 blíže k řetězci A. Následkem toho jsou aminokyseliny B29 a B30 derivátu **15** vklíněny mezi aminokyseliny B26-B28 a A1-A4. Celý konec B-řetězce (aminokyseliny B28-B30) je propojen s N-koncem A-řetězce (aminokyseliny A1-A3) systémem dobře uspořádaných molekul vody, který pomáhá stabilizovat strukturu této části derivátu **15**.

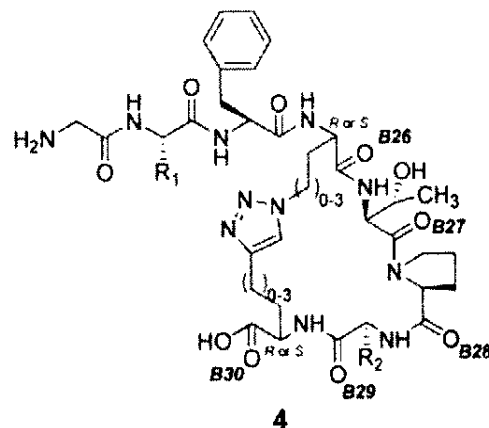
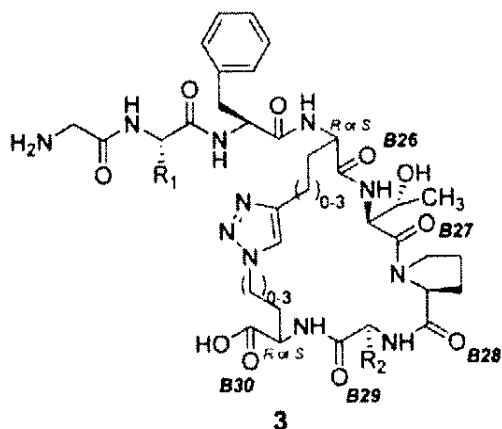
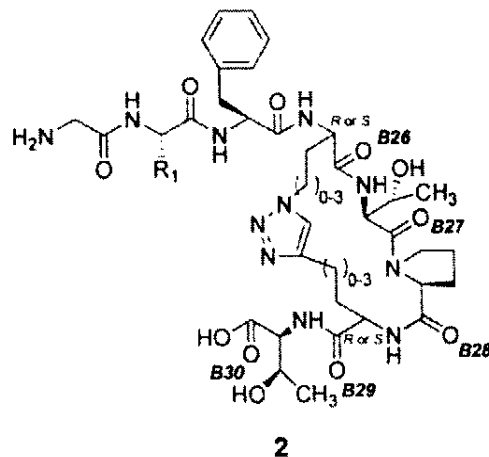
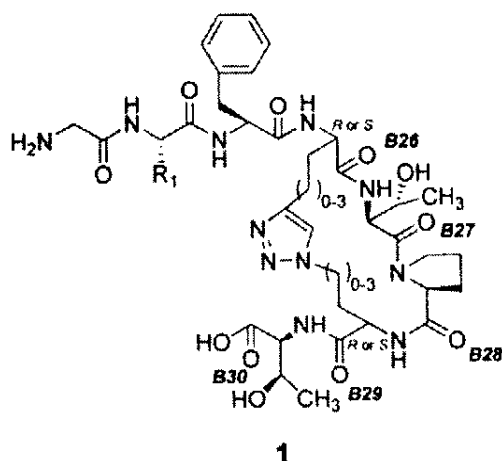
Triazolový můstek mezi pozicemi B27 a B30 má za důsledek vytvoření nového β-ohybu mezi těmito pozicemi. Skupina CO v pozici B27 vytváří vodíkovou vazbu (0,33 nm) s NH v pozici B30. Takto stabilizovaný β-ohyb má smíšený charakter typu I a typu VIII. Úhly φ a ψ pro pozice n+1 a n+3 v tomto β-ohybu jsou -56°, -43°, -149° a -163°. Stabilita ohybu je dále posílena vodíkovou vazbou mezi atomem kyslíku C-terminální COOH skupiny a NH skupinou v pozici B27 (Obr. 6). Tento nový typ β-ohybu v insulinu, nemá rozhodující vliv na konformaci postranních řetězců aminokyselin v pozicích B24-B26 (Obr. 7). Fenylový kruh PheB24 má stejnou pozici jako v lidském insulinu a ve vysoce aktivních derivátech insulin N-methylovaných v poloze B26 (Jiráček J., Žáková L. a spoluautoři 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 1966). OH skupina fenolického kruhu TyrB26 derivátu **15** je nicméně odkloněna o 0,102 nm od pozice též skupiny v lidském insulinu. Další větší změnou oproti lidskému insulinu je odklon Cα atomu v pozici B27 o 0,178 nm. Nejvíce je ve srovnání s lidským insulinem ovlivněna pozice fenylového kruhu v pozici B25 (Obr. 7), která se nejvíce blíží pozici PheB25 ve vysoce aktivních derivátech N-methylovaných v pozici B26 (Jiráček J., Žáková L. a spoluautoři 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*

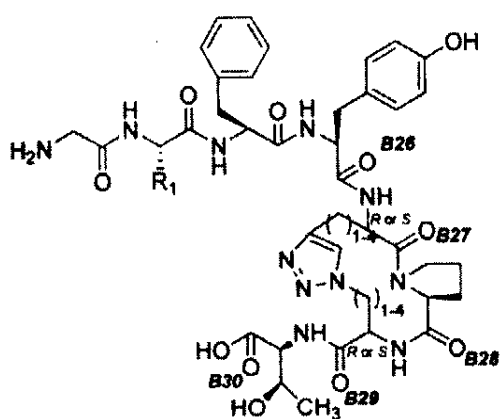
107, 1966). Změna pozice fenylu v pozici B25 je také doprovázena absencí vodíkové vazby mezi B25NH a A19CO, která má zásadní negativní vliv na dimerizační schopnosti insulinu (Antolíková E., Žáková L. a spoluautoři 2011, *J. Biol. Chem.* 286, 36968).

NÁROKY NA OCHRANU

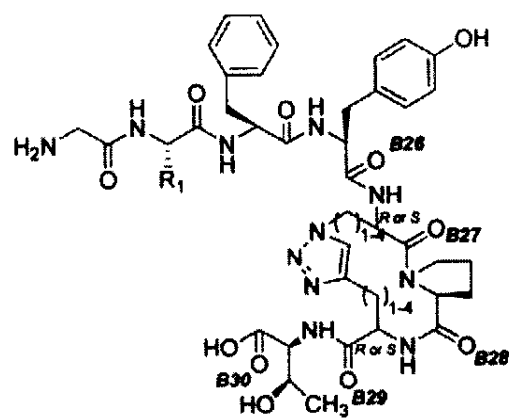
- 5 1. Deriváty insulinu s cyklickou strukturou v C-konci B-řetězce, mající obecný vzorec I,
DOI-X (I)

kde DOI je des(B23-B30)oktapeptid-insulin, tedy lidský insulin bez C-terminálního oktapeptidu B23-B30, a X je modifikovaný oktapeptid zvolený ze skupiny, zahrnující následující oktapeptidy typů 1 až 8, kde substituent R_1 je H či benzyl a substituent R_2 je H či $(CH_2)_3-NH_2$, připojené k des(B23-B30)oktapeptid-insulinu amidovou vazbou mezi karboxylovou skupinou C-terminálního ArgB22 v molekule des(B23-B30)oktapeptid-insulinu a aminoskupinou N-terminálního GlyB23 v molekulách oktapeptidů 1-8

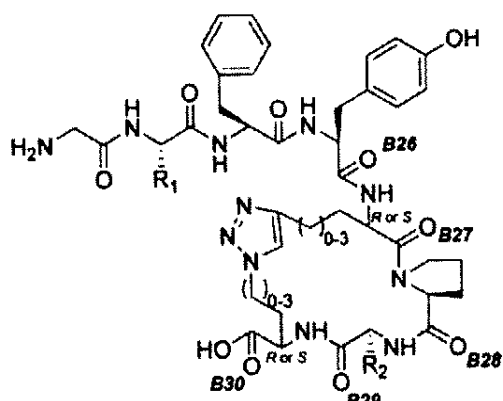




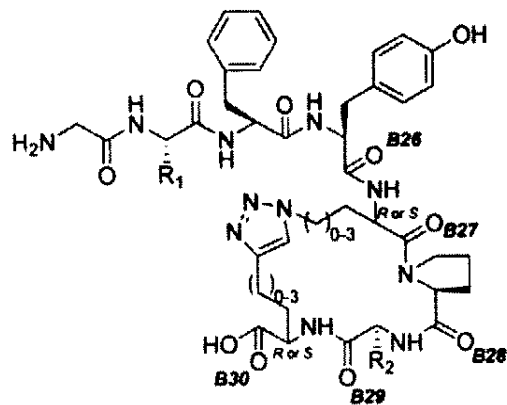
5



6



7



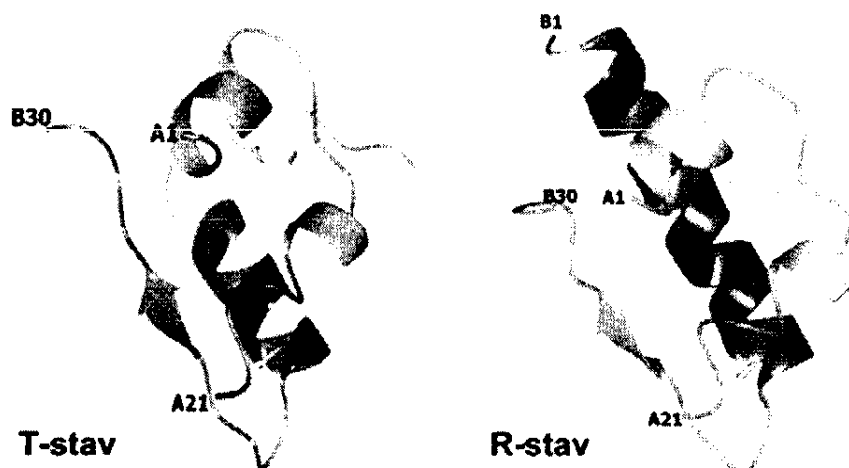
8

2. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje deriváty insulinu mající obecný vzorec I popsáný v nároku 1.
- 5 3. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje deriváty insulinu mající obecný vzorec I opsáný v nároku 1, určený pro léčbu diabetu.
4. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje kromě derivátů insulinu majících obecný vzorec I popsáný v nároku 1, také farmaceuticky přijatelné nosiče, excipienty a diluenty.

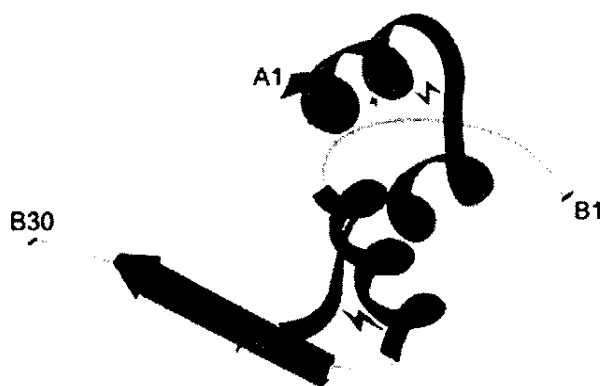
10

3 výkresy

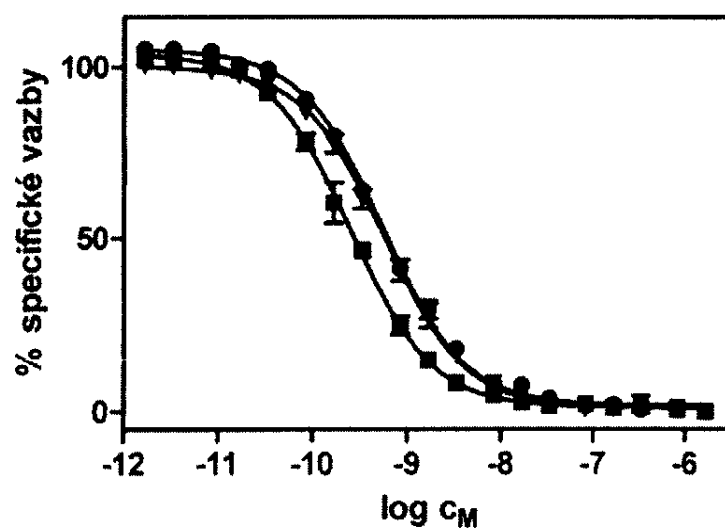
Obr. 1



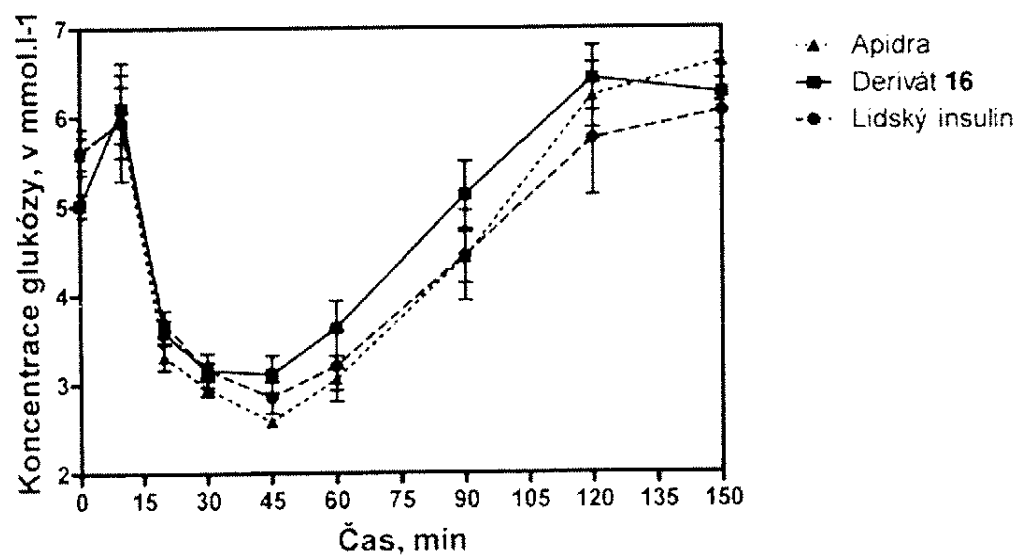
Obr.2



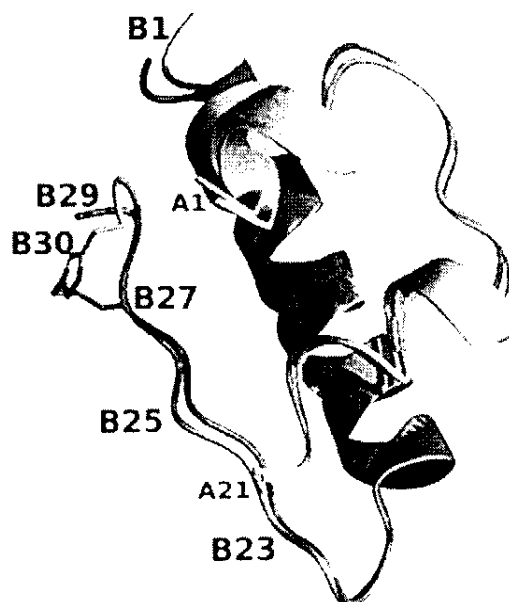
Obr. 3



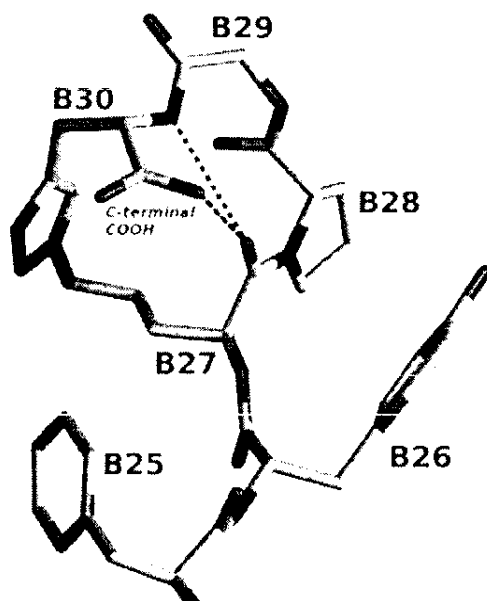
Obr. 4



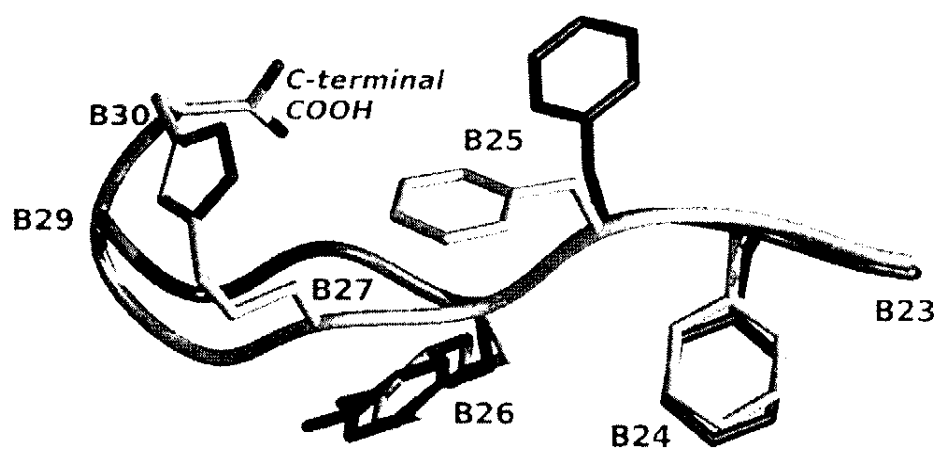
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Konec dokumentu