

**A61K 38/22** (2006.01)  
**C07K 14/575** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-364**  
(22) Přihlášeno: **27.05.2014**  
(40) Zveřejněno: **16.12.2015**  
**(Věstník č. 50/2015)**  
(47) Uděleno: **22.04.2022**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **01.06.2022**  
**(Věstník č. 22/2022)**

(56) Relevantní dokumenty:  
Sun B et al. Blockade of PrRP attenuates MPTP-induced toxicity in mice. Peptides, 2009, 30(7),1267-75.  
CZ 2012-476; WO 03/024472; WO 2006/030956.

(73) Majitel patentu:  
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,  
Praha 6, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Lenka Maletínská, CSc., Praha 6, CZ  
Ing. Blanka Železná, CSc., Praha 6, CZ  
Ing. Miroslava Blechová, Praha 10, CZ  
Mgr. Andrea Špolcová, České Budějovice, CZ  
Bc. Barbora Mikulášková, Mníšek pod Brdy, CZ

(74) Zástupce:  
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo  
náměstí 2, 166 10 Praha 6

(54) Název vynálezu:  
**Lipidované peptidy jako neuroprotektiva**

(57) Anotace:  
Neuropeptidy PrRP31, PrRP20, obsahující C14 a C16 mastnou kyselinu a jejich analogy, jejichž C-koncová sekvence IRPVGRF-NH<sub>2</sub> může být obměněna v místě fenalalaninu; mastná kyselina je v případě PrRP31 či jeho analogu navázána v poloze 1 nebo 11, u PrRP20 či jeho analogu v poloze 1 nebo 7; vazba zahrnuje amidovou vazbu mezi aminokyselinou, mající nejméně jednu volnou NH<sub>2</sub> skupinu, a karboxylovou skupinou mastné kyseliny a alternativně zahrnuje i vazbu prostřednictvím raménka X<sup>-2</sup>, kterým je  $\gamma$ -glutamová kyselina, pro použití po periferním podání k léčbě a prevenci chorobných stavů, kterými jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, zhoršení kognice, které není demencí, mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy.

## Lipidované peptidy jako neuroprotektiva

### Oblast techniky

5

Nové analogy peptidu uvolňujícího prolaktin představují neuroprotektivní látky k perifernímu podání pro léčbu a prevenci chorob a stavů, kterými jsou Alzheimerova nemoc (AN), Parkinsonova choroba (PCh), zhoršení kognice, které není demencí (CIND), mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy.

10

### Dosavadní stav techniky

15 AN je závažné neurodegenerativní onemocnění mozku, postihující zejména jedince staršího věku. Nejdříve se nemoc projevuje ztrátou paměti, poruchami učení, změnami v chování, zhoršenou orientací v čase a prostoru, ztrátou autonomních funkcí, až nakonec dochází k úplné demenci. Průměrně 9 let po stanovení diagnózy nastává smrt (Giordano et al., 2007; Gong and Iqbal, 2008).

20 Z neuropatologického hlediska dochází při AN ke dvěma patologickým změnám v mozku – vznikají intracelulární neurofibrilární spleti hyperfosforylovaného proteinu Tau a extracelulární senilní plaky (Planel et al., 2007; Gonzalez-Burgos et al., 2009).

25 Bylo prokázáno, že v mozku pacientů s AN je porušena inzulínová signalizace související s inzulínovou rezistencí a rovněž že pacienti s diabetes mellitus 2. typu (T2DM) mají vyšší riziko rozvoje AN, dále bylo také pozorováno snížené využití glukózy v mozku a snížený energetický metabolismus (Liu et al., 2011).

30 V posledním desetiletí 20. století byla objevena řada látek, které zásadně ovlivňují regulaci energetického metabolismu, a mezi nimi i neuropeptid PrRP (prolactin-releasing peptide, peptid uvolňující prolaktin, PrRP) (Hinuma et al., 1998).

35 V organismu se vyskytují dvě formy PrRP, obsahující 31 aminokyselin (PrRP/1-31/; PrRP31), anebo 20 aminokyselin (PrRP/12-31/; PrRP20) (Hinuma et al., 1998).

40 PrRP je tvořen v neuronech v mnoha částech mozku. Nejvíce se nachází v prodloužené míše (v *nucleus tractus solitarius* a ve ventrolaterálním retikulárním jádru) a v hypotalamu (v paraventriculárním jádru a dorsomediálním jádru) (Maruyama et al., 1999; Lee et al., 2000), méně v předním i zadním laloku hypofýzy a v amygdale (Maruyama et al., 1999).

45 V periferních tkáních se PrRP nachází ve dřeni nadledvin, varlatech, slinivce břišní a v tenkém i tlustém střevě (Nieminen et al., 2000; Fujiwara et al., 2005).

Jeho receptor GPR10 je široce zastoupen v celém mozku. Neurony produkující receptor GPR10 byly objeveny v předním laloku hypofýzy, v amygdale, v hypotalamu i v mozkovém kmeni a v prodloužené míše. V periférii se GPR10 nachází v dřeni nadledvin a významné množství PrRP mRNA bylo nalezeno v také potkaní i lidské slinivce (Fujii et al., 1999, Nieminen et al., 2000) (Maruyama et al., 1999; Lee et al., 2000; Nieminen et al., 2000; Fujiwara et al., 2005).

50 Prvním popsaným biologickým účinkem PrRP byla stimulace uvolňování prolaktinu z tumorových hypofyzárních buněk RC-4B/C (Hinuma et al., 1998). Díky objevu PrRP v hypotalamických jádrech, která jsou důležitá pro udržování energetické rovnováhy, se o PrRP začalo uvažovat též jako o faktoru ovlivňujícím příjem potravy a tedy i hmotnosti (Lawrence et

al., 2000). Výskyt PrRP a jeho receptoru v dalších oblastech mozku pak naznačil, že PrRP zřejmě působí i při regulaci odpovědi na stres a na bolestivé podněty (Onaká et al., 2010).

5 Anorexigenní efekt PrRP31 se u potkanů projevilo po jeho injektování do třetí mozkové komory, jejíž přední stěna a dno jsou tvořeny hypotalamem. Kromě snížení příjmu potravy i hmotnosti (Lawrence et al., 2000; Lawrence et al., 2004) bylo zjištěno, že při negativní energetické bilanci dochází ke snížení transkripce genu pro PrRP. K redukci hmotnosti přispívá i pozorované zvýšení tělesné teploty a spotřeby kyslíku, což jsou nepřímé důkazy zvýšeného energetického výdeje. Vyšší je rovněž produkce mRNA pro tzv. uncoupling protein 1 (UCP-1) v hnědé tukové tkáni, což taktéž svědčí pro zvýšený energetický výdej (Ellacott et al., 2003).

15 U PrRP knock-out myši (tzv. PrRP KO), které trpí hyperfagií zapříčiňující obezitu, byla zjištěna i související vyšší hladina leptinu v krvi, později také glukózová intolerance a inzulinová rezistence (Takayanagi et al., 2008; Mochiduki et al., 2010). Rovněž myši s nefunkčním receptorem GPR10 vykazují vyšší příjem potravy a obezitu, přičemž u samic je obezita vyšší než u samců díky sníženému energetickému výdeji. S obezitou se pojí taktéž zvýšená hladina leptinu, cholesterolu a glukózová intolerance (Gu et al., 2004; Bjursell et al., 2007).

20 Pokud se týká strukturních požadavků, pro správnou funkci PrRP je nezbytně nutná přítomnost argininu v pozici 30. Pro vazbu PrRP k receptoru GPR10 je dále důležitá pozice 31, vyžadující přítomnost fenylalaninu či jiné aminokyseliny s aromatickou skupinou navázanou k minimálně jedné skupině CH<sub>2</sub> postranního řetězce aminokyseliny (Boyle et al., 2005).

25 Popsány byly modifikace přirozeného neuropeptidů PrRP20, jejichž biologická aktivita *in vitro* je srovnatelná sPrRP31 (Langmead et al., 2000; Maixnerová et al., 2011). Kromě vazebné afinity k receptoru GPR10, srovnatelné s hodnotami pro PrRP31 i PrRP20 (Maletínská et al., 2011), zvyšovaly tyto analogy uvolňování prolaktinu z tumorových hypofyzárních buněk RC-4B/C do média. Po ICV podání způsobily analogy PrRP20 statisticky významné snížení příjmu potravy u hladových myši (Maletínská et al., 2011).

30 Následně byly připraveny neuropeptidy PrRP31 a PrRP20 i jejich analogy s obměněným aminokyselinovým složením, lipidizované mastnou kyselinou (např. myristoylem či palmitoylem) na *N*-konci peptidu. Oba typy neuropeptidů s rozdílnou délkou řetězce i jejich analogy se vážaly s vysokou afinitou k receptoru pro PrRP v podmínkách *in vitro* a vykazovaly velmi signifikantní snížení příjmu potravy u hladových myši v závislosti na dávce nejen po centrálním, ale také po periferním (subkutánním, SC) podání. Lipidizace neuropeptidů ovlivňujících příjem potravy, které působí v hypotalamu a mozковém kmeni, je novou možností, jak využít účinek těchto peptidů po periferním injekčním podání (WO 2014/009808).

40 Následně byl účinek zmíněných neuropeptidů a jejich analogů po periferním podání potvrzen po lipidizování nikoliv na *N*-konci, ale ve střední části peptidového řetězce, a to jak po navázání mastné kyseliny prostřednictvím amidické vazby, tak za použití raménka (US provis. 61/927944).

45 Neuropeptidy PrRP31 i PrRP20 a jejich analogy lipidované jak na *N*-konci, tak uprostřed řetězce, prokázaly také zvýšenou vazebnou afinitu k endogennímu receptoru GPR10 v podmínkách *in vitro* (WO 2014/009808, US provis. 61/927944).

50 V poslední době bylo popsáno použití lipidovaných neuropeptidů PrRP31 i PrRP20 a jejich analogů k léčbě pacientů s diagnostikovaným metabolickým syndromem (nebo náchylností k němu), charakterizovaným zvýšenou hladinou glukózy v krvi. Bylo prokázáno, že lipidizované formy PrRP20, PrRP31 a jejich analogů kromě anorexigenního účinku snižují hladiny glukózy v krvi a tento účinek byl doložen i při jejich periferním podání (US provis. 61/927944). Hyperglykémie je spojena s inzulinovou rezistencí a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob, přičemž může předcházet T2DM (Barr E. L. et al., Circulation 116 (2): 151-7, 2007) (Barr et al., 2007).

- Mnohé studie ukazují, že T2DM má mnoho společných znaků s AN. Obě onemocnění jsou spojené s věkem, vyskytují se u nich vysoké hladiny cholesterolu, zvýšený oxidativní stres, zánětlivé reakce, metabolické poruchy, agregace amyloidního beta peptidu (A $\beta$ ), hyperaktivita glykogen syntasy kinasy 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) a deregulace fosforylace proteinů buněčné signalizace (Schrijvers et al., 2010; Takeda et al., 2010). T2DM dokonce zvyšuje riziko vzniku AN, takže by mohla být nahlížena nejen jako neurologická, nýbrž také jako neuroendokrinní choroba (de la Monte and Wands, 2008).
- Pro zmírnění příznaků AN se už nyní používají například inhibitory acetylcholinesterasy, které zvyšují koncentraci acetylcholinu v mozku a tím zlepšují kognitivní funkce. Dalším léčivem je memantin, který je inhibitororem *N*-methyl-D-aspartát receptoru a přispívá ke zlepšení paměti (Gong and Iqbal, 2008).
- Vzhledem k popsané časté incidenci inzulinové rezistence u pacientů s AN se k léčbě nedá využít samotný inzulin. Předpokládá se však, že při léčbě by mohly účinkovat látky, zvyšující citlivost k inzulinu, jako je např. metformin (Kickstein et al., 2010; Li et al., 2012), či inzulinové sekretagogy, ke kterým patří glukagonu podobný peptid (GLP-1) (Long-Smith et al., 2013; Holscher, 2014), žaludeční inhibiční peptid (gastric inhibitory peptide, GIP) a jejich analogy (Faivre and Holscher, 2013).

Zcela nově bylo zjištěno, že neuroprotektivní účinek vykazují i mastnou kyselinou lipidované neuropeptidy PrRP31 i PrRP20 a jejich analogy s obměněným aminokyselinovým složením.

25

#### Podstata vynálezu

- Předmětem vynálezu jsou lipidované neuropeptidy PrRP31, PrRP20, obsahující C14 a C16 mastnou kyselinu, a jejich analogy, jejichž C-koncovou sekvencí IRPVGRF-NH $_2$  lze obměnit v místě fenylalaninu; mastná kyselina je v případě PrRP31 či jeho analogu navázána v poloze 1 nebo 11, u PrRP20 či jeho analogu v poloze 1 nebo 7; vazba zahrnuje amidovou vazbu mezi aminokyselinou, mající nejméně jednu volnou NH $_2$  skupinu, a karboxylovou skupinou mastné kyseliny a alternativně zahrnuje i vazbu prostřednictvím raménka X $^2$ , kterým je  $\gamma$ -glutamová kyselina;
- pro použití k léčbě a prevenci chorob, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, zhoršení kognice, které není demencí, mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy, a to po periferním podání.

- V sekvenci C-koncového heptapeptidu může být koncový fenylalanin nahrazen dichlorfenylalaninem, pentafluorfenylalaninem, nitrofenylalaninem, naftylalaninem nebo tetrachlorfenylalaninem.

- Předmětem vynálezu jsou i lipidované neuropeptidy PrRP31, PrRP20 obecných vzorců (*N*-palm)SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH $_2$  (5), (palm)TPDINPKWYASRGIRPVGRF-NH $_2$  (6), SRTHRHSMEIK(palm)TPDrNPAWYASRGIRPVGRF-NH $_2$  (7), TPDINPK(palm)WASRGIRPVGRF-NH $_2$  (8), kde palm je kyselina hexadekanová,

- 50 a vzorců

SRTHRHSMEIKTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH $_2$  (9), a X $^2$ (palm)

TPDINPKWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (10);  
X<sup>2</sup>(palm)

5 kde palm je kyselina hexadekanová a X<sup>2</sup> je  $\gamma$ -glutamová kyselina,  
pro použití k léčbě a prevenci chorob, kterými jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova  
choroba, zhoršení kognice, které není demencí, mozkové trauma a neurodegenerativní změny a  
poruchy, a to po periferním podání.

10 Dalším předmětem vynálezu je použití výše uvedených lipidovaných analogů peptidu  
uvolňujícího prolaktin pro výrobu léčiva pro periferní podání k léčení a prevenci chorob, kterými  
jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, zhoršení kognice, které není demencí,  
mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy.

15 V průběhu AN dochází ke dvěma patologickým změnám neuronů v mozku – vznikají  
nerozpuštěné extracelulární plaky A $\beta$  a dochází k hyperfosforylaci intracelulárního  
cytoskeletálního proteinu tau (Planěl et al., 2007; Gonzalez-Burgos et al., 2009).

20 Mnohé studie popisují vztah mezi DM2T a AN. Inzulínová rezistence, hyperinzulinémie a  
hyperglykémie jsou tři hlavní charakteristiky DM2T, které zvyšují riziko vzniku AN (Schrijvers  
et al., 2010; Takeda et al., 2010; Liu et al., 2011).

V předkládaném vynálezu byl vzhledem k blízkému vztahu mezi AN a DM2T pro ověření  
neuroprotektivního účinku testovaných látek využit myší model obezity a inzulínové rezistence.  
25 Je to model, u kterého je obezita navozena glutamátem sodným (monosodium glutamate, MSG  
model).

Testované látky (zvyšující citlivost k inzulínu) byly hodnoceny vzhledem k jejich účinku na  
inzulínovou signální kaskádu a hyperfosforylaci proteinu tau v mozku (v oblasti hipokampu)  
30 MSG myší před a po aplikaci.

U MSG myší, oproti stejně starým kontrolám, docházelo s rostoucím věkem k rozvoji inzulínové  
rezistence v mozku. Snížená aktivace inzulínové signální kaskády vedla, díky snížené  
fosforylaci na Ser9, ke zvýšení aktivity glykogensyntetázy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), která je jednou z  
35 hlavních kináz fosforylujících protein Tau. Byla pozorována zvýšená fosforylace proteinu Tau na  
epitopech Ser396 a Thr231. Po 14 dnech aplikace látek zvyšující citlivost k inzulínu, kterými  
byly kyselinou palmitovou lipidovaný analog PrRP31, palmitovou kyselinou lipidovaný analog  
PrRP31 s dichlorofenylalaninem v pozici 31a pro srovnání i analog GLP-1 liraglutid, došlo k  
vyšší aktivaci inzulínové signální kaskády, k vyšší fosforylaci GSK-3 $\beta$  na Ser9 a ke snížení  
40 hyperfosforylace proteinu Tau na epitopech Ser396, Thr212aThr231.

Testované analogy PrRP, lipidované palmitovou kyselinou, zvýšily po 14 dnech injekce  
inzulínovou signální kaskádu v mozku 6 měsíčních MSG myší, které jsou inzulín rezistentní.  
45 Aplikací těchto látek se rovněž podařilo snížit hyperfosforylaci proteinu Tau na různých  
epitopech, přičemž hyperfosforylace proteinu Tau je jednou z hlavních patologických změn v  
mozku u pacientů s AN.

#### Objasnění výkresů

50 Obrázek 1 znázorňuje čas potřebný k nalezení únikové plošinky v testu Morrisova vodního  
bludiště (MWM). Pokus byl prováděn 5 dní, každý den čtyřikrát, vždy z jiného startovacího  
místa u MSG myší a jejich kontrol. Data jsou průměr  $\pm$  SEM, n = 10 myší na skupinu. Statistická

analýza byla prováděna dvoucestnou ANOVA s následným Bonferroniho post hoc testem. Signifikance je \*  $P < 0,05$  a \*\*  $P < 0,01$ .

5 Obrázek 2 znázorňuje porovnání fosforylace GSK-3 $\beta$  na Ser9 a fosforylace proteinu Tau na Ser396 a Thr231 v hipokampech 2 a 6 měsíců starých MSG myši a jejich kontrol. Míra fosforylace v hipokampu byla stanovena pomocí metody Western blot (WB). Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 7$  až 10 myši na skupinu. Statistická analýza byla prováděna jednocestnou ANOVA s následným Bonferroniho post hoc testem. Signifikance je \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$ .

10 Obrázek 3 zobrazuje fosforylaci inzulínové signalizační kaskády v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši po 14 dnech injikování liraglutidu a palmitovaného lidského PrRP31. Liraglutid (0,2 mg/kg) a palmitovaný lidský PrRP31 (5 mg/kg) byly subkutánně injikovány dvakrát denně, vždy ráno a večer. Jako kontroly sloužily myši, kterým byl injikován fyziologický roztok. Míra fosforylace byla stanovena pomocí metody WB. Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 10$  myši na skupinu. Statistická analýza byla prováděna jednocestnou ANOVA s následným Bonferroniho post hoc testem. Signifikance je \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$ .

20 Obrázek 4 zobrazuje fosforylaci proteinu Tau na různých epitopech v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši po 14 dnech injikování liraglutidu a palmitovaného lidského PrRP31. Liraglutid (0,2 mg/kg) a palmitovaný lidský PrRP31 (5 mg/kg) byly subkutánně injikovány dvakrát denně, vždy ráno a večer. Jako kontroly sloužily myši, kterým byl injikován fyziologický roztok. Míra fosforylace byla stanovena pomocí metody WB. Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 10$  myši na skupinu. Statistická analýza byla prováděna jednocestnou ANOVA s následným Bonferroniho post hoc testem. Signifikance je \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$ .

25 Obrázek 5 zobrazuje fosforylaci proteinu Tau na různých epitopech v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši po 14 dnech injikování palmitovaného PrRP31 s dichlorofenylalaninem v pozici 31. Palmitovaný PrRP31 s dichlorofenylalaninem v pozici 31 (5 mg/kg) byl subkutánně injikován dvakrát denně, vždy ráno a večer. Jako kontroly sloužily myši, kterým byl injikován fyziologický roztok. Míra fosforylace byla stanovena pomocí metody WB. Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 10$  myši na skupinu. Statistická analýza byla prováděna Studentovým t-testem. Signifikance je \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$ .

35 Obrázek 6 předkládá imunohistochemickou analýzu zobrazující míru fosforylace proteinu Tau v hipokampální oblasti CA1 u 6 měsíců starých MSG myši a jejich kontrol a její ovlivnění po 14 denním injikováním liraglutidu a palmitovaného PrRP31. Liraglutid (0,2 mg/kg) a palmitovaný lidský PrRP31 (5 mg/kg) byly subkutánně injikovány dvakrát denně, vždy ráno a večer. Jako kontroly sloužily myši, kterým byl injikován fyziologický roztok. Fosforylace byla stanovena dvojitým fluorescenčním barvením pomocí imunohistochemické analýzy.

40

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Seznam použitých zkratk

45

ANOVA – analýza rozptylu

ARC – nucleus arcuatus

GSK-3 $\beta$  – glykogen syntáza kináza – 3 $\beta$

MWM – Morrisovo vodní bludiště

50

PDK-1 – fosfoinositid dependentní kináza – 1

SDS – dodecylsulfát sodný

SEM – střední chyba průměru

WB – Western blot

Akt – proteinkináza B

## Testované látky

5 Na základě strukturně-aktivitních studií byly navrženy analogy potkaního (identický s myším) a lidského PrRP31 a PrRP20, lipidované na aminoskupině nebo postranní skupině aminokyseliny pomocí C14 a C16 mastné kyseliny. Methionin v poloze 8 byl vPrRP31 byl případně nahrazen stabilnějším norleucinem.

10 Lipidizované analogy peptidu PrRP31 a PrRP 20 byly syntetizovány metodou syntézy na pevné fázi na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, na oddělení peptidové syntézy dle postupu Maixnerové a kol. (Maletínská et al., 2007).

Peptid liraglutid byl komerčně získán od firmy Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Dánsko).

## 15 Zvířata

Pro výzkum neuroprotektivních účinků se používají zvířecí modely rezistentní k inzulinu, jako je myší model obezity MSG. Tyto myši mají nedostatek růstového hormonu, atrofii hypofýzy a optických nervů, a jsou neplodné (Olney, 1969). Vyznačují se zmenšenou oblastí *nucleus arcuatus* (ARC), rozšířením třetí mozkové komory a zúženým *eminencia mediana*. Celkový počet buněk v ARC u MSG myši je o 75 % nižší než u kontrolních myši, avšak v ostatních oblastech mozku MSG myši není počet buněk významně neovlivněn (Elefteriou et al., 2003).

25 U MSG myši dochází k nerovnováze mezi příjmem potravy a výdejem energie, což vede k hypofágii a ukládání tuků, oproti kontrolám mají až osmkrát více bílého tuku (Maletínská et al., 2006). Vykazují zvýšené hladiny leptinu a glukózy v krvi a jsou inzulin rezistentní (Maletínská et al., 2006).

## MSG myši

30 Myši samci kmene NMRI (Harlan, Itálie) byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů akademie věd v Krči při teplotě  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  a měli volný přístup k potravě i k pití. Rytmus světlo/tma byl nastaven na 12/12 hodin, začátek světla v 6:00 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.). Samci sloužili jako kontroly, a byli krmeni standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3,4 kcal/g.

40 K navození obezity byl novorozeným myším NMRI SC injikován glutamát sodný (Sigma, St. Louis, USA) v dávce 4 mg/g hmotnosti myši denně od 2. do 5. postnatálního dne. Tyto myši měly stejnou standardní dietu jako kontroly. Jejich potrava a hmotnost byly váženy vždy ráno jednou denně. Skupiny MSG a NMRI myši použitých pro stanovení byly ve věku 2 a 6 měsíců.

## Injikování peptidu zvyšujících citlivost k inzulinu 6 měsíců starým MSG myším

45 Skupinám MSG myši (n=10), byly subkutánně injikovány peptidy liraglutid v dávce 0,2 mg/kg, nebo kyselinou palmitovou lipidizovaný analog PrRP31 v dávce 5 mg/kg, či kyselinou palmitovou lipidovaný PrRP31 s dichlorofenylalaninem v pozici 31 rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, vždy 2x denně, ráno a večer, po dobu 14 dní. Kontrolním zvířatům, jak MSG myším (n=10), tak i NMRI myším (n=10), byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok (vždy v objemu 0,2 ml/myš).

## Test prostorové paměti 6 měsíců starých MSG myši

5 Test prostorové paměti v Morrisově vodním bludišti (MWM) byl prováděn dle metodiky uvedené v článku Vorheese a Williamse (Vorhees and Williams, 2006) u šest měsíců starých MSG myši a jejich kontrol.

## Odběr tkání pro další stanovení

10 MSG myši byly ponechány 15 hodin bez potravy, s volným přístupem k vodě. Myši byly zvaženy, byla jim změřena glukóza pomocí glukometru, poté byly dekapitovány a na ledu jim byly odebrány mozky, které byly rozříznuty mezi hemisférami. Pro imunohistochemické analýzy byla polovina mozku fixována v roztoku 4% paraformaldehydu na 24 hodin. Poté byla vložena do roztoku 70% ethanolu, aby došlo k dehydrataci tkáně. Pro metodu western blot (WB) byl z  
15 druhé poloviny mozku odebrán hipokampus, který byl uložen do vychlazeného lyzačního pufru ( $62,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 6,8 s přídavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Tritonu X-100 Complete,  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaF,  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), zhomogenizován, 10 minut sonikován a uchováván při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dále byla odebrána krev a připravena plasma, která byla skladována při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Myšim byl odebrán a zvážen hnědý tuk, bílá tuková tkáň (white adipose tissue, WAT),  
20 játra, slezina a slinivka břišní. Orgány byly uchovávány v tekutém dusíku při  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Detekce proteinů inzulinové signální kaskády a hyperfosforylace proteinu Tau pomocí metody western blot (WB)

25 U zlyzovaných hipokampů byly stanoveny bílkoviny pomocí BCA kitu (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), následně byly lyzáty naředěny vzorkovým pufrům ( $62,5 \text{ mmol/l}$  Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol,  $50 \text{ mmol/l}$  NaF a  $1 \text{ mmol/l}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) do finální koncentrace  $1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

30 Metoda WB i následné vyhodnocení byly prováděny dle metodiky Nagelové a spol. (Nagelová et al., 2014). Seznam detekovaných proteinů s příslušným ředěním daných protilátek je uveden níže v tabulce 1.



Tabulka 1

Protilátka	Výrobce	Ředění
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo -Akt (Thr308)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti celkové Akt	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo -GSK-3 $\beta$ (Ser9)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti GSK-3 $\beta$	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo -PDK1 (ser241)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí monoklonální protilátka proti PDK1	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pS <sup>396</sup> ]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:10 000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pT231]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Králičí polyklonální protilátka proti Tau [pT212]	Invitrogen Grand Island, NY, USA	1:1000 5% BSA TBS/tween-20
Anti-Tau Cter	dar od Dr. M.-C.Galas, Inserm, Lille, Francie	1:10 000 5% mléko TBS/tween-20
Myši monoklonální protilátka proti Tau1 (Ser195,198,199,202)	Millipore, Billerica, MA, USA	1:10 000 5% mléko TBS/tween-20
Myši monoklonální protilátka proti aktinu	Sigma, St. Louis, MO, USA	1:10 000 5% mléko TBS/tween-20

5

Detekce hyperfosforylace proteinu Tau pomocí imunohistochemické analýzy

Pro ověření výsledků hyperfosforylace proteinu Tau byla využita imunohistochemická analýza. Mozkové řezy byly připraveny metodou zalití do parafinu v laboratoři INSERM Lilie, ve Francii. Na mikrotomu byly připraveny řezy o tloušťce 10  $\mu$ m. Imunohistochemické analýzy byly prováděny dle metodiky uvedené v článku Violet a spol. (Violet et al., 2014).

10

Statistické vyhodnocení výsledků

15 K vyhodnocení metabolických parametrů myších modelů MSG, byla použita metoda jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem v programu GraphPad (San Diego, CA, USA).

Pro statistické vyhodnocení stanovení fosforylace proteinů v hipokampech byla použita jednocestná ANOVA s následným Dunnetovým testem v programu GraphPad či Studentův t-test. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$ SEM.

20

Výsledky:

MWM MSG myši 6 měsíců starých

25

MSG myším a kontrolním myším byl měřen čas, za který našly únikovou plošinku v plavacím prostoru pomocí záchytných bodů. Pokus byl každý den opakován 4x a byl prováděn po dobu 5

dní. Z obrázku 1 je patrné, že u MSG myši byl čas potřebný k nalezení únikové plošinky v testu MWM signifikantně delší než u kontrol.

5 Porovnání signalizace inzulínové kaskády a množství fosforylovaného proteinu tau v hipokampech 2 a 6 měsíců starých MSG myši a jejich kontrol

Signalizace inzulínové kaskády a množství proteinu tau bylo detekováno pomocí metody WB v hipokampech MSG myši a jejich kontrol NMRI ve věku 2 a 6 měsíců.

10 Měřena byla fosforylovaná GSK-3 $\beta$  na Ser9. Jak je patrné z obrázku 2A, fosforylace této kinasy byla nižší u MSG myši oproti kontrolám již ve věku dvou měsíců, a dále se snižovala s narůstajícím věkem. Snížená fosforylace GSK-3 $\beta$  na Ser9 zřejmě zapříčinila u 6 měsíců starých MSG myši zvýšenou fosforylací proteinu tau na Ser396 a také na Thr231, což ukazují grafy na obr. 2B a 2C. MSG myši ve věku 6 měsíců tak byly potvrzeny jako vhodný model pro výzkum látek zvyšujících citlivost inzulínu.

Signalizace inzulínové kaskády v hipokampech u 6 měsíců starých MSG myši po 14 denním injikování lipidizovaného palmitovaného analogu PrRP31 a liraglutidu

20 Jak je patrné z obrázku 3, docházelo v hipokampech MSG myši, kterým byl čtrnáct dní podáván kyselinou palmitovou lipidovaný analog PrRP31 nebo liraglutid, k aktivaci inzulínové signalizační kaskády. Liraglutid významně zvýšil fosforylací PDK-1, p-Akt (Thr308) a p-GSK-3 $\beta$  (Ser9); u posledních dvou jmenovaných kináz došlo k ještě vyšší fosforylaci po podání PrRP31 lipidovaného kyselinou palmitovou.

25 Ovlivnění fosforylace proteinu tau v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši po 14 denním injikování lipidizovaného palmitovaného analogu PrRP31 a liraglutidu

30 Ovlivnění fosforylace proteinu tau bylo detekováno v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši metodou WB. Ve shodě s předchozími výsledky bylo prokázáno, že zvýšení fosforylace GSK-30 na Ser9 vyvolalo snížení fosforylace proteinu tau na Ser396, Thr231 a také Thr212. Z grafů na obrázku 4A, 4B a 4C je patrné, že docházelo ke statisticky významnému snížení fosforylace proteinu tau po podání jak lipidizovaného palmitovaného analogu PrRP31, tak i po podání liraglutidu. Dále byla detekována protilátka proti nefosforylovanému proteinu tau (Tau). Rozdíly v množství nefosforylovaného proteinu tau po podání PrRP31 a liraglutidu nebyly signifikantní (obr. 4D), ač podání prvé z uvedených látek mělo zřetelně větší účinek.

40 Ovlivnění fosforylace GSK-3 $\beta$  a proteinu tau na Thr231 v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši po 14 denním injikování lipidizovaného palmitovaného analogu PrRP31 s dichlorofenylalaninem v pozici 31

45 Fosforylace GSK-3 $\beta$  na Ser9 i fosforylace proteinu tau na Thr231 byla detekována v hipokampech 6 měsíců starých MSG myši metodou WB. Jak je patrné z obrázku 5, bylo prokázáno, že po 14 denním podávání látky zvyšující citlivost k inzulínu došlo ke zvýšení fosforylace GSK-3 $\beta$  na Ser9, což zřejmě dále vyvolalo snížení fosforylace Tau na Thr231.

Imunohistochemické fluorescenční dvojité barvení hipokampální oblasti CA1 u 6 měsíců starých MSG myši po 14 denním injikování lipidizovaného palmitovaného analogu PrRP31 a liraglutidu

50 Imunohistochemická analýza sloužila jako doplňková metoda k WB. Jak je patrné z obrázku 6, došlo u MSG myši injikovaných fyziologickým roztokem ke zvýšení fosforylace proteinu Tau na epitopech Thr212 a Ser202/Thr205 oproti stejně starým kontrolám NMRI. Zvýšená fosforylace se projevila silnějším fluorescenčním zářením při osvětlení rezu laserem o stejné intenzitě.

Po 14 denním injikování lipidizovaného palmitovaného PrRP31 a liraglutidu docházelo v oblasti CA1 k poklesu fosforylace, která se projevila zeslabením signálu při osvětlení laserem o stejné intenzitě.

5

### Průmyslová využitelnost

Nové analogy peptidu uvolňujícího prolaktin představují neuroprotektivní látky k perifernímu podání pro léčbu a prevenci chorob a stavů, jako je Alzheimerova nemoc (AN), Parkinsonova choroba (PCh), zhoršení kognice, které není demencí (CIND), mozkového traumatu a neurodegenerativních změn a poruch.

### Citovaná literatura

15 Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, Cameron AJ, Dwyer T, Taylor HR, Tonkin AM. Wong TY, McNeil J a Shaw JE (2007), *Circulation* 116:151-157.

Bjursell M, Lenneras M, Goransson M, Elmgren A Bohlooly YM (2007), *Biochem Biophys Res Commun* 363:633-638. Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J a Travers S  
20 (2005), *J Pept Sci* 11:161-165.

de la Monte SM a Wands JR (2008), *Journal of diabetes science and technology* 2:1101-1113.

Eleftheriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D a Karsenty G (2003), *Endocrinology* 144:3842-  
25 3847.

Ellacott K, Lawrence C, Pritchard L a Luckman S (2003), *Am J Physiol Regul Integr Comp P/Vs* 0/285:R1005-1010.

30 Faivre E a Holscher C (2013), *Alzheimers Dis* 35:267-283.

Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T a Inoue K (2005), *Regul Pept* 126:97-102.

Giordano V, Peluso G, Iannuccelli M, Benatti P, Nicolai R a Calvani M (2007), *Neurochem  
35 Res* 32:555-567.

Gong CX a Iqbal K (2008), *Current medicina! chemistry* 15:2321-2328.

Gonzalez-Burgos I, Velazquez-Zamora DA a Beas-Zarate C (2009), *International journal of  
40 developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental  
Neuroscience* 27:741-745.

Gu W, Geddes BJ, Zhang C, Foley KP a Stricker-Krongrad A (2004), *JMol Neurosci* 22:93-103.

45 Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H a Fujino M (1998), *Nature* 393:272-276.

Holscher C (2014), *J Endocrinol* 221 :T31-41.

50

Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, Williamson R, Fuchs M, Kohler A, Glossmann H, Schneider R, Sutherland C a Schweiger S (2010), *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21830-21835.

- Langmead C, Szekeres P, Chambers J, Ratcliffe S, Jones D, Hirst W, Price G a Herdon H (2000), *BrJPharmacol* 131:683-688.
- 5 Lawrence C, Celsi F, Brennand J a Luckman S (2000), *Nat Neurosci* 3:645-646.
- Lawrence C, Liu Y, Stock M a Luckman S (2004), *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R101-107.
- 10 Lee Y, Yang SP, Soares MJ a Voogt JL (2000), *Brain Res Bull* 51:171-176.
- Li J, Deng J, Sheng W a Zuo Z (2012), *Pharmacol Biochem Behav* 101:564-574.
- Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K a Gong CX (201), *J. Pathol* 225:54-62.
- 15 Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, Holscher C a O'Neill C (2013), *Neuromolecular Med* 15:102-114.
- Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Řezáčova M, Železná B a Maletínská L (2011), *Peptides* 32:811-817.
- 20 Maletínská L, Maixnerová J, Matýskova R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, Slaninová J a Železná B (2007), *Eur J Pharmacol* 559:109-114.
- Maletínská L, Špolcová A, Maixnerová J, Blechová M a Železná B (2011), *Peptides* 32:1887-1892.
- 25 Maletínská L, Torna RS, Pirnik Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M a Železná B (2006), *Regul Pept* 136:58-63.
- 30 Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M a Inoue K (1999), *Endocrinology* 140:2326-2333.
- Mochiduki A, Takeda T, Kaga S a Inoue K (2010), *JNeuroendocrinol* 22:576-584.
- 35 Nagelová V, Pirnik Z, Železná B a Maletínská L (2014), *Brain Res* 1547:16-24.
- Nieminen ML, Brandt A, Pietila P a Panula P (2000), *Peptides* 21:1695-1701.
- Olney JW (1969), *Science* 164:719-721.
- 40 Onaka T, Takayanagi Y a Leng G (2010), *Trends Endocrinol Metab* 21:287-293.
- Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, Yu WH, Luchsinger JA, Wadzinski B, Duff KE a Takashima A (2007), *JNeurosci* 27:13635-13648.
- 45 Schrijvers EM, Witteman JC, Sijbrands EJ, Hofman A, Koudstaal PJ a Breteler MM (2010), *Neurology* 75:1982-1987.
- Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G a Onaka T (2008), *J Clin Invest* 118:4014-4024.
- 50 Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kuřinami H, Shinohara M, Rakugi H a Morishita R (2010), *Prox Natl Acad Sci USA* 107:7036-7041.

Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultán A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nesslany F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buee L a Galas MC (2014), *Frontiers in cellular neuroscience* 8:84.

Vorhees CV a Williams MT (2006), *Natureprotocols* 1:848-858.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Lipidované analogy peptidu uvolňujícího prolaktin obecných vzorců:

(X)SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (1),

(X)SRAHQHSMETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (2),

(X)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (3),

(X)TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (4),

kde X = X<sup>1</sup> nebo X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>; X<sup>1</sup> je tetradekanová nebo hexadekanová kyselina, navázaná u vzorců (1) a (2) v poloze 1 nebo 11 a u vzorců (3) a (4) v poloze 1 peptidového řetězce amidovou vazbou mezi volnou NH<sub>2</sub> skupinou aminokyseliny a karboxylovou skupinou mastné kyseliny nebo prostřednictvím raménka X<sup>2</sup>, jímž je g-glutamová kyselina, přičemž koncový fenylalanin může být nahrazen dichlorfenylalaninem, pentafluorfenylalaninem, nitrofenylalaninem, naftylalaninem nebo tetrachlorfenylalaninem,

dále vzorců

*N*-palm)SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (5),

(palm)TPDINPKWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (6),

SRTHRHSMEIK(palm)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (7),

TPDINPK(palm)WYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (8),

kde palm je kyselina hexadekanová,

a vzorců

SRTHRHSMEIKTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (9), a

X<sup>2</sup>(palm)

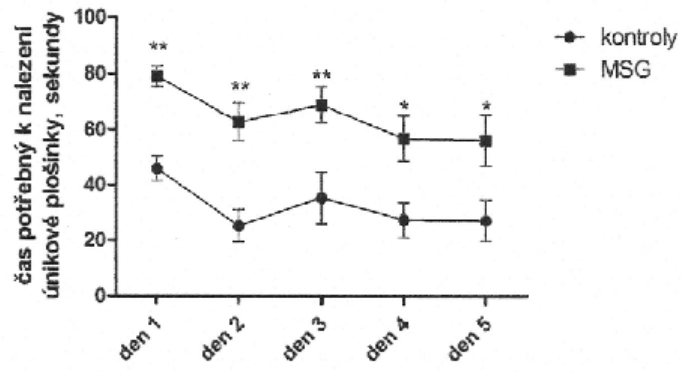
TPDINPKWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub> (10);

X<sup>2</sup>(palm)

kde palm je kyselina hexadekanová a X<sup>2</sup> je g-glutamová kyselina, pro použití k léčbě a prevenci chorob, kterými jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, zhoršení kognice, které není demencí, mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy, a to po periferním podání.

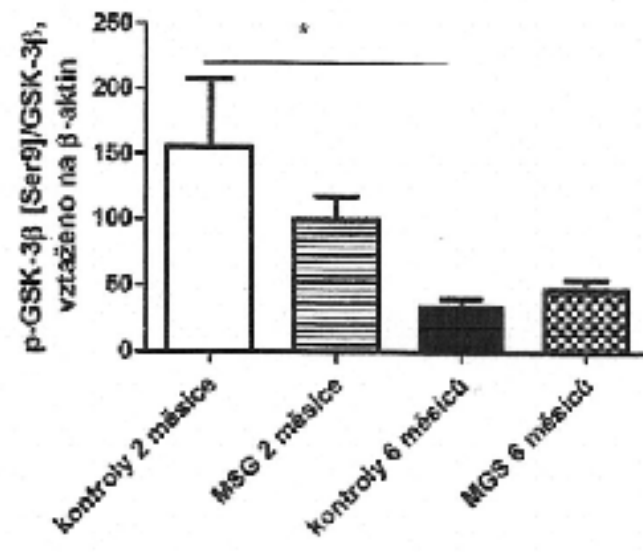
2. Použití lipidovaných analogů peptidu uvolňujícího prolaktin podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro periferní podání k léčbě a prevenci chorob, kterými jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, zhoršení kognice, které není demencí, mozkové trauma a neurodegenerativní změny a poruchy.

15 výkresů



Obr. 1

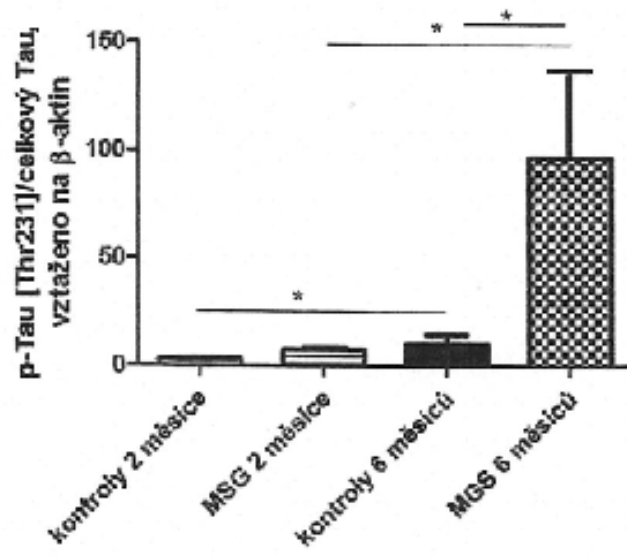
A



Obr. 2A

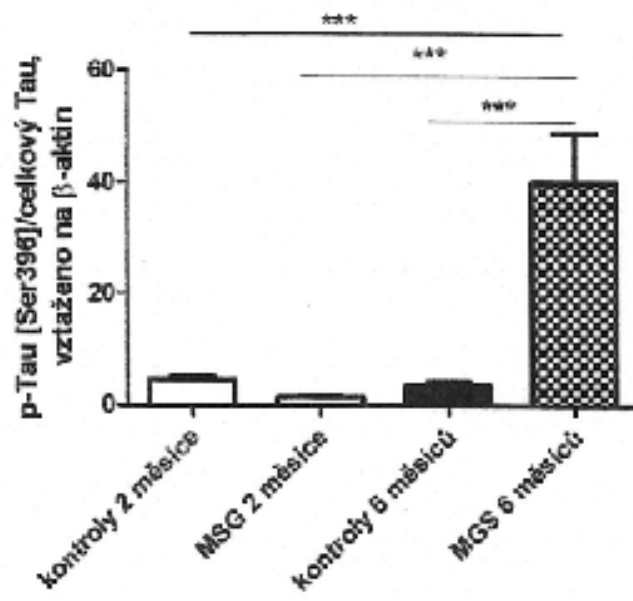


B



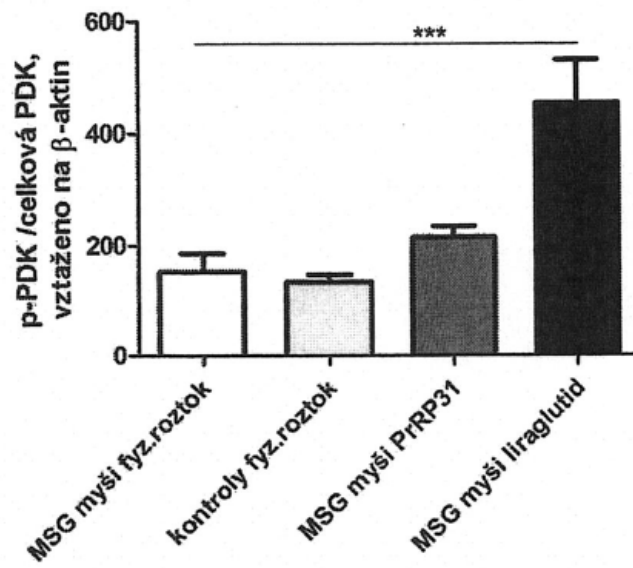
Obr. 2B

C

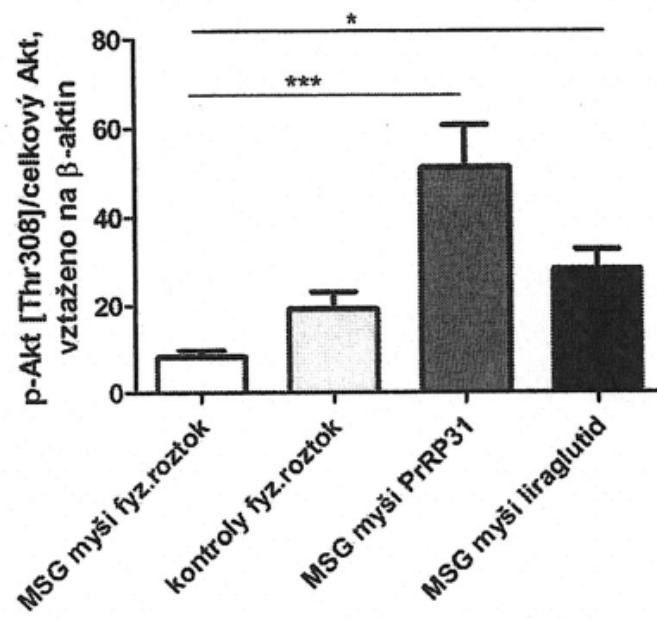


Obr. 2C

A

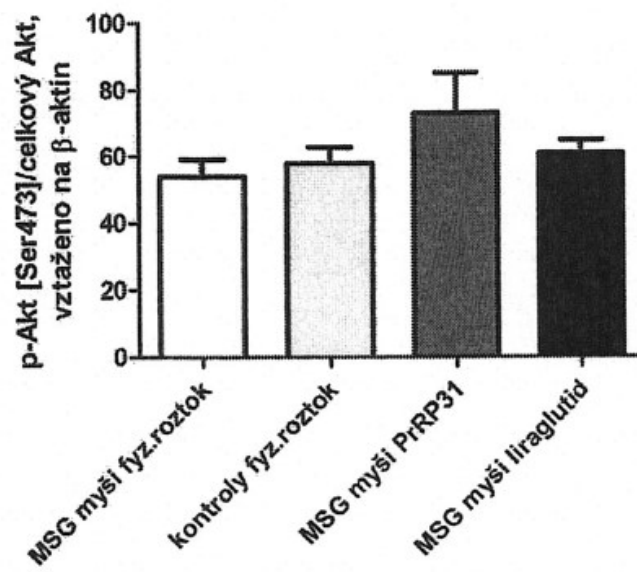


Obr. 3A

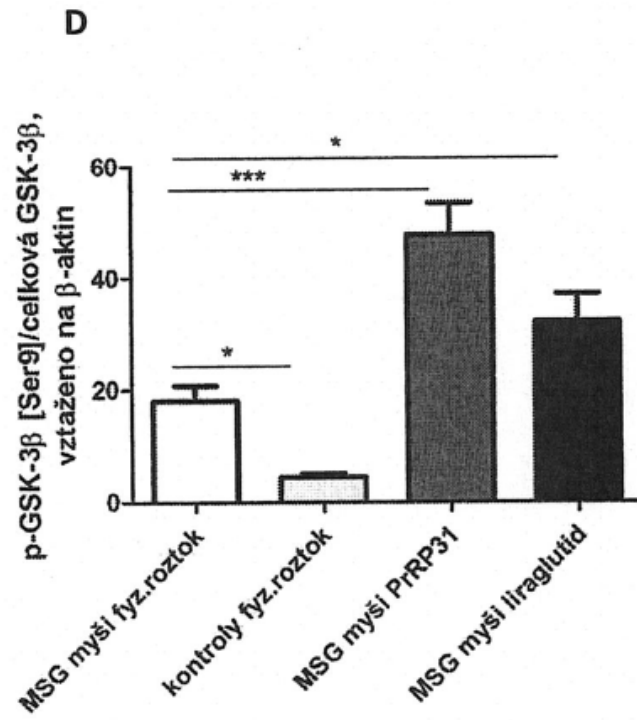
**B**

Obr. 3B

C

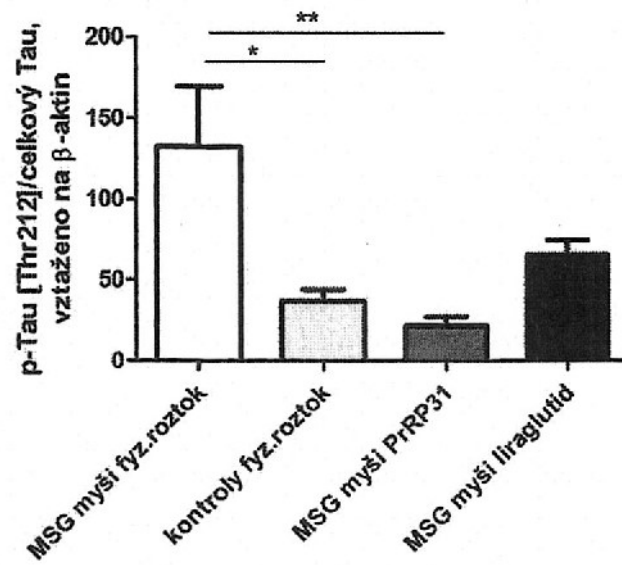


Obr. 3C

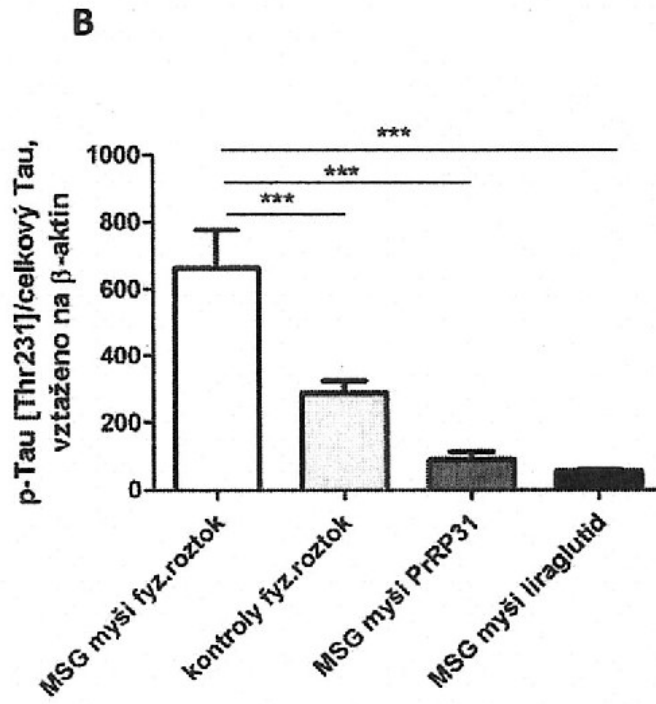


Obr. 3D

A



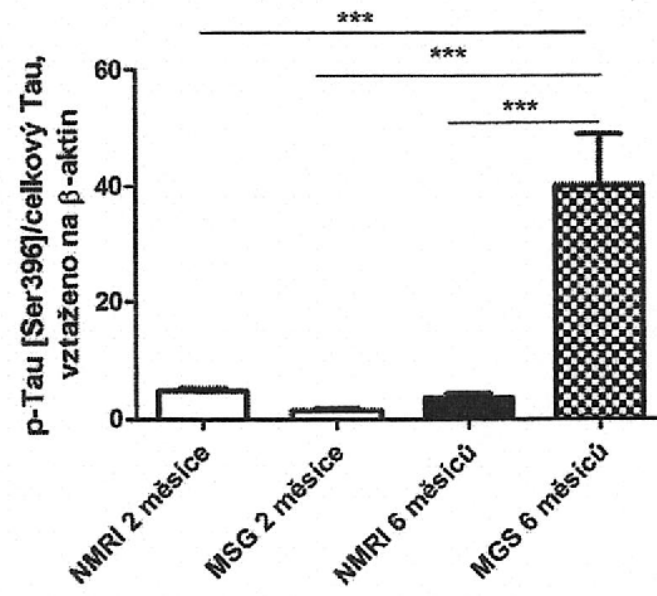
Obr. 4A



Obr. 4B

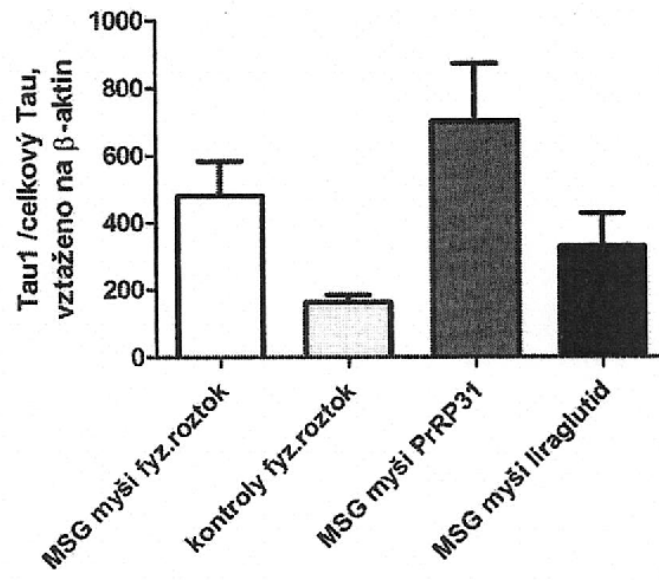


C



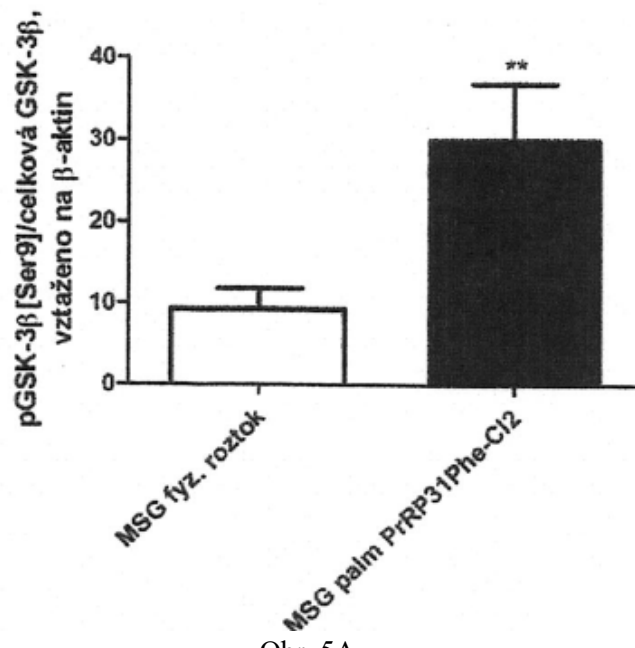
Obr. 4C

D

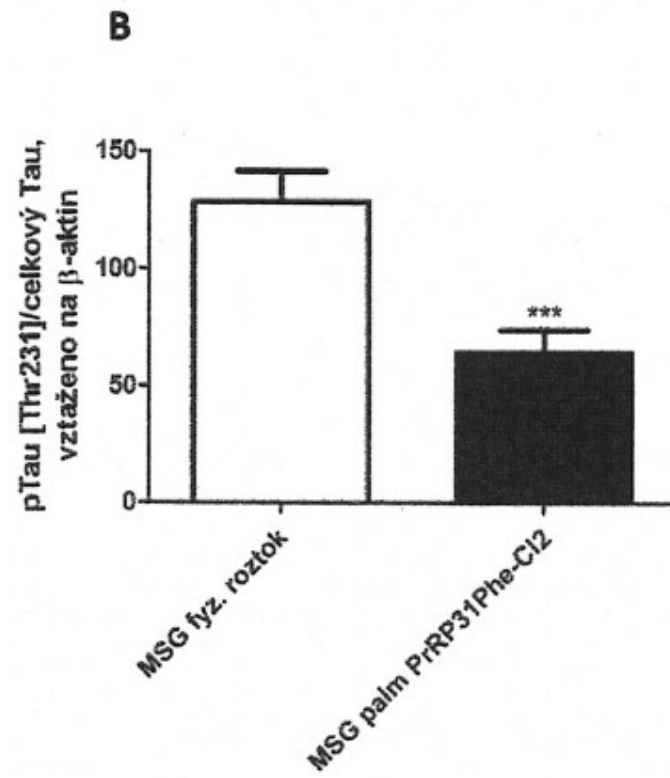


Obr. 4D

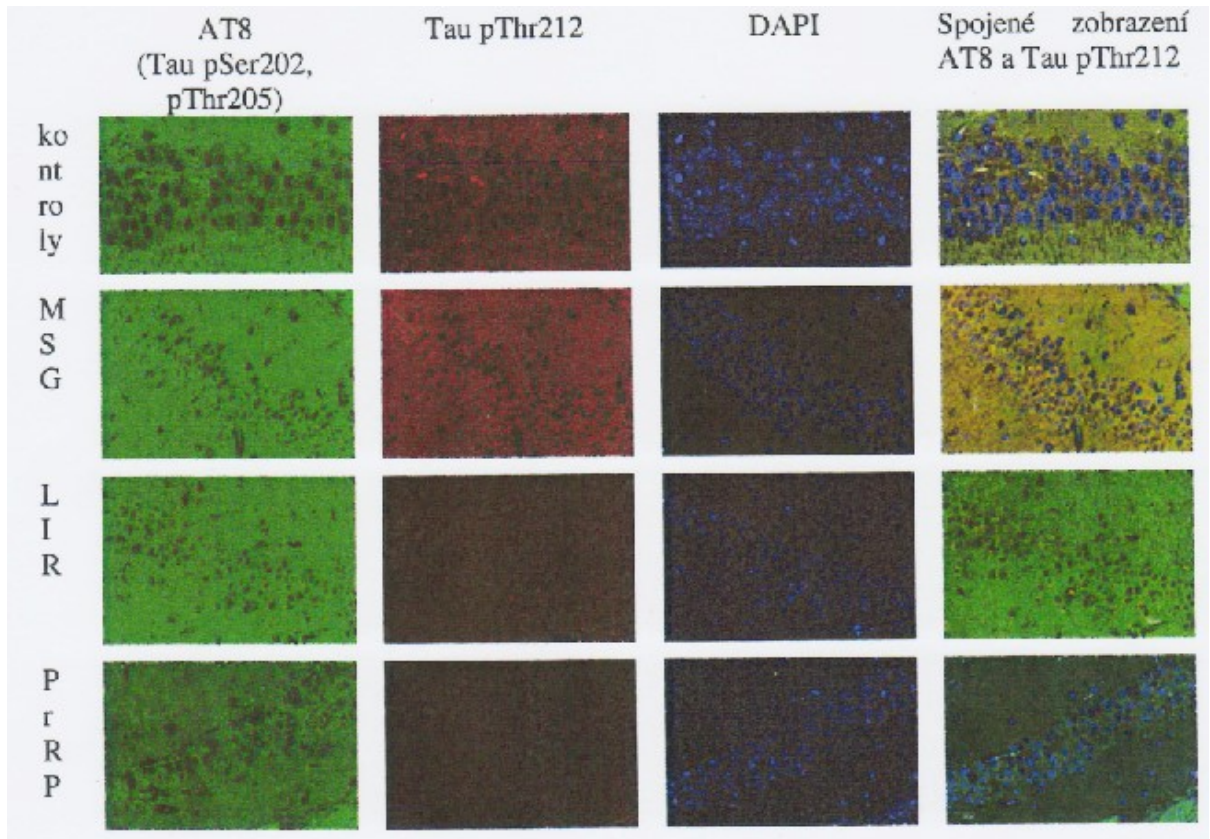
A



Obr. 5A



Obr. 5B



Obr. 6