

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480030202.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/13 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 22 日

[11] 公开号 CN 1867324A

[22] 申请日 2004.10.15

[21] 申请号 200480030202.5

[30] 优先权

[32] 2003.10.15 [33] US [31] 60/512,038

[86] 国际申请 PCT/EP2004/011630 2004.10.15

[87] 国际公布 WO2005/039548 英 2005.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.14

[71] 申请人 前体生物药物股份公司

地址 德国哈雷

[72] 发明人 斯特凡·席林 托尔斯滕·霍夫曼

安德烈·约翰内斯·尼斯特罗杰

汉斯-乌尔里希·德穆特

乌尔里希·海泽

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 70 页 附图 23 页

[54] 发明名称

谷氨酰胺酰基环化酶效应物和谷氨酸环化酶
效应物的应用

[57] 摘要

本发明提供了哺乳动物谷氨酰胺酰基环化酶 (QC, EC 2.3.2.5) 的新生理底物、QC 的新效应物、筛选该效应物的方法、该效应物以及包含该效应物的药物组合物在治疗可通过调节 QC 活性治疗的疾病中的应用。优选的组合物还包括 DP IV 或 DP IV 样酶抑制剂以治疗或减轻可通过调节 QC 和 DP IV 活性治疗的疾病。

1. 谷氨酰胺酰基环化酶 (QC) 效应物在制备药物中的用途, 该药物用于改变选自 Glu¹-ADan、Glu¹-ABri 和 Gln¹-胃泌素 (17 和 34) 中的至少一种 QC 底物的 N-末端的谷氨酸或谷氨酰胺残基向焦谷氨酸残基的转化。

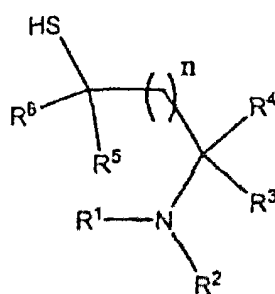
2. 权利要求 1 的用途, 其中所述效应物与至少一种常规载体和/或赋形剂相组合使用。

3. 前述权利要求中任一项的用途, 用于胃肠外、肠道或口服施用。

4. 前述权利要求中任一项的用途, 用于口服施用。

5. 前述权利要求中任一项的用途, 用于治疗选自以下一组中的疾病: 伴随或不伴随幽门螺杆菌感染的十二指肠癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征、家族性英国型痴呆和家族性丹麦型痴呆。

6. 前述权利要求中任一项的用途, 其中所述 QC 效应物具有以下通式 1:



通式 1

包括其所有药用可接受的盐和立体异构体,

其中 R¹-R⁶ 独立地为 H 或分枝的或非分枝的烷基链、分枝的或非分枝的烯基链、分枝的或非分枝的炔基链、碳环基、芳基、杂芳基、杂环基、氮杂氨基酸、氨基酸或其模拟物、肽或其模拟物; 所有上述残基均任选地被取代, 且

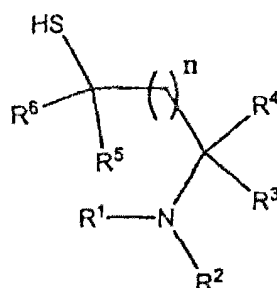
n 可以是 0-2。

7. 一种用于改变选自 Glu¹-ADan、Glu¹-ABri 和 Gln¹-胃泌素 (17 和 34) 中的至少一种 QC 底物的 N-末端的谷氨酸或谷氨酰胺残基向焦谷氨酸残基的转化的方法, 包括给哺乳动物施用治疗有效量的至少一种谷氨酰胺酰基环化酶 (QC) 效应物。

8. 权利要求 7 的方法, 用于治疗选自以下一组中的疾病: 伴随或不伴随幽门螺杆菌感染的十二指肠癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征、家族性英国型痴呆和家族性丹麦型痴呆。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述哺乳动物是人。

10. 权利要求 9 的方法, 其中所述 QC 效应物具有以下通式 1:



通式 1

包括其所有药用可接受的盐和立体异构体,

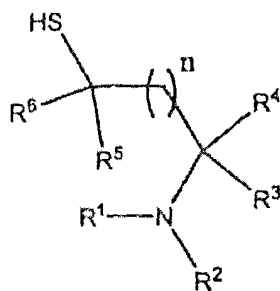
其中 R¹-R⁶ 独立地为 H 或分枝的或非分枝的烷基链、分枝的或非分枝的烯基链、分枝的或非分枝的炔基链、碳环基、芳基、杂芳基、杂环基、氮杂氨基酸、氨基酸或其模拟物、肽或其模拟物; 所有上述残基均任选地被取代, 且

n 可以是 0-2。

11. 用于治疗哺乳动物的选自伴随或不伴随幽门螺杆菌感染的十二指肠癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征、家族性英国型痴呆和家族性丹麦型痴呆中的疾病的方法, 包括给所述哺乳动物施用一种药物组合物, 其中所述药物组合物用于胃肠外、肠道或口服施用并含有至少一种 QC 效应物, 所述效应物任选地与常规载体和/或赋形剂相组合。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述药物组合物用于口服施用。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述 QC 效应物具有以下通式 1:



通式 1

包括其所有药用可接受的盐和立体异构体，

其中 R¹-R⁶ 独立地为 H 或分枝的或非分枝的烷基链、分枝的或非分枝的烯基链、分枝的或非分枝的炔基链、碳环基、芳基、杂芳基、杂环基、氮杂氨基酸、氨基酸或其模拟物、肽或其模拟物；所有上述残基均任选地被取代，且

n 可以是 0-2。

谷氨酰胺酰基环化酶效应物和谷氨酸环化酶效应物的应用

技术领域

本发明涉及谷氨酰胺酰基环化酶（glutaminy cyclase）（QC，EC 2.3.2.5），其催化 N-末端谷氨酰胺残基转化为焦谷氨酸（5-氧代-脯氨酸，pGlu*）同时释放氨的分子内环化反应和 N-末端谷氨酸残基转化为焦谷氨酸同时释放水分子的分子内环化反应。

本发明确认了哺乳动物的 QC 为金属酶，提供了新型的哺乳动物 QC 的生理底物、新型的 QC 效应物、以及 QC 效应物和包含 QC 效应物的药物组合物用于治疗可通过调节 QC 活性而治疗的疾病中的用途。此外，已发现金属相互作用（metal interaction）是开发 QC 抑制剂的一种有效途径。

在一个优选的具体实施方案中，本发明提供将 QC 活性的效应物与 DP IV 或 DP IV 样酶（DP IV-like enzyme）的抑制剂相联合用于治疗或减轻可通过调节 QC 活性和/或 DP IV 活性而治疗的疾病中的用途。

本发明还提供一种鉴定和选择 QC 活性的效应物的筛选方法。

背景技术

谷氨酰胺酰基环化酶（QC，EC 2.3.2.5）催化 N-末端谷氨酰胺残基转化为焦谷氨酸（pGlu*）同时释放氨的分子内环化反应。1963 年，Messer 首次由热带植物番木瓜（*Carica papaya*）胶乳中分离得到 QC（Messer, M. 1963 *Nature* 4874, 1299）。24 年后，在动物垂体中发现了一种相应的酶活性（Busby, W. H. J. 等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536; Fischer; W. H. 和 Spiess, J. 1987 *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3628-3632）。对于哺乳动物的 QC，通过 QC 的 Gln 至 pGlu 的转化可见于 TRH 和 GnRH 前体（Busby, W. H. J. 等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536; Fischer, W. H.

和 Spiess, J. 1987 *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3628-3632)。此外, 最初的 QC 定位试验显示其与催化作用的推定的 (putative) 产物共存于牛垂体中, 进一步提高所提出的于肽类激素合成中的功能 (Bockers, T. M. 等, 1995 *J Neuroendocrinol* 7, 445-453)。相反, 植物 QC 的生理功能较不明显。就来自番木瓜的酶而言, 据认为其在植物防御病原微生物中具有一定作用 (EI Moussaoui, A. 等, 2001 *Cell Mol Life Sci* 58, 556-570)。最近通过序列对比确定了来自其它植物的推定的 QC (Dahl, S. W.等, 2000 *Protein Expr Purif* 20, 27-36)。然而, 这些酶的生理功能仍然不明确。

来自植物和动物的已知 QC 在底物的 N-末端部位对 L-谷氨酰胺有严格的特异性, 并且发现它们的动力学行为符合 Michaelis-Menten 方程 (Pohl, T. 等, 1991 *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10059-10063; Consalvo, A. P.等, 1988 *Anal Biochem* 175, 131-138; Gololobov, M. Y.等, 1996 *Biol Chem Hoppe Seyler* 377, 395-398)。然而, 对比来自番木瓜的 QC 和来自哺乳动物的高度保守的 QC 的一级结构却并未发现任何序列同源性 (Dahl, S. W. 等, 2000 *Protein Expr Purif* 20, 27-36)。尽管植物的 QC 似乎属于一类新的酶家族 (Dahl, S. W.等, 2000 *Protein Expr Purif* 20, 27-36), 但发现哺乳动物的 QC 与细菌氨肽酶具有显著的序列同源性 (Bateman, R. C. 等, 2001 *Biochemistry* 40, 11246-11250), 从而得出植物和动物的 QC 具有不同的进化起源的结论。

EP 02 011 349.4 公开了编码昆虫谷氨酰胺酰基环化酶的多核苷酸, 及其所编码的多肽。该申请进一步提供包含表达载体的宿主细胞, 该表达载体包含本发明的多核苷酸。所分离的多肽和包含昆虫 QC 的宿主细胞可用于筛选降低谷氨酰胺酰基环化酶活性的药物的方法中。据记载, 这种药物可用作杀虫剂。

阿尔茨海默症 (AD) 是以与营养不良的 (dystrophic) 神经元、反应性星形胶质细胞以及小胶质细胞紧密相关的细胞外淀粉样斑块 (amyloidotic plaque) 的异常堆积为特征 (Terry, R. D.和 Katzman, R. 1983

Ann Neurol 14, 497-506; Glenner, G. G.和 Wong, C. W. 1984 *Biochem Biophys Res Comm* 120, 885-890; Intagaki, S.等, 1989 *J Neuroimmunol* 24, 173-182; Funato, H. 等, 1998 *Am J Pathol* 152, 983-992; Selkoe, D. J. 2001 *Physiol Rev* 81, 741-766)。β 淀粉样 (Amyloid-β, Aβ) 肽是老年斑的主要成分, 并且被认为与 AD 发病机理及进展直接相关, 该假设得到遗传学研究的支持 (Glenner, G. G.和 Wong, C. W. 1984 *Biochem Biophys Res Comm* 120, 885-890; Borchelt, D. R. 等, 1996 *Neuron* 17, 1005-1013; Lemere, C. A.等, 1996 *Nat Med* 2, 1146-1150; Mann, D. M. 和 Iwatsubo, T. 1996 *Neurodegeneration* 5, 115-120; Citron, M. 等, 1997 *Nat Med* 3, 67-72; Selkoe, D. J. 2001 *Physiol Rev* 81, 741-766)。Aβ 是由 β-淀粉样前体蛋白 (APP) 的蛋白水解生成 (Kang, J. 等, 1987 *Nature* 325, 733-736; Selkoe, D. J. 1998 *Trends Cell Biol* 8, 447-453), 即 APP 通过 β-分泌酶在 Aβ 的 N-末端和 γ-分泌酶在 Aβ 的 C-末端的顺序切割 (Haass, C.和 Selkoe, D. J. 1993 *Cell* 75, 1039-1042; Simons, M.等, 1996 *J Neurosci* 16 899-908)。除了在 N-末端始于 L-Asp 的优势 Aβ 肽 (Aβ-1-42/40) 之外, 老年斑中存在很多异质性 N-末端截短的形式。据报道这种被截短的肽在体外具有更强的神经毒性并且比全长的同工型更迅速聚集 (Pike, C. J.等, 1995 *J Biol Chem* 270 23895-23898)。已知 N 端截短的肽是在早期发作的家族性 AD (FAD) 患者中过度产生 (Saido, T. C. 等, 1995 *Neuron* 14, 457-466; Russo, C.等, 2000 *Nature* 405, 531-532), 并已知在唐氏综合征 (DS) 患者的脑中于早期出现并且随年龄增长而增加 (Russo, C. 等, 1997 *FEBS Lett* 409, 411-416, Russo, C. 等, 2001 *Neurobiol Dis* 8, 173-180; Tekirian, T. L.等, 1998 *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 76-94)。最后, 其量反映了疾病进行性的严重程度 (Russo, C.等, 1997 *FEBS Lett* 409, 411-416)。额外的翻译后过程可能通过 1 位与 7 位天冬氨酸的异构化或外消旋化以及残基 3 位和 11 位的谷氨酸的环化进一步修饰 N-末端。3 位含焦谷氨酰胺的同工型 [pGlu³]Aβ(3-40/42) 代表老年斑中 N-端截短的物质的重要形式——大

约占 A β 总量的 50% (Mori, H.等, 1992 *J Biol Chem* 267, 17082-17086, Saido, T. C.等, 1995 *Neuron* 14, 457-466; Russo, C. 等, 1997 *FEBS Lett* 409, 411-416; Tekirian, T. L.等, 1998 *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 76-94; Geddes, J. W. 等, 1999 *Neurobiol Aging* 20, 75-79; Harigaya, Y. 等, 2000 *Biochem Biophys Res Commun* 276, 422-427), 并且它们同样存在于前淀粉样病变 (pre-amyloid lesion) 中 (Lalowski, M.等, 1996 *J Biol Chem* 271, 33623-33631)。[pGlu³] A β (3-40/42)肽的堆积很可能是由于增强聚集和赋予对大多数氨肽酶的抵抗性的结构修饰所致 (Saido, T. C.等, 1995 *Neuron* 14, 457-466; Tekirian, T. L.等, 1999 *J Neurochem* 73, 1584-1589)。该证据为 AD 发病机理中[pGlu³] A β (3-40/42)肽的关键作用提供了线索。然而, 关于其神经毒性和聚集性方面却了解得很少 (He, W.和 Barrow, C. J. 1999 *Biochemistry* 38, 10871-10877; Tekirian, T. L.等, 1999 *J Neurochem* 73, 1584-1589)。此外, 这些同工型对神经胶质细胞的作用及神经胶质对这些肽的反应是完全未知的, 不过活性神经胶质确实与老年斑有关并且可能对淀粉样沉积 (amyloid deposit) 具有积极作用。在最近的研究中, 在神经元和神经胶质细胞培养物中研究了 A β (1-42)、A β (1-40)、[pGlu³]A β (3-42) 和 [pGlu³]A β (3-40)肽的毒性、聚集性以及分解代谢, 表明焦谷氨酸的修饰加剧了 A β -肽的毒性, 同时还抑制其被培养的星形胶质细胞降解。Shirotani 等人在体外研究了感染新培斯病毒 (Sindbis Virus) 的原代皮质神经元 (primary cortical neuron) 中[pGlu³]A β 肽的生成。它们构建了淀粉样前体蛋白互补 DNA, 所述 DNA 编码具有氨基酸取代和缺失的[pGlu³]A β 的潜在前体。对于始于 N-末端谷氨酰胺残基而不是天然前体中的谷氨酸的人工前体而言, 提示存在自发地转化或通过谷氨酰胺酰基环化酶酶促地转化为焦谷氨酸。尚未在体内确定 [pGlu³] A β 天然前体的 3 位 N-末端谷氨酸的环化机制 (Shirotani, K., Tsubuki, S., Lee, H. J., Maruyama, K., 和 Saido, T. C. (2002) *Neurosci Lett* 327, 25-28)。

家族性英国型痴呆 (FBD) 和家族性丹麦型痴呆 (FDD) 是早期起病的常染色体显性疾病, 其特征在于进行性认知障碍、强直和小脑共济失调 (Ghisso, J. et al. 2000, *Ann N Y Acad Sci* 903, 129-137; Vidal, R. et al. 1999, *Nature* 399, 776-781; Vidal, R. et al. 2004, *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 787-800)。与阿尔茨海默症相似, 患者体内有广泛性的实质和血管淀粉样沉积形成, 伴有海马神经变性、补体和神经胶质活化 (Rostagno, A. et al. 2002, *J Biol Chem* 277, 49782-49790)。这些疾病由 BRI 基因 (SwissProt Q9Y287) 的不同突变引起, 这些突变产生的开放读框较野生型 BRI 长 11 个氨基酸。对于 FBD, ORF 的改变由 BRI (BRI-L) 的终止密码子突变引起, 而在 FDD, 一个 10 个核苷酸的复制插入产生了更大的 BRI (BRI-D) (Ghisso J. et al. 2001 *Amyloid* 8, 277-284; Rostagno, A. et al. 2002 *J Biol Chem* 277, 49782-49790)。BRI 是 2 型跨膜蛋白, 由 13 号染色体编码, 已经发现其通过弗林蛋白酶 (furin) 和其他激素原转换酶在 C 端区域进行处理, 释放一种长度为 23 个氨基酸的肽 (Kim, S. H. et al. 2000 *Ann N Y Acad Sci* 920, 93-99; Kim, S. H. et al. 2002 *J Biol Chem* 277, 1872-1877)。突变的 BRI 蛋白 BRI-D 和 BRI-L 的裂解导致产生一些肽 (ABri 和 ADan, 均为 34 个氨基酸), 所述的肽易于聚集, 引起非纤维性沉积以及淀粉样原纤维 (amyloid fibrils) (El Agnaf, O. M. et al. 2004 *Protein Pept Lett* 11, 207-212; El Agnaf, O. M. et al. 2001 *Biochemistry* 40, 3449-3457; El Agnaf, O. M. et al. 2001 *J Mol Biol* 310, 157-168; Srinivasan et al. 2003 *J Mol Biol* 333, 1003-1023)。ADan 和 ABri 肽在其 N 端 22 个氨基酸是相同的, 但含有不同的 C 端区域。C 端部分被发现对于原纤维形成和神经毒性是必需的 (El Agnaf, O. M. et al. 2004 *Protein Pept Lett* 11, 207-212)。

已经发现, ABri 和 ADan 肽的 N 端通过焦谷氨酰形成 (pyroglutamyl formation) 而被封闭。根据阿尔茨海默症中 A β 的 N 端的焦谷氨酰形成, pGlu 形成于谷氨酸 (Ghisso J. et al. 2001 *Amyloid* 8; Saido et al. 1995 *Neuron* 14, 457-466)。反过来, 焦谷氨酰的形成使得肽对于大多数氨肽酶的降解作

用变得稳定，由此刺激了疾病的进展。已经发现，聚集物的形成在细胞外进行，但也见于细胞的分泌途径 (Kim et al. 2002 *J Biol Chem* 277, 1872-1877)。因此，通过抑制谷氨酰胺酰基和谷氨酸环化酶而抑制在具有神经毒性的 ABri 和 ADan 肽的 N 端形成 pGlu，代表了一种治疗 FBD 和 FDD 的新方法。

二肽基肽酶 IV (DP IV) 是在机体的多种组织包括肾脏、肝脏和肠中发现的在脯氨酸后 (在较小程度上为丙氨酸后、丝氨酸后或甘氨酸后) 进行切割的丝氨酸蛋白酶，并且可将 N-末端的二肽从肽链上切割下来。最近已发现 DP IV 在神经肽的新陈代谢、T 细胞活化、癌细胞对内皮的附着以及 HIV 进入淋巴样细胞方面起着重要的作用。参见 WO 02/34242、WO 02/34243、WO 03/002595 以及 WO 03/002596。

WO 99/61431 公开的 DP IV 抑制剂包含一氨基酸残基和一噻唑烷或吡咯烷基团及其盐，尤其是 L-苏-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-苏-异亮氨酰吡咯烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰吡咯烷。

低分子量的二肽基肽酶 IV 抑制剂的进一步实例为以下物质，如四氢异喹啉-3-甲酰胺衍生物、N-取代的 2-氰基吡咯和 2-氰基吡咯烷、N-(N'-取代的甘氨酰基)-2-氰基吡咯烷、N-(取代的甘氨酰基)-噻唑烷、N-(取代的甘氨酰基)-4-氰基噻唑烷、氨基-酰基-二羟硼基-脯氨酰-抑制剂、环丙基稠合的吡咯烷和杂环化合物。二肽基肽酶 IV 抑制剂记载于 US 6,380,398、US 6,011,155、US 6,107,317、US 6,110,949、US 6,124,305、US 6,172,081、WO 95/15309、WO 99/61431、WO 99/67278、WO 99/67279、DE 198 34 591、WO 97/40832、DE 196 16 486 C 2、WO 98/19998、WO 00/07617、WO 99/38501、WO 99/46272、WO 99/38501、WO 01/68603、WO 01/40180、WO 01/81337、WO 01/81304、WO 01/55105、WO 02/02560 以及 WO 02/14271、WO 02/04610、WO 02/051836、WO 02/068420、WO 02/076450、WO 02/083128、WO 02/38541、WO 03/000180、WO 03/000181、WO 03/000250、WO 03/002530、WO 03/002531、WO 03/002553、WO 03/002593、

WO 03/004496、WO 03/024942 以及 WO 03/024965，其教导，尤其是涉及这些抑制剂、其定义、应用及其制备的教导全文并入此处作为参考。

发明内容

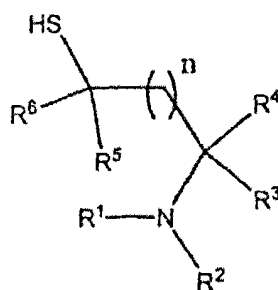
本发明提供了哺乳动物 QC 的新的生理底物，其选自 $\text{Glu}^1\text{-ABri}$ 、 $\text{Glu}^1\text{-ADan}$ 、 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}40/42)$ 、和 $\text{Gln}^1\text{-胃泌素}$ (17 和 34)，并提供了 QC 效应物及包含 QC 效应物的药物组合物用于治疗可通过调节 QC 活性而治疗的疾病的应用，所述疾病优选地选自伴随或不伴随幽门螺杆菌的十二指肠癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征、家族性英国型痴呆和家族性丹麦型痴呆。

通过抑制试验发现，人 QC 是金属依赖性转移酶。QC 脱辅基酶 (apoenzyme) 通过锌离子可最有效地被再活化，并且锌依赖性氨肽酶的金属结合基序同样存在于人 QC 中。与活性位点结合金属相互作用的化合物为有效的抑制剂。

出乎意料的是，研究表明重组人 QC 和源自脑提取物的 QC 活性催化 N-末端谷氨酰胺酰基的环化作用以及谷氨酸的环化作用。更惊人的发现是，环化酶催化的 Glu^1 转化在 pH 6.0 左右有利，而 Gln^1 至 pGlu-衍生物的转化的最适 pH 在 8.0 左右。由于 pGlu-A β 相关肽的形成可通过抑制重组人 QC 及源自猪垂体提取物的 QC 活性而得以抑制，因此酶 QC 为研发阿尔茨海默症治疗药物的靶向之一。

本发明提供了用于胃肠外、肠道或口服施用的药物组合物，其包含至少一种 QC 效应物，所述效应物任选地与常规的载体和/或赋形剂相组合；或者其包含至少一种 QC 效应物，所述效应物与至少一种 DP IV 抑制剂相组合，且任选地与常规的载体和/或赋形剂相组合。

本发明提供了可由通式 1 概括表示的 QC 抑制剂或其药用可接受的盐，包括所有的立体异构体：



通式 1

其中 $R^1 \sim R^6$ 独立地为 H 或分枝的或非分枝的烷基链、分枝的或非分枝的烯基链、分枝的或非分枝的炔基链、碳环基 (carbocyclic)、芳基、杂芳基、杂环基、氮杂氨基酸 (aza-amino acid)、氨基酸或其模拟物、肽或其模拟物；所有上述残基均任选地是取代的，且 n 可以是 0-2。

附图说明

通过参考下列各图可进一步理解本发明的这些方面及其它方面，其中：

图 1 显示人 QC 催化的 H-Gln-Ala-OH 环化的进程曲线，其中于 340 nm 处监测吸光度的减小。各样品包括 0.3 mM NADH/ H^+ 、14 mM α -酮戊二酸、30 U/ml 谷氨酸脱氢酶以及 1 mM H-Gln-Ala-OH。从曲线 A 到 D，应用不同浓度的 QC：A，10 mU/ml，B，5 mU/ml，C，2.5 mU/ml。在曲线 D 中，未加入 QC。QC 浓度与测得的活性之间呈线性关系（插图）。

图 2 显示在一级速率条件下使用 Gln- β NA 作为底物所确定的人和木瓜（插图）QC 的 pH 依赖性。就人 QC 而言，使用根据 Ellis 和 Morrison 的由 25 mM MES、25 mM 乙酸和 50 mM Tris (Ellis, K. J. 和 Morrison, J. F. 1982 *Methods Enzymol.* 87, 405-426) 组成的提供恒定离子强度的缓冲系统。由于 Tris 的轻微抑制效应，使用 50 mM Mops 缓冲液来研究木瓜 QC。通过加入 NaCl 调节离子强度为 0.05 M。通过以基于离解基团 (dissociating

group) 的模型拟合对速率特征进行评价。就木瓜 QC 而言, 通过以单一离解模型 (single dissociation model) 拟合数据得到 pK_a 值为 7.13 ± 0.03 。

图 3 显示 pH 对人 QC 和源自木瓜胶乳的 QC 稳定性的影响。在不同 pH 值的 0.1 M 缓冲液 (pH 4-7 的柠檬酸钠、pH 7-10 的磷酸钠) 中将酶储备溶液稀释 20 倍。将酶溶液在 30°C 下温育 30 分钟后接着按照标准方案分析酶的活性。

图 4 显示第 2 个氨基酸位置含谷氨酰胺的一组底物的专一性常数 k_{cat}/K_M 的对比。其中从二肽至四肽发现人 QC 的特异性有所提高, 然而在木瓜 QC 中未观察到任何变化。此处呈现的数据是表 3 所给参数的重制曲线 (replot)。

图 5 显示人 QC 催化的从 H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂ 至 pGlu-Lys(pGlu)-Arg-Leu-Ala-NH₂ 的形成。通过因释放氨引起的 m/z 比的时间依赖性变化监测底物的转化。样品组成为 0.5 mM 底物、38 nM QC 的 40 mM Tris/HCl 溶液, pH 7.7。在所示的时间处, 将样品从试管中除去, 与基质溶液 (1:1 v/v) 混合并接着记录质谱。在木瓜 QC 中观察到非常相似的依赖性。

图 6 显示木瓜 QC 催化的源自 H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ 的 pGlu-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ 的形成。通过因释放甲胺引起的 m/z 比的时间依赖性变化监测底物的转化。样品组成为 0.5 mM 底物、0.65 μ M 木瓜 QC 的 40 mM Tris/HCl 溶液, pH 7.7。在所示的时间处, 将样品从试管中除去, 与基质溶液 (1:1 v/v) 混合并接着记录质谱。在不含木瓜 QC 或向底物应用低于 1.5 μ M 人 QC 的样品中未观察到底物的转化 (未显示)。

图 7 显示 DP IV 催化的从 Gln³-A β (1-11)a 到 Gln³-A β (3-11)a 的形成。在所示的时间处, 将样品从试管中除去, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 8 显示 DP IV 抑制剂 Val-吡咯烷酰胺 (Val-Pyrrolidide, Val-Pyrr) 对 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1-11)\text{a}$ 的切割的阻碍作用。在所示的时间处, 将样品从试管中移除, 与基质溶液 (1:1 v/v) 混合并接着记录质谱。

图 9 显示 QC 催化的从 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 到 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的形成。在所示的时间处, 将样品从试管中移除, 与基质溶液 (1:1 v/v) 混合并接着记录质谱。

图 10 显示 QC 抑制剂 1,10-二氮杂菲对由 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 生成 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的抑制作用。在所示的时间处, 将样品从试管中移除, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 11 显示连续以 DP IV 和 QC 催化后, 从 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1-11)\text{a}$ 到 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的形成。在所示的时间处将样品从试管中移除, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 12 显示在具有催化活性的 DP IV 和 QC 存在下, QC 抑制剂 1,10-二氮杂菲对由 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1-11)\text{a}$ 生成 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的抑制作用。在所示的时间处将样品从试管中移除, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 13 显示在具有催化活性的 DP IV 和 QC 存在下, DP IV 抑制剂 Val-Pyrr 对从 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1-11)\text{a}$ 形成 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的还原作用。在所示的时间处将样品从试管中移除, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 14 显示在连续经存在于猪垂体匀浆中的氨肽酶和 QC 催化后, 由 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1-11)\text{a}$ 到 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 的形成。在所示的时间处将样品从试管中移除, 与基质溶液混合 (1:1 v/v) 并接着记录质谱。

图 15A 和 B 显示与使用前煮沸 10 分钟的重组人 QC 一同温育的 $\text{A}\beta(3-11)\text{a}$ 和 $\text{A}\beta(3-21)\text{a}$ 的质谱图。C 和 D 显示当存在导致分别形成 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-11)\text{a}$ 和 $[\text{pGlu}^3]\text{-A}\beta(3-21)\text{a}$ 的活性人 QC 时 $\text{A}\beta(3-11)\text{a}$ 和 $\text{A}\beta(3-21)\text{a}$ 的质谱图。E 和 F 显示当存在活性 QC 及 5 mM 抑制 $[\text{pGlu}^3]$ 形成的苯并咪唑时 $\text{A}\beta(3-11)\text{a}$ 和 $\text{A}\beta(3-21)\text{a}$ 的质谱图。

图 16 显示对底物浓度作图的木瓜 QC 催化的 Glu- β NA-转化的反应速率。在 0.1 M 焦磷酸盐缓冲液, pH 6.1 (正方形)、0.1 M 磷酸盐缓冲液, pH 7.5 (圆形) 以及 0.1 M 硼酸盐缓冲液, pH 8.5 (三角形) 中测定初始速率。动力学参数如下: $K_M = 1.13 \pm 0.07$ mM, $k_{cat} = 1.13 \pm 0.04$ min⁻¹ (pH 6.1); $K_M = 1.45 \pm 0.03$ mM, $k_{cat} = 0.92 \pm 0.01$ min⁻¹ (pH 7.5); $K_M = 1.76 \pm 0.06$ mM, $k_{cat} = 0.56 \pm 0.01$ min⁻¹ (pH 8.5)。

图 17 显示在一级速率定律条件 ($S \ll K_M$) 下确定的 Gln- β NA (圆形) 和 Glu- β NA (正方形) 转化的 pH 依赖性。底物浓度分别为 0.01 mM 和 0.25 mM。两次测定均应用由 0.05 M 乙酸、0.05 M 焦磷酸和 0.05 M 三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tricine) 组成的三元缓冲系统。为避免离子强度不同, 所有缓冲液均通过加入 NaCl 调节至相同的电导率。这些数据用双离解基团方程拟合, 揭示 Gln- β NA 的 pKa 值为 6.91 ± 0.02 和 9.5 ± 0.1 , Glu- β NA 的 pKa 值为 4.6 ± 0.1 和 7.55 ± 0.02 。通过滴定法确定各底物中氨基的 pKa 值为 6.97 ± 0.01 (Gln- β NA) 和 7.57 ± 0.05 (Glu- β NA)。所有测定均在 30°C 下进行。

图 18 显示当存在咪唑、吡啶二羧酸且不含抑制性化合物时人 QC 催化的 H-Gln-AMC 环化的进程曲线。在吡啶二羧酸存在下曲线的双曲线形状表明金属离子从 QC 活性位点移除。

图 19 显示杂环螯合剂 1,10-二氮杂菲对 QC 灭活的时间依赖性。在不含底物时将 QC 酶与抑制剂一同温育之后 (连续曲线), 与未与抑制剂一同预温育的样品 (点线) 相比可观察到酶活性降低, 这表明金属离子从 QC 活性位点移除。

图 20 表明单价和二价金属离子对人 QC 的再活化作用。通过加入含 2 mM 吡啶二羧酸的 50 mM Bis-Tris 溶液, pH 6.8 灭活 QC。随后, 使该酶对包含 1.0 mM EDTA 的 50 mM Bis-Tris, pH 6.8 透析。通过将灭活的酶样品与 0.5 mM 浓度的金属离子一同温育可实现酶的再活化, 同时在 0.5 mM EDTA 存在下以避免缓冲液中痕量金属离子引起的非特异性再活化。对照

为：未灭活，但同样对 EDTA 溶液透析的酶样品作为灭活酶（+EDTA）以及对未加入 EDTA 的缓冲液透析的酶样品（-EDTA）。

图 21 人 QC (hQC) 和金属肽酶 Clan MH 的其它 M28 家族成员的序列对比。使用于 ch.EMBNet.Org 中的 ClustalW 以默认设置进行多重序列对比。在人 QC (hQC; GenBank X71125)、源自灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*, SGAP; Swiss-Prot P80561) 的锌依赖性氨肽酶、以及在人谷氨酰胺羧肽酶 II (hGCP II; Swiss-Prot Q04609) 的 N-乙酰化- α -连接的酸性二肽酶 (NAALADase I) 域 (残基 274-587) 中发现锌离子连接残基的保守。涉及金属结合的氨基酸以粗体和下划线形式打出。就人 QC 而言，这些残基为肽酶的推定的对应物 (counterpart)。

图 22 显示巯基乙胺(方块)、二甲基巯基乙胺(圆圈)和巯基乙醇(三角)对鼠 QC 的 pH 依赖性抑制。点与说明一个解离基团的方程式相一致。曲线显示为不同的形状，提示依赖性的原因在于抑制剂质子化状态的改变。根据动力学而确定的巯基乙胺的 pKa 值 (8.71 ± 0.07) 和二甲基巯基乙胺的 pKa 值 (8.07 ± 0.03) 与由文献数据中得到的针对氨基的值 (分别为 8.6 和 7.95) (Buist, G. J. and Lucas, H. J. 1957 *J Am Chem Soc* 79,6157; Edsall, J. T. *Biophysical Chemistry*, Academic Press, Inc., New York, 1958) 十分吻合。因此，巯基乙醇的 pH 依赖性一致的斜率，原因在于其在所研究的 pH 范围内不带有解离基团。

图 23 显示了在存在不同浓度的巯基乙胺(0, 0.25, 0.5, 1 mM)的情况下，由人 QC 催化的 Gln-AMC 转化的动力学数据(0.25, 0.125, 0.063, 0.031 mM)的 Lineweaver-Burk 图。数据符合竞争性抑制。所确定的 K_i 值为 0.037 ± 0.001 mM。

肽序列

此处所述及使用的肽具有以下序列：

A β (1-42):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

A β (1-40):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

A β (3-42):

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

A β (3-40):

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

A β (1-11)a:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

A β (3-11)a:

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

A β (1-21)a:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

A β (3-21)a:

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

Gln³-A β (3-40):

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

Gln³-Aβ(3-21)a:

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

Gln³-Aβ(1-11)a:

Asp-Ala-Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

Gln³-Aβ(3-11)a:

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

ABri

pGlu-Ala-Ser-Asn-Cys-Phe-Ala-Ile-Arg-His-Phe-Glu-Asn-Lys-Phe-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Ile-Cys-Ser-Arg-Thr-Val-Lys-Lys-Asn-Ile-Ile-Glu-Glu-Asn

Glu¹-ABri

Glu-Ala-Ser-Asn-Cys-Phe-Ala-Ile-Arg-His-Phe-Glu-Asn-Lys-Phe-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Ile-Cys-Ser-Arg-Thr-Val-Lys-Lys-Asn-Ile-Ile-Glu-Glu-Asn

ADan

pGlu-Ala-Ser-Asn-Cys-Phe-Ala-Ile-Arg-His-Phe-Glu-Asn-Lys-Phe-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Ile-Cys-Phe-Asn-Leu-Phe-Leu-Asn-Ser-Gln-Glu-Lys-His-Tyr

Glu¹-ADan

Glu-Ala-Ser-Asn-Cys-Phe-Ala-Ile-Arg-His-Phe-Glu-Asn-Lys-Phe-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Ile-Cys-Phe-Asn-Leu-Phe-Leu-Asn-Ser-Gln-Glu-Lys-His-Tyr

具体实施方式

本发明提供谷氨酰胺酰基环化酶（QC）的效应物，其用于

a) 治疗可通过调节体内 QC 活性而治疗的哺乳动物疾病和/或

b) 由 QC 活性调节引起的基于含 pGlu 的肽的作用的生理过程的调节。

此外，本发明提供抑制哺乳动物中谷氨酰胺酰基环化酶（QC，EC 2.3.2.5）和/或 QC 样酶的化合物，以及 QC 活性抑制剂在治疗与 QC 活性相关的病理状况中的应用。

本发明还提供一种治疗阿尔茨海默症和唐氏综合征的新方法。沉积在阿尔茨海默症和唐氏综合征大脑中的淀粉样 β -肽的 N-端携带焦谷氨酸。由于修饰的淀粉样 β -肽对 β -淀粉样聚集及毒性呈现增强的趋势，很可能会恶化疾病的发作和进展，因此 pGlu 的生成在疾病的发展和进展中是一重要事件（Russo, C.等 2002 J Neurochem 82, 1480-1489）。

相反，在天然 $A\beta$ -肽（3-40/42）中，谷氨酸是作为 N-末端氨基酸存在。到目前为止还未发现 Glu 到 pGlu 的酶促转化。此外，至今尚未观察到 Glu 肽到 pGlu 肽的自发性转化。因此，本发明一方面旨在确定 QC 在阿尔茨海默症和唐氏综合征中的作用。这一方面的研究包括合成在 3 位包含的氨基酸为谷氨酰胺而不是谷氨酸的 $A\beta(3-11)a$ 和 $A\beta(1-11)a$ 、这些修饰的淀粉样 β -肽对 QC、DP IV 和 DP IV 样酶及氨肽酶的底物特征的确定、以及 QC 抑制剂在防止从淀粉样 β -衍生肽(1-11)和(3-11)的 N-末端谷氨酰胺酰基残基形成 pGlu 中的应用。所得结果见实施例 8。所应用的方法记载于实施例 3。

至今，没有迹象显示 QC 与疾病进展有关，因为在 $A\beta(3-40/42)$ ，或 $11-40/42$ ）中谷氨酸为 N-末端氨基酸。但是，QC 是唯一已知的能在肽的 N-末端形成 pGlu 的酶。本发明其它方面涉及以下结果和发现：

a) 除谷氨酰胺以外，QC 还催化谷氨酸以极低速率转化为焦谷氨酸的环化反应，

b) APP 或其后形成的淀粉样 β -肽的谷氨酸通过未知的酶活性经翻译后加工转化为谷氨酰胺，并且在另一步骤中，QC 在淀粉样 β -肽 N-末端加工后催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸，

c) 谷氨酸通过化学催化或自身催化经翻译后加工转化为谷氨酰胺，随后 QC 在淀粉样 β -肽 N-末端加工后催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸，

d) 编码淀粉样 β 蛋白的 APP 基因中发生突变, 导致在 3 位 Gln 代替 Glu。在翻译及 N-末端加工后, QC 催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸,

e) 由于未知酶活性障碍, 谷氨酰胺被并入到 APP 的初生肽链中, 随后 QC 在淀粉样 β -肽 N-末端加工后催化谷氨酰胺 N-末端环化为焦谷氨酸。

QC 涉及上述所有五种情况下的关键步骤, 即有利于淀粉样 β -肽聚集的焦谷氨酸的形成。因此, 与环化反应发生的机制无关, 对 QC 的抑制会防止导致阿尔茨海默症和唐氏综合征发作和进展的斑块形成性 $A\beta$ (3-40/42) 或 $A\beta$ (11-40/42) 的沉积。

谷氨酸存在于淀粉样 β -肽的 3、11 和 22 位。其中 22 位从谷氨酸 (E) 到谷氨酰胺 (Q) 的突变 (对应于淀粉样前体蛋白 APP 693, Swissprot P05067) 被记载为所谓的 Dutch 型脑动脉淀粉样病变突变 (Dutch type cerebroarterial amyloidosis mutation)。

在 3、11 和/或 22 位含焦谷氨酸残基的 β -淀粉样肽被描述为比 $A\beta$ (1-40/42/43) 更具细胞毒性和疏水性 (Saido T. C. 2000 *Medical Hypotheses* 54 (3): 427-429)。

可通过不同位点的 β -分泌酶 β -位点淀粉样前体蛋白切割酶 (BACE) (Huse J. T. 等 2002 *J. Biol. Chem.* 277 (18): 16278-16284) 和/或通过氨肽酶加工产生多种 N-末端变异。在所有情况下, 环化反应均可按照上述 a) — e) 发生。

迄今为止, 没有证据支持对应于途径 a) 的未知谷氨酰胺环化酶 (EC) 催化的 Glu^1 -肽向 pGlu-肽的酶促转化 (Garden, R. W., Moroz, T. P, Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S., 和 Sweedler, J. V. (1999) *J Neurochem* 72, 676-681, Hosoda R. 等, (1998) *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 1089-1095)。到目前还未鉴定出这种能环化 Glu^1 -肽的酶活性, 所述 Glu^1 -肽经 N-末端质子化并在温和的碱性 pH 条件下拥有荷负电的 Glu^1 γ -羧基基团。

pH 值低于 7.0 时对 Gln¹-底物的 QC 活性显著降低。相反, 似乎 Glu¹ 转化可在酸性反应条件下发生 (Iwatsubo, T.等 1996 *Am J Pathol* **149**, 1823-1830; Russo, C. 等 1977 *FEBS Lett* **409**, 411-416; Russo, C. 等 2001 *Neurobiol Dis* **8**, 173- 180; Tekirian, T. L. 等 1998 *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 76-94; Russo, C. 等 2002 *J Neurochem* **82**, 1480-1489; Hosoda, R. 等 1998 *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 1089- 1095; Garden, R. W. 等 1999 *J Neurochem* **72**, 676-681)。

按照本发明研究了 QC 能否在温和的酸性条件下识别并转化 (turnover) 淀粉样 β 衍生肽。因此, 合成并研究了作为酶潜在底物的肽 Gln³-A β (1-11)a、A β (3-11)a、Gln³- A β (3-11)a、A β (3-21)a、Gln³- A β (3-21)a 以及 Gln³- A β (3-40)。选择这些序列以模仿可能因翻译后 Glu 酰胺化出现的天然的 N-末端和 C-末端截短的 Glu³-A β 肽和 Gln³- A β 肽。

在本发明中已发现木瓜和人 QC 既催化谷氨酰胺酰基环化也催化谷氨酰环化。显然, QC 的主要生理功能是在激素分泌过程之前或期间通过谷氨酰胺环化反应完成内分泌细胞中的激素成熟。已知此类分泌小泡的 pH 值呈酸性。因而, 在 5.0 到 7.0 的窄 pH 范围内所述酶的副活性可能是其新发现的也转化 Glu-A β 肽的谷氨酰基环化酶活性。然而, 由于 Glu-环化远远慢于 Gln-转化, 谷氨酰基环化是否起到重要的生理作用值得怀疑。但是, 在神经退行性病变的病理学中, 与谷氨酰基环化有关。

通过研究该酶促反应的 pH 依赖性, 我们发现未质子化的 N-末端对于 Gln¹ 肽的环化是必需的, 并相应地发现底物的 pK_a 值与 QC 催化的 pK_a 值一致 (见图 17)。因此, QC 可稳定未质子化 α -氨基基团对通过酰胺化亲电地活化的 γ -羰基碳的分子内亲核进攻 (路线 1)。

与含 N-末端谷氨酰胺的肽上存在的单价电荷相比, 含 Glu 的肽的 N-末端 Glu 残基在约中性 pH 条件下主要带二价电荷。谷氨酸 γ -羧基和 α -氨基基团的 pK_a 值分别约为 4.2 和 7.5。即, 在中性及中性以上的 pH 条件下,

尽管 α -氨基氮部分或完全未质子化且具有亲核性， γ -羧基为未质子化并因此不能发挥羰基的亲电性。因此，不可能发生分子内环化反应。

然而，在它们各自的 pK_a 值之间大约 5.2-6.5 的 pH 范围内，含 N-末端 Glu 的肽总浓度的大约 1-10% ($-\text{NH}_2$) 或 10-1% ($-\text{COOH}$) 浓度的两官能团均呈现非离子化形式。结果，在温和的酸性 pH 范围内，存在其所携两官能团均未带电荷的 N-末端 Glu-肽，从而 QC 可能稳定分子内环化为 pGlu 肽的中间体。即，如果 γ -羧基被质子化，则羰基碳有足够的亲电性以允许未质子化的 α -氨基进行亲核进攻。在该 pH 值时，羟基离子作为离去基团（路线 3）。通过 QC 催化的 Glu- β NA 转化所获得的 pH 依赖性数据确证了这些假设（见实施例 11）。与通过 QC 催化的 Gln- β NA 的谷氨酰胺转化相比，催化作用的最适 pH 值转移至 pH 约 6.0 的酸性范围，即该 pH 范围内底物分子同时富含质子化的 γ -羧基和未质子化的 α -氨基。此外，动力学测定的 pK_a 值 7.55 ± 0.02 与通过滴定所测定的 Glu- β NA 的 α -氨基的值 (7.57 ± 0.05) 非常一致。

从生理学上讲，pH 值 6.0 时 QC 催化的谷氨酸环化反应的二级速率常数（或专一性常数， K_{cat}/K_M ）可能在比谷氨酰胺环化反应的二级常数慢 8,000 倍的范围内（图 17）。然而，两种模型底物 Glu- β NA 和 Gln- β NA 的非酶促转化可以忽略不计，这与本发明所观察到的 pGlu 肽的形成可忽略相吻合。因此，对于通过 QC 催化的 pGlu 生成，根据酶促与非酶促速率常数的比值可估计速率的增加至少为 10^8 （将酶催化反应的二级速率常数与相应的非酶促环化反应一级速率常数进行比较，Gln 和 Glu 转化的催化能力因子（catalytic proficiency factor）分别为 10^9 - 10^{10} M^{-1} ）。从这些数据得出的结论是，体内很可能仅有一条酶促途径导致 pGlu 生成。

由于 QC 在脑内非常丰富，并且考虑到最近发现的 30 μM (Gln-) TRH 样肽的突变的转化率高达 0.9 min^{-1} (Prokai, L, Prokai-Tatrai, K., Ouyang, X., Kim, H. S., Wu, W. M., Zharikova, A., 和 Bodor, N. (1999) *J Med Chem* 42,4563-4571)，可以预言对于适当的谷氨酸底物，如果提供相似的反应

条件,其环化反应半衰期大约为 100 小时。此外,考虑到分泌途径中脑部 QC/EC 的区室化和定位,实际上在体内酶和底物的浓度及反应条件可能更有利于完整细胞中的酶促环化作用。而且,如果 N-末端 Glu 被转化为 Gln,则可预期 QC 介导的更加迅速的 pGlu 形成。在体外,两种反应均受应用 QC/EC 活性抑制剂的抑制(图 9、10 和 15)。

总而言之,本发明指出富含于大脑中的人 QC 很可能是从占存在于阿尔茨海默症中的斑块沉积的 50%以上的由 Glu-A β 和 Gln-A β 前体生成淀粉样病变形性(amyloidogenic)pGlu-A β 肽的催化剂。这些发现确定 QC/EC 参与了老年斑的形成并因此可作为治疗阿尔茨海默症的新型药物靶标。

在本发明的第二个具体实施方案中,发现淀粉样 β 衍生肽是二肽基肽酶 IV(DP IV)或 DP IV 样酶、优选为二肽基肽酶 II(DP II)的底物。DP IV、DP II 或其它 DP IV 样酶可从修饰的淀粉样 β -肽(1-11)的 N-末端释放二肽,生成以谷氨酰胺作为 N-末端氨基酸残基的淀粉样 β -肽(3-11)。结果如在实施例 8 中所示。

如在文献中所述,在被 DP II、DP IV 或其它 DP IV 样酶切割之前,天冬氨酸(淀粉样 β -肽的残基 1)和丙氨酸(淀粉样 β -肽的残基 2)之间的肽键可异构化产生异天冬氨酰残基(Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) *BBRC* 237, 188-191; Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H.和 Shirasawa, T. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 225-234)。

这些异天冬氨酰残基造成淀粉样 β -肽抵抗氨肽酶降解,从而使中心斑块包含大量异 Asp¹-淀粉样 β -肽,表明 N-末端转化减少。

然而,本发明首次证明了尤其在酸性条件下,N-末端二肽 H-异 Asp¹-Ala²-OH 可通过二肽基肽酶得以释放。此外,已发现异构化也可先于 β -分泌酶切割,并且异构化可加速蛋白水解进程,从而导致随后经 DP II、DP IV 或 DP IV 样酶转化的异 Asp¹-淀粉样 β -肽 N-末端异天冬氨酰键的释放(Momand,J.和 Clarke, S. (1987) *Biochemistry* 26, 7798-7805; Kuo, Y.-M.,

Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) *BBRC* **237**, 188-191)。因此,抑制异天冬氨酰形成可降低被 β -分泌酶的切割,其又减少淀粉样 β -肽的形成。此外,通过抑制 DP II、DP IV 或 DP IV 样酶阻断异 Asp¹-淀粉样 β -肽的转化可防止 Glu³-A β 被 QC/EC 催化生成[pGlu³] A β 。

在本发明的第三个具体实施方案中, DP IV 活性抑制剂和 QC 抑制剂的组合可用于治疗阿尔茨海默症和唐氏综合征。

DP IV 和/或 DP IV 样酶与 QC 的组合效应阐述如下:

a) DP IV 和/或 DP IV 样酶切割 A β (1-40/42), 释放出包含 H-Asp-Ala-OH 的二肽和 A β (3-40/42),

b) 在副反应中, QC 催化谷氨酸以极低速率环化为焦谷氨酸,

c) 通过未知的酶活性经翻译后加工于 N-末端将谷氨酸转化为谷氨酰胺, 并且随后, QC 在淀粉样 β -肽 N-末端的加工后催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸,

d) 通过化学催化或自身催化经翻译后加工将谷氨酸转化为谷氨酰胺, 并且在另一步骤中, QC 在淀粉样 β -肽 N-末端加工后催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸,

e) 编码淀粉样 β 蛋白的 APP 基因存在突变, 导致 A β 的 3 位由 Gln 代替 Glu。在翻译及 N-末端加工后, QC 催化谷氨酰胺环化为焦谷氨酸,

f) 由于未知酶活性障碍, 谷氨酰胺被掺入 APP 初生肽链, 且随后 QC 在淀粉样 β -肽 N-末端加工后催化谷氨酰胺 N-末端环化为焦谷氨酸。

不同的肽酶活性也可触发使 N-末端 Gln 暴露于 QC 活性。氨肽酶能依次将 Asp 和 Ala 从 A β (1-40/42) 的 N-末端除去, 从而暴露易于环化的氨基酸三。二肽基肽酶如 DP I、DP II、DP IV、DP 8、DP 9 以及 DP 10 可一步去除二肽 Asp-Ala。因此, 氨肽酶活性或二肽基肽酶活性的抑制可用于防止 A β (3-40/42) 的形成。

DP IV 和/或 DP IV 样酶抑制剂以及 QC 下调效应物(lowering effector)活性的组合效应阐述如下:

a) DP IV 和/或 DP IV 样酶抑制剂抑制 $A\beta$ (1-40/42) 转化为 $A\beta$ (3-40/42)。

b) 从而防止谷氨酸 N-末端的暴露并且无论是通过酶促催化还是化学催化都不可能转化为谷氨酰胺, 从而导致焦谷氨酸的形成。

c) 另外 QC 抑制剂可防止 APP 基因突变产生的残基修饰的 $A\beta$ 3-40/42 分子和那些修饰的 $A\beta$ (3-40/42) 分子形成焦谷氨酸。

本发明中, 类似的 DP IV 或 DP IV 样酶与 QC 的联合作用已用其他肽类激素如胰高血糖素, CC 趋化因子以及 P 物质。

胰高血糖素是通过刺激糖原分解和糖原异生起维持正常血糖(euglycemia)作用的自胰岛 α -细胞释放的 29 个氨基酸的多肽。尽管胰高血糖素很重要, 但关于体内胰高血糖素的清除机制仍存在争议。Pospisilik 等用灵敏的质谱技术评估了胰高血糖素的酶促代谢以确定分子产物。将胰高血糖素以纯化的猪二肽基肽酶 IV (DP IV) 温育可顺序生成胰高血糖素 3-29 和胰高血糖素 (5-29)。在人血清中, 胰高血糖素降解为胰高血糖素 (3-29) 之后迅速发生 N-末端环化, 从而防止 DP IV 介导的进一步水解。与纯化的 DP IV 或正常大鼠血清一起温育后对胰高血糖素的生物测定显示高血糖活性明显丧失, 而在缺少 DP IV 的小鼠血清中进行类似的温育未显示胰高血糖素的生物活性有任何丧失。通过质谱和生物测定监测发现, 降解反应被特异性 DP IV 抑制剂异亮氨酰噻唑烷阻断。这些结果确定 DP IV 是涉及胰高血糖素降解和失活的主要酶。这些发现为测定人血浆胰高血糖素水平提供了重要线索 (Pospisilik 等, *Regul Pept* 2001 Jan 12; 96 (3): 133-41)。

人单核细胞趋化蛋白 (MCP)-2 最初从受激的骨肉瘤细胞中作为与 MCP-1 和 MCP-3 一同生成的趋化因子分离得到。Von Coillie 等 (Van Coillie, E. 等, 1998 *Biochemistry* 37, 12672-12680) 从人睾丸 cDNA 库中

克隆了 5'-端延长的 MCP-2 cDNA。它编码 76 个残基 MCP-2 蛋白，但与已报道的源自骨髓的 MCP-2 cDNA 序列的密码子 46 不同，其编码 Lys 而非 Gln。这一由单核苷多态性（Single nucleotide polymorphism, SNP）引起的 MCP-2Lys46 变异体（variant）在生物学上与 MCP-2Gln46 相当。编码区被亚克隆到细菌表达载体 pHEN1 上，并且在大肠杆菌转化后，将这两个 MCP-2 蛋白变异体从周质中回收。Edman 降解显示 NH₂ 端为 Gln 残基而不是 pGlu。在钙动员和趋化试验中于单核细胞上检测 rMCP-2Gln46 和 rMCP-2Lys46 以及 NH₂-端的环状对应物。在 rMCP-2Gln46 和 rMCP-2Lys46 同工型之间未观察到任何生物活性的显著差别。然而，对于这两种 MCP-2 变异体，NH₂-末端的焦谷氨酸是趋化性而非钙动员所必需的。通过丝氨酸蛋白酶 CD26/二肽基肽酶 IV（CD26/DPP IV）NH₂-端截短 rMCP-2Lys46 导致 NH₂-端 Gln-Pro 二肽的释放，而含氨基端 pGlu 的合成 MCP-2 未受影响。CD26/DPP IV 剪除的 rMCP-2Lys46（3-76）在趋化性试验和信号传导试验（signaling assay）中几乎完全没有活性。这些观察结果表明 MCP-2 中 NH₂-端 pGlu 对趋化活性是必需的，并且它还保护该蛋白不受 CD26/DPP IV 的降解（van Collie, E.等 *Biochemistry* 1998, 37, 12672-80）。

本发明中，通过 LC/MS 分析确定，在胰高血糖素 3-29（Pospisilik 等，2001）和 MCP-2 同工型（van Coillie 等，1998）中测定的 N-末端焦谷氨酰胺残基的形成是由 QC 催化的。

此外，通过 LC/MS 研究证明，在经 N-末端 DP IV 催化将两个二肽 Lys-Pro 和 Arg-Pro 从 P 物质除去后剩余的[Gln⁵] P 物质 5-11 被 QC 转化为 [pGlu⁵] P 物质 5-11。

DP IV 抑制剂在 WO 99/61431 中已公开。具体而言，已公开 DP IV 抑制剂包含氨基酸残基和噻唑烷或吡咯烷基及其盐，尤其是 L-苏-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-苏-异亮氨酰吡咯烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰吡咯烷及其盐。

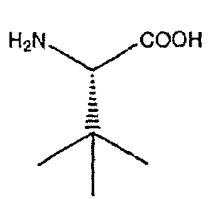
低分子量的二肽基肽酶 IV 抑制剂的更多实例为下列物质, 如四氢异喹啉-3-甲酰胺衍生物、N-取代的 2-氰基吡咯及 2-氰基-吡咯烷、N-(N'-取代的甘氨酸基)-2-氰基吡咯烷、N-(取代的甘氨酸基)噻唑烷、N-(取代的甘氨酸基)-4-氰基噻唑烷、氨基-酰基-二羟硼基-脯氨酸-抑制剂、环丙基稠合的吡咯烷以及杂环化合物。二肽基肽酶 IV 抑制剂记载于 US 6,380,398; US 6,011,155; US 6,107,317; US 6,110,949; US 6,124,305; US 6,172,081; WO 95/15309、WO 99/61431、WO 99/67278、WO 99/67279、DE 198 34 591、WO 97/40832、DE 196 16 486 C 2、WO 98/19998、WO 00/07617、WO 99/38501、WO 99/46272、WO 99/38501、WO 01/68603、WO 01/40180、WO 01/81337、WO 01/81304、WO 01/55105、WO 02/02560 和 WO 02/14271、WO 02/04610、WO 02/051836、WO 02/068420、WO 02/076450; WO 02/083128、WO 02/38541、WO 03/000180、WO 03/000181、WO 03/000250、WO 03/002530、WO 03/002531、WO 03/002553、WO 03/002593、WO 03/004496、WO 03/024942 和 WO 03/024965、其教导、尤其是涉及这些抑制剂、其定义、用途及其制备的教导全文并入此处作为参考。

优选与 QC 效应物联合使用的为 DPIV 抑制剂如 Hughes 等在 1999 *Biochemistry* 38 11597- 11603 所公开的 NVP- DPP728A (1-[[[2-[[5-氰基吡啶-2-基}氨基] 乙基]氨基]乙酰基]-2-氰基-(S)-吡咯烷) (Novartis); Hughes 等在 Meeting of the American Diabetes Association 2002, Abstract no. 272 (Novartis) 所公开的 LAF-237(1-[(3-羟基-金刚烷-1-基氨基)-乙酰基]-吡咯烷-2(S)-腈); Yamada 等在 1998 *Bioorg Med Chem Lett* 8, 1537-1540 所公开的 TSL-225(色氨酸基-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸); Asworth 等在 1996 *Bioorg Med Chem Lett* 6,1163-1166 及 2745- 2748 所公开的 2-氰基吡咯烷酰胺和 4-氰基吡咯烷酰胺; Sudre 等在 2002 *Diabetes* 51, 1461-1469 (Ferring) 所公开的 FE-999011 以及在 WO 01/34594 (Guilford) 中所公开的化合物, 并且所用剂量如以上参考文献中所述。

用于与 QC 效应物联合使用的更优选的 DPIV 抑制剂为二肽化合物，其中氨基酸优选为选自天然氨基酸如亮氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺和天冬氨酸。根据本发明使用的二肽样化合物当浓度（二肽化合物的浓度）为 10 μ M 时，血浆二肽基肽酶 IV 或 DPIV 样酶的活性下降至少 10%，尤其为至少 40%。通常也期望体内活性下降至少 60%或至少 70%。优选的化合物也可表现为活性最多下降 20%或 30%。

优选的二肽化合物为：N-缬氨酰-脯氨酰、O-苯甲酰羟胺、丙氨酰吡咯烷、异亮氨酰噻唑烷样 L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-苏-异亮氨酰吡咯烷及其盐，尤其是反丁烯二酸盐和 L-别-异亮氨酰吡咯烷及其盐。特别优选的化合物为：谷氨酰胺酰基吡咯烷和谷氨酰胺酰基噻唑烷、H-Asn-吡咯烷、H-Asn-噻唑烷、H-Asp-吡咯烷、H-Asp-噻唑烷、H-Asp (NHOH)-吡咯烷、H-Asp (NHOH)-噻唑烷、H-Glu-吡咯烷、H-Glu-噻唑烷、H-Glu (NHOH)-吡咯烷、H-Glu (NHOH)-噻唑烷、H-His-吡咯烷、H-His-噻唑烷、H-Pro-吡咯烷、H-Pro-噻唑烷、H-Ile-azididine、H-Ile-吡咯烷、H-L-别-Ile-噻唑烷、H-Val-吡咯烷和 H-Val-噻唑烷，及其药物学可接受的盐。这些化合物记载于 WO 99/61431 及 EP 1 304 327 中。

此外，本发明提供 QC 效应物与底物样（substrate-like）肽类化合物联合在竞争性调节二肽基肽酶 IV 催化中的应用。优选的肽类化合物为：2-氨基辛酸-Pro-Ile、Abu-Pro-Ile、Aib-Pro-Ile、Aze-Pro-Ile、Cha-Pro-Ile、Ile-Hyp-Ile、Ile-Pro-别-Ile、Ile-Pro-叔丁基-Gly、Ile-Pro-Val、Nle-Pro-Ile、Nva-Pro-Ile、Orn-Pro-Ile、Phe-Pro-Ile、Phg-Pro-Ile、Pip-Pro-Ile、Ser(Bzl)-Pro-Ile、Ser(P)-Pro-Ile、Ser-Pro-Ile、叔丁基-Gly-Pro-D-Val、叔丁基-Gly-Pro-Gly、叔丁基-Gly-Pro-Ile、叔丁基-Gly-Pro-Ile-酰胺、叔丁基-Gly-Pro-叔丁基-Gly、叔丁基-Gly-Pro-Val、Thr-Pro-Ile、Tic-Pro-Ile、Trp-Pro-Ile、Tyr(P)-Pro-Ile、Tyr-Pro-别-Ile、Val-Pro-别-Ile、Val-Pro-叔丁基-Gly、Val-Pro-Val 及其药物学可接受的盐，其中叔丁基-Gly 定义为：



而 Ser(Bzl)和 Ser(P)分别定义为苄基丝氨酸和磷酸基丝氨酸。Tyr(P)定义为磷酸基酪氨酸。这些化合物公开于 WO 03/002593 中。

根据本发明可与 QC 效应物联合使用的其他优选的 DPIV 抑制剂为肽基酮，例如：

- 2-甲基羰基-1-N-[(L)-丙氨酰-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷氢溴酸盐，
- 2-甲基羰基-1-N-[(L)-缬氨酰-(L)-丙氨酰-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷氢溴酸盐，
- 2-[(乙酰基-氧-甲基)羰基]-1-N-[(L)-丙氨酰-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷氢溴酸盐，
- 2-[苯甲酰-氧-甲基)羰基]-1-N-[(L)-丙氨酰]-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷氢溴酸盐，
- 2-[(2,6-二氯苄基)硫甲基]羰基]-1-N-[(L)-丙氨酰]-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷，
- 2-[苯甲酰-氧-甲基)羰基]-1-N-[甘氨酰-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷氢溴酸盐，
- 2-[(1,3-噻唑-2-基)羰基]-1-N-[(L)-丙氨酰]-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷三氟乙酸盐，
- 2-[(苯并噻唑-2-基)羰基]-1-N-[N-[(L)-丙氨酰]-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷三氟乙酸盐，
- 2-[(苯并噻唑-2-基)羰基]-1-N-[(L)-丙氨酰]-甘氨酰]-(2S)-吡咯烷三氟乙酸盐，
- 2-[(吡啶-2-基)羰基]-1-N-[N-[(L)-丙氨酰]-(L)-缬氨酰]-(2S)-吡咯烷三氟乙酸盐

以及它们的其它药物学可接受的盐。这些化合物于 WO 03/033524 中已公开。

此外,根据本发明取代的氨基酮可与 QC 效应物联合使用。优选的取代的氨基酮为:

- 1-环戊基-3-甲基-1-氧代-2-戊烷氯化铵,
- 1-环戊基-3-甲基-1-氧代-2-丁烷氯化铵,
- 1-环戊基-3,3-二甲基-1-氧代-2-丁烷氯化铵,
- 1-环己基-3,3-二甲基-1-氧代-2-丁烷氯化铵,
- 3-(环戊基羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉氯化物,
- N-(2-环戊基-2-氧乙基)环己烷氯化铵

以及它们的其它药物学可接受的盐。

在罕见的脯氨酸特异性蛋白酶中, DP IV 最初被认为是唯一的作为多肽链氨基末端倒数第二个残基的脯氨酸特异性膜结合酶。然而,其它分子,甚至是那些结构与 DP IV 非同源但有相应活性的分子也已确定。迄今所确定的 DP IV 样酶包括如 Sedo 和 Malik (Sedo 和 Malik 2001, *Biochim Biophys Acta*, 36506, 1-10) 及 Abbott 和 Gorrell (Abbott, C. A. 和 Gorrell, M. D. 2002 In: Langner & Ansorge (ed.), *Ectopeptidases*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 171-195) 在综述文章中所记载的成纤维细胞激活蛋白 α 、二肽基肽酶 IV β 、二肽基氨肽酶样蛋白、N-乙酰化的 α -连接的酸性二肽酶、休眠细胞脯氨酸二肽酶、二肽基肽酶 II、吸诱素 (attractin) 和二肽基肽酶 IV 相关蛋白 (DPP 8)、DPL1 (DPX, DP6)、DPL2 以及 DPP 9。最近报道了二肽基肽酶 10 (DPP 10) 的克隆及表征 (Qi, S. Y.等, *Biochemical Journal Immediate Publication*. Published on 28 Mar 2003 as manuscript BJ20021914)。

此处所用的术语效应物定义为与酶结合并提高或降低其体外和/或体内活性的分子。某些酶具有影响其催化活性的小分子的结合位点;刺激分子 (stimulator molecule) 被称为激活剂。酶甚至具有识别多于一种激活剂

或抑制剂的多个结合位点。酶可探测（detect）多种分子的浓度并利用该信息改变其自身活性。

由于酶既可呈现活性构象也可呈现非活性构象，因此效应物可以调节酶活性：激活剂是正效应物，抑制剂是负效应物。效应物不仅在酶的活性位点起作用，而且还在调节位点或变构位点起作用，这些术语是用于强调调节位点是不同于催化位点的酶的要害，并用于区分这种调节形式与催化位点的底物和抑制剂间的竞争(Darnell, J., Lodish, H.和 Baltimore, D. 1990, Molecular Cell Biology 2nd Edition, Scientific American Books, New York, 63 页)。

本发明的优选的效应剂是 QC 活性和 EC 活性的抑制剂。最优选的效应剂是 QC 活性和 EC 活性的竞争性抑制剂。

在适当的情况下，QC 和 EC 活性的激活剂是优选的。

根据以下常规列表，本发明肽中的每个氨基酸残基都用对应于该氨基酸俗名的一个字母或三个字母名称来表示：

<u>氨基酸</u>	<u>单字母符号</u>	<u>三字母符号</u>
甘氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
甲硫氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp

酪氨酸
缬氨酸

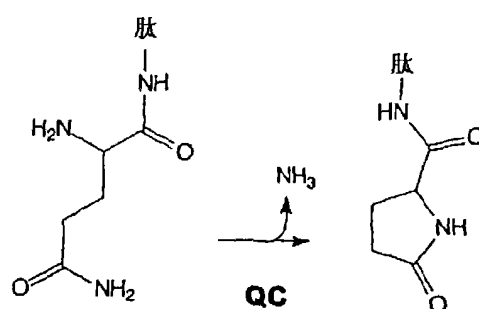
Y
V

Tyr
Val

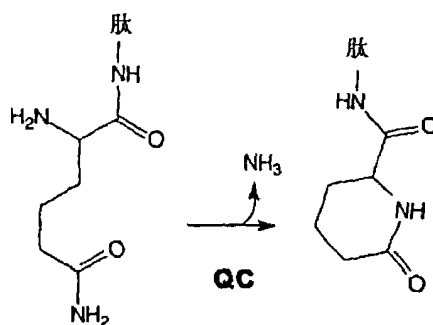
此处所用的术语“QC”包括谷氨酰胺酰基环化酶（QC）和 QC 样酶。QC 和 QC 样酶具有相同或相似的酶活性，进一步定义为 QC 活性。在这一方面，QC 样酶在分子结构上可根本不同于 QC。

此处所用的术语“QC 活性”定义为 N-末端谷氨酰胺残基转化为焦谷氨酸（pGlu*）或 N-末端 L-高谷氨酰胺或 L-β-高谷氨酰胺转化为环状焦-高-谷氨酰胺衍生物，同时释放出氨的分子内环化作用。参见路线 1 和 2。

路线 1：QC 对谷氨酰胺的环化



路线 2：QC 对 L-高谷氨酰胺的环化



此处所用术语“EC”包括 QC 和 QC 样酶作为谷氨酸环化酶（EC）的副活性，进一步定义为 EC 活性。

此处所用术语“EC 活性”定义为 N-末端谷氨酸残基被 QC 转化为焦谷氨酸（pGlu*）的分子内环化作用。参见路线 3。

具有 N-末端谷氨酰胺残基并因此为 QC 酶底物的生理学活性的肽的氨基酸序列列于表 2:

表 2: 具有 N-末端谷氨酰胺残基的生理学活性肽的氨基酸序列, 该谷氨酰胺残基被翻译后转化为焦谷氨酸 (pGlu)

肽	氨基酸序列	功能
胃泌素 17 Swiss-Prot : P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF(酰胺)	胃泌素刺激胃粘膜产生并分泌盐酸并刺激胰腺分泌消化酶。胃泌素还刺激平滑肌收缩和增加血液循环及胃肠道分泌水分。
神经降压肽 Swiss-Prot : P30990	QLYENKPRRP YIL	神经降压肽在调节脂肪代谢中起内分泌或旁分泌的作用。它引起平滑肌收缩。
FPP	QEP 酰胺	在精液浆中发现的与促甲状腺素释放激素 (TRH) 有关的三肽。最近获得的体外和体内证据表明 FPP 在调节精子生育能力方面起重要作用。
TRH Swiss-Prot : P20396	QHP 酰胺	TRH 在前脑垂体腺中起着 TSH 生物合成的调节剂的功能, 并在中枢和外周神经系统中起着神经递质/神经调质的功能。
GnRH Swiss-Prot : P01148	QHWSYGL RP (G) 酰胺	刺激促性腺激素分泌; 刺激黄体化 (luteinizing) 及促卵泡激素的分泌。
CCL16 (小的可诱导细胞因子 A16) Swiss-Prot : O15467	QPKVPEW VNTPTSCCLK YYEKVLPRRL YYGYRKALNC HLPALIFVTK RNREVCNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLSQ	对淋巴细胞和单核细胞但不对嗜中性粒细胞表现趋化活性。也表现强效的骨髓抑制 (myelosuppressive) 活性, 抑制髓祖细胞增殖。重组 SCYA16 对单核细胞和 THP-1 单核细胞但不对静息淋巴细胞和嗜中性粒细胞表现趋化活性。诱导经预先表达 RANTES 脱敏的 THP-1 细胞的钙流。
CCL8 (小的可诱导的细胞因子 A8) Swiss-Prot : P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIQIRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP	吸引单核细胞、淋巴细胞、嗜碱细胞和嗜曙红细胞的趋化因子。可能在瘤形成和炎症宿主应答中起作用。该蛋白可结合肝素 (heparin)。
CCL2 (小的可诱导细胞因子 A2) Swiss-Prot : P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT	吸引单核细胞和嗜碱细胞但不吸引嗜中性粒细胞或嗜曙红细胞的趋化因子。增强单核细胞的抗肿瘤活性。有涉及在以单核细胞渗透为特征性疾病如银屑病、类风湿性关节炎或动脉粥样硬化症的发病机理的迹象。可能涉及动脉粥样硬化症期间将单核细胞募集

		到动脉壁上。与 CCR2 及 CCR4 结合。
CCL18 (可诱导的小细胞因子 A18) Swiss-Prot : P55774	QVGTNKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	吸引淋巴细胞但不吸引嗜单核细胞或粒细胞的趋化因子。可能涉及 B 细胞迁移进入淋巴结中的 B 细胞小囊内。吸引幼 T 淋巴细胞至淋巴结中的树枝状细胞及活化的巨噬细胞, 对幼 T 细胞、CD4+ 和 CD8+ T 细胞有趋化活性并因此可能在体液和细胞介导的免疫应答中起作用。
分形素 (神经趋化素 neurotactin) Swiss-Prot : P78423	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASCGK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRTTPAAGG MDESYYLEPE ATGESSLEP TPSSQEAQRA LGTSPCLPTG VTGSSGTRL PTPKAQDGGP VGTELFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWGQ GQSPRPENSL EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMHVSVVP VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLITP VPDAQAATRR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCPR KMAGEMA EGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	可溶形式对 T 细胞和单核细胞但不对嗜中性粒细胞有趋化性。膜结合形式促进白细胞粘附于内皮细胞。可能在调节白细胞粘附于内皮和迁移过程中起作用。与 cx3cr1 结合。
CCL7(小的可诱导的细胞因子 A7) Swiss-Prot : P80098	QPVGIN TSTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWWQDFMKHL DKKTQTPKL	吸引单核细胞和嗜曙红细胞但不吸引嗜中性粒细胞的趋化因子。增强单核细胞的抗肿瘤活性。也促进白明胶酶 B 的释放。该蛋白可键合肝磷脂。键合于 CCR1、CCR2 以及 CCR3。
胖素 A(下丘泌素-1) Swiss-Prot : O43612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGILTL	可能通过协调这些互补的平衡功能的复杂行为和生理应答而在调节食物摄取和失眠中起到显著作用的神经肽。它在能量代谢、自主功能、激素平衡以及体液调节的平衡调节方面还起到更广泛的作用。胖素-A 以高亲和力与 OX1R 及 OX2R 结合。
P 物质	RPK PQQFFGLM (残基 1-4 剪切后 Gln ⁵ 环化)	属于速激肽。速激肽是兴奋神经元、唤醒行为应答的活性肽, 是强效的血管扩张剂和促分泌素, 并且可以收缩(直接或间接)很多平滑肌。

在第四个具体实施方案中,肽 Gln¹-胃泌素(17 和 34 个氨基酸长度)、Gln¹-神经降压肽以及 Gln¹-FPP 被确定为新的 QC 生理底物。胃泌素、神经降压肽以及 FPP 在它们的 N-末端位置均含 pGlu 残基。对所有的肽来说,经发现该 N-末端 pGlu 残基是通过 QC 催化由 N-末端谷氨酰胺生成。结果,将 N-末端谷氨酰胺残基转化为 pGlu 时,这些肽的生物学功能就被激活。

跨上皮信号传导细胞 (transepithelial transducing cell), 尤其是胃泌素 (G) 细胞在食物进入胃后共同调节胃酸的分泌。最近的研究表明胃泌素前体产生多种活性产物, 并且胃泌素的生物合成中有多个控制点。生物合成的前体和中间体 (前胃泌素和 Gly-胃泌素) 是推定的生长因子; 其产物, 酰胺化的胃泌素调节上皮细胞增殖、产酸性 (acid-producing) 壁细胞和分泌组胺的肠嗜铬细胞样 (ECL) 细胞的分化、以及与 ECL 细胞内的组胺合成及贮存有关的基因表达, 以及剧烈刺激酸分泌。胃泌素还刺激表皮生长因子 (EGF) 家族成员的生成, 其又抑制壁细胞功能而刺激表面表皮细胞的生长。血浆胃泌素浓度在具有幽门螺杆菌的患者中升高, 已知这些患者有较高的患十二指肠溃疡和胃癌的风险 (Dockray, G. J. 1999 *J Physiol* 15 315-324)。

已知由胃窦 G 细胞释放的肽激素胃泌素可以通过 CCK-2 受体刺激自泌酸粘膜中 ECL 细胞合成并释放组胺。经动员的组胺通过结合位于壁细胞上的 H(2)受体诱导酸分泌。最近的研究表明, 胃泌素无论是完全酰胺化形式还是加工较少的形式 (前胃泌素和甘氨酸延长的胃泌素), 都是胃肠道的生长因子。已经确定酰胺化的胃泌素的主要营养作用是针对胃泌酸粘膜, 其中胃泌素引起胃干细胞和 ECL 细胞的增殖提高, 结果导致壁细胞和 ECL 细胞质量增加。另一方面, 加工较少的胃泌素 (例如, 甘氨酸延长的胃泌素) 的主要营养靶标似乎是结肠粘膜 (Koh, T. J. 和 Chen, D. 2000 *Regul Pept* 9337-44)。

在第五个具体实施方案中，本发明提供活性增强的 QC 效应物在刺激胃肠道细胞尤其是胃粘膜细胞及上皮细胞增殖、生酸壁细胞和分泌组胺的肠嗜铬细胞样（ECL）细胞的分化、与 ECL 细胞内组胺合成及贮存有关的基因表达、以及在通过维持或提高活性[pGlu¹]胃泌素的浓度刺激哺乳动物剧烈分泌酸中的应用。

在第六个具体实施方案中，本发明提供 QC 活性减弱效应物在通过降低无活性的 Gln¹-胃泌素向活性[pGlu¹]胃泌素的转化率而治疗哺乳动物中十二指肠溃疡、伴随或不伴随幽门螺杆菌的胃癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征中的应用。

神经降压肽（NT）是与精神分裂症病理生理学相关的神经肽，它能特异性调节以前已证明在该病症中被误调整的神经递质系统。其中测定脑脊液（CSF）NT 浓度的临床研究表明 CSF NT 浓度降低的一亚类精神分裂症患者通过有效的抗精神病药物治疗得以恢复。同样存在大量证据表明在抗精神病药物作用机制中涉及 NT 系统。中枢给药 NT 与全身给药抗精神病药物在行为和生物化学效应上非常相似，并且抗精神病药物可提高 NT 神经传递。这一连串的发现使得可假设 NT 起着内源性抗精神病药物的作用。此外，典型和非典型的抗精神病药物能区别地改变黑质纹状区和中脑缘多巴胺末端区域中的 NT 神经传递，并且这些作用分别是副反应倾向及效力的先兆（Binder, E. B. 等，2001 *Biol Psychiatry* 50 856-872）。

在第七个具体实施方案中，本发明提供 QC 的活性增强效应物在制备抗精神病药物和/或在治疗哺乳动物的精神分裂症中的应用。QC 效应物维持或提高活性[pGlu¹]神经降压肽的浓度。

在精液浆中发现了一种与促甲状腺素释放激素（TRH）相关的三肽，受精促进肽（FPP）。最近获得的体外和体内的证据表明 FPP 在调节精子生育力方面发挥重要作用。具体而言，FPP 最初刺激无剩余力的（无能力的）精子“接通（switch on）”，使之更快地具有生育力，但之后获得能育

力致使精子不会自发产生顶体损失并因此不会失去受精能力。通过已知能调节腺苷酰基环化酶 (AC) /cAMP 信号转导途径的腺苷可以模拟甚至事实上放大这些应答。已发现 FPP 和腺苷两者都能刺激无生育力的细胞中 cAMP 的生成但在有生育力的细胞中抑制其生成, 而 FPP 受体可以某种方式与腺苷受体和 G 蛋白相互作用以实现 AC 的调控。这些事件能影响各种蛋白的酪氨酸磷酸化状况, 其中某些在最初的“接通”中很重要, 另一些可能与顶体反应本身有关。在精液浆中还发现了降钙素和血管紧张素 II, 它们在体外对无生育能力的精子有相似的作用, 并且可以放大对 FPP 的应答。这些分子在体内具有类似的作用, 通过刺激然后维持生育能力从而影响生育力。是 FPP、腺苷、降钙素以及血管紧张素 II 的可用性降低或其受体的缺陷促成了男性不育症 (Fraser, L. R. 和 Adeoya-Osiguwa, S. A. 2001 *Vitam Horm* 63, 1-28)。

在第八个具体实施方案中, 本发明提供 QC 活性降低效应物在制备避孕药物和/或在降低哺乳动物的生育力中的应用。QC 的活性降低效应物可降低活性 [pGlu¹] FPP 的浓度, 抑制精子的能育力以及导致精细胞失活。相反, 已发现 QC 的活性增强效应物能刺激男性生育力并治疗不育症。

在第九个具体实施方案中, 本发明中鉴定了更多的 QC 生理底物。它们是 Gln¹- CCL2、Gln¹- CCL7、Gln¹- CCL8、Gln¹- CCL16、Gln¹- CCL18 以及 Gln¹-分形素。具体参见表 2。这些多肽在诸如髓祖细胞增殖抑制、瘤形成、炎性宿主应答、癌症、银屑病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化症、体液及细胞介导的免疫应答、内皮中白细胞的粘附及迁移过程以及与阿尔茨海默症、FBD 和 FDD 相关的炎症过程等病理生理状态中发挥重要作用。

最近的临床试验研究了几种抗肝炎 B、人免疫缺陷病毒和黑素瘤的基于细胞毒性 T 淋巴细胞肽的疫苗。令人感兴趣的一种可单独使用或与其它肿瘤抗原联合使用的黑素瘤候选疫苗为十肽 ELA。该肽是具有 N-末端谷氨酸的 Melan-A/MART-1 抗原免疫显性肽类似物。已报道谷氨酸的氨基

和 γ -羧基以及谷氨酰胺的氨基和 γ -羧酰胺基团很容易缩合生成焦谷氨酸衍生物。为克服这一稳定性问题，已开发若干用焦谷氨酸代替 N-末端谷氨酰胺或谷氨酸而不损失药理学性质的有药理学意义的多肽。不过，与 ELA 相比，焦谷氨酸衍生物（PyrELA）及 N-末端乙酰化封端的衍生物（AcELA）不能引发细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）活性。尽管在 PyrELA 和 AcELA 引入貌似很小的修饰，但这两种衍生物很可能对特定的 I 类（specific class I）主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex）比 ELA 具有更低的亲和力。因此，为保存完整的 ELA 活性，必须避免生成 PyrELA（Beck A.等 2001, *J Pept Res* 57(6): 528-38）。最近已发现谷氨酰胺酰基环化酶（QC）在黑素瘤中也过度表达（Ross D. T 等，2000, *Nat Genet* 24: 227-35）。

在第十个具体实施方案中，本发明提供 QC 效应物在制备用于治疗病理生理状态如髓祖细胞增殖抑制、瘤形成、炎性宿主应答、癌症、恶性转移（malign metastasis）、黑素瘤、银屑病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化症、体液和细胞介导的免疫应答障碍、内皮中白细胞的粘附及迁移过程以及与阿尔茨海默症、FBD 和 FDD 相关的炎症过程的药物中的应用。

在第十一个具体实施方案中，本发明确定 Gln¹-肽素 A 为 QC 的生理底物。肽素 A 是一种可能通过协调这些互补的平衡功能（complementary homeostatic function）的复杂行为及生理反应而在调节食物摄取和失眠中起重要作用的神经肽。它还在能量代谢、自主功能、激素平衡和体液调节等平衡调节中起作用。

在第十二个具体实施方案中，本发明提供 QC 效应物在制备用于治疗食物摄取障碍及失眠、能量代谢平衡调节障碍、自主功能障碍、激素平衡障碍和体液调节障碍的药物中的应用。

若干蛋白中的多聚谷氨酰胺的扩展导致神经退行性疾病，如帕金森氏症和肯尼迪症。其机制在很大程度上仍然未知。多聚谷氨酰胺复制的生化

性质提出一种可能的解释：焦谷氨酸形成之前谷氨酰胺酰基-谷氨酰胺酰基键的内分解断裂可能通过增加多聚谷氨酰胺酰基蛋白的分解代谢稳定性、疏水性、淀粉样变性生成（amyloidogenicity）和神经毒性从而有助于发病机制的形成（Saïdo, T; *Med Hypotheses* (2000) Mar, 54 (3): 427-9）。

因此在第十三个具体实施方案中，本发明提供 QC 效应物在制备治疗帕金森氏症和亨廷顿舞蹈症（Huntingon's disease）的药物中的应用。

在第十四个具体实施方案中，本发明提供一种降低或抑制 QC 酶活性的一般方法。还提供抑制性化合物的实例。

哺乳动物 QC 的抑制作用最初仅在 1, 10-二氮杂菲和还原的 6-甲基蝶呤中检测到（Busby, W. H. J.等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536）。EDTA 并不抑制 QC，从而推断 QC 不是金属依赖性酶（Busby, W. H. J.等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J.等, 2001 *Biochemistry* 40, 11246-11250, Booth, R. E.等, 2004 *BMC Biology* 2）。然而，正如通过 1,10-二氮杂菲、吡啶二羧酸、8-羟基喹啉及其它螯合剂（图 18, 19）对 QC 的抑制特性以及通过过渡金属离子（图 20）使 QC 再活化所揭示，本发明发现人 QC 和其它动物的 QC 为金属依赖性酶。最后，通过与其它金属依赖性酶的序列比较展示出金属依赖性，表明人 QC 中也保存有螯合氨基酸残基（图 21）。化合物与活性位点结合金属离子的相互作用代表降低或抑制 QC 活性的一般方法。

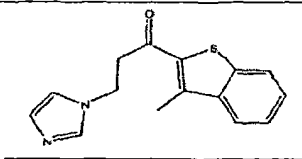
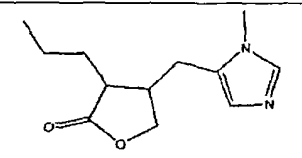
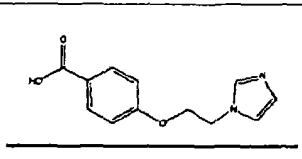
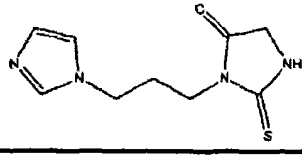
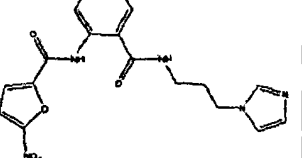
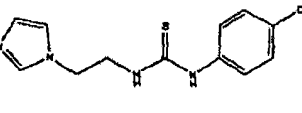
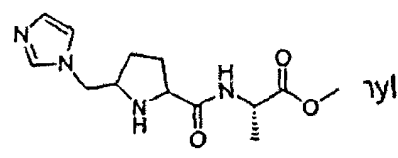
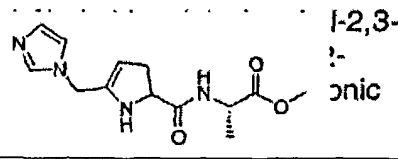
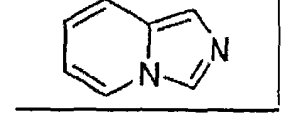
本发明发现咪唑衍生物为强效的 QC 抑制剂。通过连续试验（详情见实施例 2）分析了许多咪唑衍生物抑制作为高度保守的哺乳动物 QC 的一员的人 QC 的能力。

因此，本发明提供咪唑衍生物和组氨酸及其衍生物作为 QC 的活性降低效应物以及它们在抑制类型和效力方面的特征。其结构及 K_i 值见表 3 和 4。结果详细记载于实施例 7 中。

表 3：人 QC 催化的反应中咪唑衍生物的抑制常数。在 30℃、pH 8.0、含 5 mM EDTA 的 0.05 M Tris-HCl 中进行测定。

化合物	K _i 值 (mM)	结构
核心结构		
咪唑	0.103 ± 0.004	
苯并咪唑	0.138 ± 0.005	
N-1 衍生物		
1-苄基咪唑	0.0071 ± 0.0003	
1-甲基咪唑	0.030 ± 0.001	
1-乙烯基咪唑	0.049 ± 0.002	
草酸二咪唑烷酰胺	0.078 ± 0.002	
N-乙酰基咪唑	0.107 ± 0.003	
N-(三甲基甲硅烷基)-咪唑	0.167 ± 0.007	
N-苯甲酰基咪唑	0.174 ± 0.007	
1-(2-氧-2-苄基-乙基)-咪唑	0.184 ± 0.005	
1-(3-氨基丙基)-咪唑	0.41 ± 0.01	
1-苄基咪唑	无抑制作用	
1,1'-磺酰二咪唑	无抑制作用	
C-4 (5) 衍生物		
N-ω-乙酰基组氨酸	0.017 ± 0.001	
L-组氨酸酰胺	0.56 ± 0.04	
H-His-Trp-OH	0.60 ± 0.03	
L-组氨酸醇	1.53 ± 0.12	
L-组氨酸	4.4 ± 0.2	
4-咪唑-甲醛	7.6 ± 0.7	
咪唑-4-碳酸甲酯	14.5 ± 0.6	
L-组胺	0.85 ± 0.04	
C-4,5 衍生物		
5-羟甲基-4-甲基-咪唑	0.129 ± 0.005	
4-氨基-咪唑-5-碳酸酰胺	15.5 ± 0.5	
4,5-二苄基-咪唑	无抑制作用	
4,5-二氰基咪唑	无抑制作用	
C-2 衍生物		
2-甲基-苄基咪唑	0.165 ± 0.004	
2-乙基-4-甲基-咪唑	0.58 ± 0.04	
2-氨基苯并咪唑	1.8 ± 0.1	
2-氯-1H-苯并咪唑	无抑制作用	

其它

3-(1H-咪唑-1-基)-1-(3-甲基苯并[b]噻吩-2-基)丙-1-酮	0.0025 ± 0.0001	
4-[(1-甲基-1H-咪唑-5-基)甲基]-3-丙基二氢呋喃-2-(3H)-酮	0.0067 ± 0.0003	
4-[2-(1H-咪唑-1-基)-乙氧基]苯甲酸	0.0034 ± 0.0001	
3-[3-(1H-咪唑-1-基)丙基]-2-硫代咪唑烷-4-酮	0.00041 ± 0.00001	
5-硝基-2-[2-[(3-(1H-咪唑-1-基)-丙基)氨基]羰基]苯基]糠酰胺	0.0066 ± 0.0004	
N-(4-氯苯基)-N'-[2-(1H-咪唑-1-基)乙基]硫脲	0.00165 ± 0.00007	
	0.0322 ± 0.0007	
 1,2,3- -onic	n. d.	
咪唑并<1.5a>吡啶	0.0356 ± 0.0005	

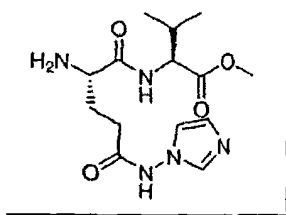
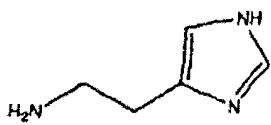
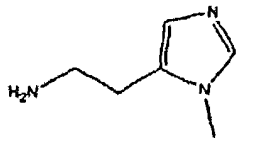
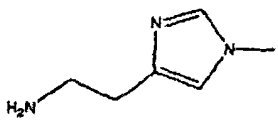
甲基 (2S)-2-{[(2S)-2-氨基-5-(1H-咪唑-1-基氨基)-5-氧代戊酰基]氨基}-3-甲基丁酸酯	0.164 ± 0.004	
---	-------------------	---

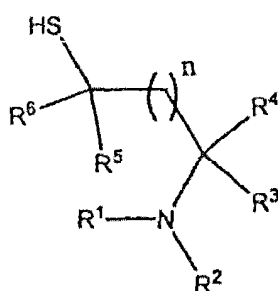
表 4: L-组胺及其两生物活性代谢物（也称为 tele-甲基组胺）对 QC 的抑制作用。

化合物	K_i 值 (mM)	结构
L-组胺	0.85 ± 0.04	
3-甲基-4-(β-氨基乙基)-咪唑	0.120 ± 0.004	
1-甲基-4-(β-氨基乙基)-咪唑	n. i.	

在第十五个实施方案中，本发明提供了基于巯基乙胺的新的 QC 和 QC 样酶的抑制剂。

除了咪唑衍生物和羟肟酸 (Hydroxamates) 以外，巯基试剂也经常被被认为是金属依赖性酶 (Lowther, W. T. and Matthews, B. W. 2002 *Chem Rev* 102, 4581-4607; Lipscomb, W. N. and Strater, N. 1996 *Chem Rev* 96,2375-2433)。此外，巯基肽被认为是 Clan MH 的 QC 相关性氨肽酶的抑制剂 (Huntington, K. M. et al. 1999 *Biochemistry* 38,15587-15596)。尽管这些抑制剂对于哺乳动物 QC 而言是没有活性的，但有可能分离巯基乙胺衍生物作为有效的 QC 抑制剂 (图 23)。

本发明提供了可由通式 1 概括表示的 QC 抑制剂或其药用可接受的盐，包括所有的立体异构体：



通式 1

其中 $R^1 \sim R^6$ 独立地为 H 或分枝的或非分枝的烷基链、分枝的或非分枝的烯基链、分枝的或非分枝的炔基链、碳环基、芳基、杂芳基、杂环基、氮杂氨基酸、氨基酸或其模拟物、肽或其模拟物；所有上述残基均任选地是取代的，且

n 可以是 0-2，优选地是 1，最优选地是 0。

在说明书和权利要求书中，术语“烷基”可代表 C_{1-50} 的烷基，优选地为 C_{1-30} 的烷基，特别优选地为 C_{1-12} 或 C_{1-8} 的烷基；例如，烷基可以是甲基、乙基、丙基、异丙基或丁基。术语“烷(alk)”，例如在“烷氧基”中，以及术语“烷(alkan)”，例如在“烷酰基”中，被定义为“烷基”；芳香(“芳基”)化合物为优选地取代的或任选地非取代的苯基、苯甲基、萘基、联苯或蒽基，优选地具有至少 8 个 C 原子；术语“烯基”可代表 C_{2-10} 烯基，优选地为 C_{2-6} 烯基，其可在任何所需位置具有双键，且可以是取代的或非取代的；术语“炔基”可代表 C_{2-10} 炔基，优选地为 C_{2-6} 炔基，其可在任何所需位置具有三键，且可以是取代的或非取代的；术语“取代的”或“取代基”可代表任何所需的一或多个、优选地一或两个烷基、烯基、炔基、一价或多价酰基、烷酰基、烷氧基烷酰基或烷氧基烷基的取代；上述取代基可以依次具有一或多个(但优选地为 0 个) 烷基、烯基、炔基、一价或多价酰基、烷酰基、烷氧基烷酰基或烷氧基烷基作为侧链。

在说明书和权利要求书中，术语“酰基”可代表 C_{1-20} 酰基残基，优选地为 C_{1-8} 酰基残基，且特别优选地为 C_{1-4} 酰基残基；且“碳环(碳环基)”

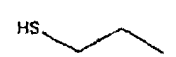
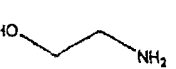
可代表 C₃₋₁₂ 碳环残基, 优选地为 C4、C5 或 C6 碳环。“杂芳基”被定义为芳基, 其中 1 至 4 个, 更优选地 1、2 或 3 个环原子由杂原子如 N、S 或 O 所取代。“杂环”被定义为环烷残基 (cycloalkyl residue), 其中 1、2 或 3 个环原子由杂环原子如 N、S 或 O 所取代。

“肽模拟物”本身是本领域人员已知的。它们被优选地定义为具有类似于肽的二级结构和任选地其他结构特征的化合物; 它们的作用方式很大程度上与天然肽的作用方式类似或相同; 不过, 它们的活性 (如作为拮抗剂或抑制剂) 与天然肽相比是可以改变的, 特别是与受体或酶相比。此外, 它们可模拟天然肽 (激动剂) 的作用。肽模拟物的实例有支架模拟物 (scaffold mimetics)、非肽类模拟物、类肽(peptoides)、肽核酸、低聚吡咯啉酮 (oligopyrrolinones)、插烯肽 (vinylogpeptides) 和低聚氨基甲酸酯。关于这些肽模拟物的定义可参见 Lexikon der Chemie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 1999。

“氮杂氨基酸”被定义为如下的氨基酸, 其中手性 α -CH 基团被氮原子取代, 而“氮杂肽”被定义为如下的肽, 其中肽链中的一或多个氨基酸的手性 α -CH 基团被氮原子取代。

通过对比二甲基巯基乙胺、巯基乙胺、巯基乙醇、乙二胺、乙醇胺的抑制效力而概括说明巯基和氨基的作用, 如表 5 所示。只有那些具有氨基和巯基的化合物是有效的, 缺失或修饰两者中的任一种均导致抑制能力的下降。此外, 巯基乙胺、二甲基巯基乙胺和巯基乙醇对鼠 QC 的抑制作用的 pH 依赖性显示出不同, 提示抑制剂的质子化状态影响抑制剂与活性位点的结合 (图 22)。

图5 巯基乙胺衍生的化合物抑制QC的效力的对比 (n.i., 在浓度为5 mM, pH=8.0, 30 °C 和样品中的底物浓度为1 K_M的条件下没有检测到抑制作用, n. d., 未测定)

化合物	K _i - 值 (mM)	结构
巯基乙胺	0.043 ±0.002	
二甲基巯基乙胺	0.0190 ±0.0002	
二乙基巯基乙胺	0.0109 ±0.0004	
巯基乙醇	3.91 ±0.08	
乙硫醇	n.d.	
乙二胺	n.i.	
乙醇胺	n.i.	

出人意料的是，在酶活性表征期间发现除 N-末端谷氨酰胺酰基残基外，N-末端 β-高-谷氨酰胺酰基残基也具有作为植物和动物 QC 底物的性质。该 N-末端-高-谷氨酰胺酰基残基分别被人和木瓜 QC 催化转化为五元内酰胺环。结果记载于实施例 5 中。所应用的方法在实施例 2 中阐明而肽的合成按实施例 6 所述进行。

本发明另一优选的具体实施方案包括 QC 效应物的筛选方法。

从一组化合物中鉴别 QC 的活性修饰效应物的优选筛选方法包括以下步骤：

- 在允许它们相结合的条件下使 QC 接触所述化合物；
- 加入 QC 底物；
- 监测底物转化或任选地测定残余的 QC 活性；以及
- 计算底物转化率和/或 QC 酶活性的变化以鉴定活性修饰效应物。

另一优选的筛选方法涉及一种鉴定及选择直接或间接与 QC 活性位点结合的金属离子相互作用的效应物的方法，其包括以下步骤：

- a) 在允许它们相结合的条件下使 QC 接触所述化合物；
- b) 加入可被 QC 转化的 QC 底物；
- c) 监测底物转化或任选地测定残余的 QC 活性；以及
- d) 计算底物转化率和/或 QC 酶活性的变化，其中所述变化可用于鉴定 QC 的活性修饰效应物。

哺乳动物 QC 或木瓜 QC 优选用于上述的筛选方法中。由于这些筛选方法所鉴定的效应物将用于治疗哺乳动物尤其是人的疾病，所以哺乳动物 QC 尤其优选。

上述筛选方法所选择的药物可通过降低至少一种 QC 底物的转化（负效应物，抑制剂），或通过提高至少一种 QC 底物的转化（正效应物，激活剂）而起作用。

本发明的化合物可被转化为酸加成盐，尤其是药物学可接受的酸加成盐。

本发明化合物的盐可采用无机盐或有机盐的形式。

本发明化合物可被转化为及用作酸加成盐，尤其是药物学可接受的酸加成盐。药物学可接受的酸加成盐一般为其中将碱性侧链以无机酸或有机酸质子化的形式。代表性的有机酸或无机酸包括盐酸、氢溴酸、高氯酸、硫酸、硝酸、磷酸、醋酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、苦杏仁酸、甲磺酸、羟乙基磺酸、苯磺酸、草酸、哌酸（pamoic acid）、2-萘磺酸、对-甲苯磺酸、环己磺酸、水杨酸、糖精酸或三氟乙酸。本发明化合物的所有药物学可接受的酸加成盐形式均已包含在本发明的范围内。

鉴于游离化合物及其盐形式化合物间的紧密联系，只要是本文所涉及的化合物，若在这种情况下可能或适宜，其相应的盐也同样涵盖在内。

如果本发明的化合物具有至少一个手性中心，它们就可以对映异构体的形式存在。如果化合物具有两个或更多个手性中心，则它们可能额外以非对映异构体形式存在。应理解所有这种异构体及其混合物均涵盖在本发明的范围内。此外，化合物的某些晶体形式可能以多晶型形式存在，因此同样包含在本发明中。另外，某些化合物可能与水（即水合物）或常规有机溶剂形成溶剂化物，而这种溶剂化物同样也涵盖在本发明范围内。

包括其盐的化合物还可以其水合物的形式获得或包括用于其结晶的其它溶剂。

在另一具体实施方案中，本发明提供一种预防或治疗通过调节有此需要的患者的 QC 酶活性介导的疾病的方法，其包括以治疗该疾病治疗有效的量和给药方案给药本发明的任意化合物或其药物组合物。此外，本发明包括本发明化合物、及其药理学可接受的酸加成盐形式在制备用于预防或治疗由患者 QC 活性的调节介导的疾病的药物中的应用。所述化合物可通过任意常规给药途径向患者给药，包括但不限于静脉内、口服、皮下、肌肉内、皮内、胃肠外及其联合方式。

在另一优选的实施方式中，本发明涉及药物组合物，即药物，其包括至少一种本发明的化合物或其盐，任选地与一种或更多种药理学可接受的载体和/或溶剂相组合。

药物组合物可采用，如胃肠外或肠道剂型的形式并包含适当的载体，或它们可采用包含适于口服给药的载体的口服剂型的形式。它们优选为采用口服剂型的形式。

按照本发明给药的 QC 活性效应物可在药理学可给药的剂型或复合剂型（formulation complex）中用作抑制剂或与抑制剂、底物、伪底物（pseudosubstrate）、QC 表达抑制剂、结合蛋白或那些降低哺乳动物 QC 蛋白浓度的酶蛋白抗体联合使用。本发明化合物使根据患者及疾病单独地调整治疗成为可能，尤其是使避免个体不耐受性、过敏和副作用成为可能。

所述化合物还表现出活性程度随时间变化。从而使提供治疗的医生有机会对患者的个别情况作出不同的反应：他能精确调整一方面作用起效速率以及另一方面作用持续时间尤其是作用强度。

按照本发明优选的治疗方法代表预防或治疗由哺乳动物 QC 酶活性的调整介导的疾病的新方法。它非常简单，易于商业应用并适于尤其用于治疗哺乳动物特别是人类医学中基于生理活性 QC 底物浓度不平衡的疾病中，如表 1 和 2 所列。

该化合物有利地例如采用包含活性成分与常用添加剂如现有技术已知的稀释剂、赋形剂和/或载体相组合的药物制剂的形式给药。例如，它们可通过胃肠外（例如，i.v.生理盐水溶液）或肠道（例如口服给药，以常规载体配制）给药。

根据其内源稳定性和生物利用度，为达到所期望的血糖正常值标准，每天可给药单剂量或多剂量的所述化合物。例如，在人体中这种剂量范围可在每天大约 0.01 mg 至 250.0 mg 范围内，优选为在每千克体重约 0.01 至 100 mg 化合物的范围内。

通过向哺乳动物给药 QC 活性效应物可预防或减轻或治疗选自下列的疾病：阿尔茨海默症、唐氏综合征、家族性英国型痴呆 (FBD)、和家族性丹麦型痴呆 (FDD)、伴随或不伴随幽门螺杆菌感染的溃疡和胃癌、结直肠癌和 Zollinger-Ellison 综合征、致病性精神病、精神分裂症、不育症、瘤形成、炎性宿主应答、癌症、银屑病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化症、体液和细胞介导的免疫应答障碍、内皮中白细胞的粘附和迁移、食物摄取障碍、失眠、能量代谢平衡调节障碍、自主功能障碍、激素平衡障碍以及体液调节障碍。

此外，通过向哺乳动物给药 QC 活性效应物可刺激胃肠道细胞优选为胃粘膜细胞、上皮细胞的增殖、急性酸分泌以及产酸性壁细胞及分泌组胺的肠嗜铬样细胞的分化。

另外，向哺乳动物给药 QC 抑制剂可导致精细胞功能丧失从而抑制生育力。因此，本发明提供一种调节和控制男性生育力的方法以及 QC 的活性降低效应物在制备男性避孕药中的应用。

此外，通过向哺乳动物给药 QC 活性效应物可抑制髓祖细胞增殖。

因此按照本发明使用的化合物能以本身已知的方式利用惰性、无毒、药理学适当的载体和添加剂或溶剂转化为常规制剂，如片剂、胶囊、锭剂、丸剂、栓剂、颗粒剂、气雾剂、糖浆，液体、固体和膏状乳剂（cream-like emulsion）以及混悬剂和溶液剂。在每种剂型中，治疗有效的化合物优选在总混合物中为大约 0.1 到 80 重量%的浓度，更优选为 1 到 50 重量%的浓度，也就是说，采用足够获得上述剂量范围的量。

这些物质可作为锭剂、胶囊、可咀嚼胶囊（bitable capsule）、片剂、滴剂、糖浆形式的药物使用，或作为栓剂或鼻喷雾剂使用。

该剂型可便于制备，例如通过以溶剂和/或载体，任选地使用乳化剂和/或分散剂分散活性成分，可例如在将水用作稀释剂的情况下任选地使用有机溶剂作为辅助溶剂（auxiliary solvent）。

与本发明有关的有用的赋形剂的实例包括：水，无毒有机溶剂如石蜡（例如天然石油馏分）、植物油（例如油菜籽油、花生油、芝麻油）、醇（例如乙醇、甘油）、二醇（例如丙二醇、聚乙二醇）；固相载体如粉碎的天然矿物质（例如高分散硅石、硅酸盐）、糖（例如原糖、乳糖和葡萄糖）；乳化剂如非离子型和阴离子型乳化剂（例如聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪醇醚、烷基磺酸酯以及芳基磺酸酯）、分散剂（例如木素、亚硫酸盐溶液、甲基纤维素、淀粉以及聚乙烯吡咯烷酮）以及润滑剂（例如硬脂酸镁、滑石、硬脂酸及月桂基硫酸钠）以及任选的调味剂。

可通过常规方式给药，优选为肠道内或胃肠外给药，尤其是口服给药。就肠道内给药而言，除上述载体外片剂可包含其他添加剂如柠檬酸钠、碳酸钙及磷酸钙，及其它各种添加剂如淀粉优选为马铃薯淀粉、明胶等。此外，可伴随使用润滑剂如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠及滑石用于压片。就用

于口服给药的水混悬剂和/或酞剂而言，除上述赋形剂外，活性成分中可加入各种矫味剂或着色剂。

就胃肠外给药而言，可以采用使用适当的液体载体的活性成分溶液。一般而言，已发现利于以下述方式给药获得有效的结果，就静脉内给药而言，每天约 0.01 到 2.0 mg/kg 体重，优选为约 0.01 到 1.0 mg/kg 体重的剂量，而就肠道内给药而言，剂量则每天约 0.01 到 2 mg/kg 体重，优选为约 0.01 到 1mg/kg 体重。

然而在一些情况下，根据试验动物或患者的体重或给药途径，还基于动物种类及其对药物的个体反应或进行给药的时间间隔，可能需要偏离上述的量。因此，在一些情况下使用少于上述最低的量就足够，而另一些情况下，可能不得超过所述的上限。在以相对大的量给药的情况下，将那些量分为一天内给药的几个单剂量是明智的。对于人类给药，可使用相同的剂量范围。上述评论类似地适用于该情况。

药物剂型的实例

1. 每个胶囊含 100 mg 本发明化合物的胶囊：

制备下列组合物的溶液用于制备约 10,000 个胶囊：

本发明的化合物	1.0 kg
甘油	0.5 kg
聚乙二醇	3.0 kg
水	<u>0.5 kg</u>
	5.0 kg

将该溶液以本领域已知的方式制成软明胶胶囊。该胶囊适于咀嚼或吞服。

2. 包含 100 mg 本发明化合物的片剂或包衣片剂或锭剂：

下述剂量用于制备 100,000 片片剂：

研细的本发明化合物	10.0 kg
-----------	---------

葡萄糖	4.35 kg
乳糖	4.35 kg
淀粉	4.50 kg
研细的纤维素	4.50 kg

将上述组份混合，然后提供由下列物质制备的溶液，

聚乙烯吡咯烷酮	2.0 kg
聚山梨醇酯	0.1 kg
以及水	约 5.0 kg

并以本领域已知的方式通过过筛（grating）所述湿颗粒，在加入 0.2 kg 硬脂酸镁后进行干燥来进行制粒。已完成的 30.0 kg 片剂混合物加工形成重量为 300 mg 的凸片。理论上，片剂可以本身已知的方式进行包衣或包糖衣。

贯穿本说明书所定义的药物组合物有利地包含至少一种 QC 活性效应物和至少一种 DP IV 抑制剂的组合。这种药物组合物尤其适用于阿尔茨海默症和唐氏综合征的治疗。

实施例

实施例 1：人和木瓜 QC 的制备

宿主株和培养基

根据厂商的说明书（Invitrogen）生长、转化并分析用于人 QC 表达的 *Pichia pastoris* 菌株 X33（AOX1, AOX2）。根据厂商的建议制备 *P. pastoris* 所需的培养基，即缓冲的甘油（BMGY）复合物或甲醇（BMMY）复合物培养基及发酵基础盐培养基。

编码人 QC 的质粒载体的分子克隆

所有的克隆步骤都应用标准的分子生物学技术进行。载体 pPICZ α B (Invitrogen) 用于在酵母中的表达。pQE-31 载体 (Qiagen) 用于在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达人 QC。将由密码子 38 起始的成熟 QC 的 cDNA 与质粒编码的 6 $\times$ 组氨酸标记 (tag) 符合读框地融合。利用引物 pQCyc-1 和 pQCyc-2 扩增和亚克隆后, 利用 *Sph*I 和 *Hind*III 的限制位点将片段插入表达载体中。

P. pastoris 的转化和小范围表达

根据厂商 (Qiagen) 的建议在 *E. coli* JM109 中扩增和纯化质粒 DNA。在所用的表达质粒 pPICZ α B 中, 提供了三个限制位点用于线性化。由于 *Sac*I 和 *Bst*XI 在 QC cDNA 内切割, 故选择 *Pme*I 来线性化。将 20-30 μ g 质粒 DNA 用 *Pme*I 进行线性化, 经乙醇沉淀, 溶于无菌、去离子水中。然后根据厂商 (BioRad) 说明书, 通过电穿孔将 10 μ g 的 DNA 用于感受态 (competent) *P. pastoris* 细胞的转化。在含有 150 μ g/ml Zeocin 的板上进行选择。一使用线性化质粒的转化可得到几百个转化体。

为测试用于 QC 表达的重组酵母克隆, 将重组体在含有 2 ml BMGY 的 10 ml 圆锥形试管中生长 24 h。随后, 该酵母经离心并重新悬浮于含 0.5% 甲醇的 2 ml BMMY 中。通过每 24 h 添加甲醇来维持该浓度直到 72 h。随后测定上清液中 QC 的活性。利用针对 6 $\times$ 组氨酸标记 (Qiagen) 的抗体通过蛋白质印迹免疫分析 (Western blot analysis) 证实了融合蛋白的存在。选出显示最高 QC 活性的克隆用于进一步试验和发酵。

发酵罐内的大范围表达

基本如“*Pichia* fermentation process guidelines” (Invitrogen) 所记载, 在 5 l 反应器 (Biostat B, B. Braun biotech) 中进行 QC 的表达。简单地说, 细胞是在补充痕量盐并以甘油作为单一的碳源的发酵基础盐培养基中 (pH 5.5) 培养。在最初的约 24h 的分批式操作 (batch phase) 期及随后约 5 h 的

不料分批操作 (fed-batch) 期间, 细胞质量增加。一旦细胞湿重达到 200 g/l, 使用甲醇利用三步喂养方案在约 60 h 的整个发酵时间内完成 QC 表达的诱导。随后, 通过以 $6000\times g$ 在 4°C 离心 15 min 将细胞从含 QC 的上清液中除去。通过加入 NaOH 调节 pH 至 6.8, 将所得混浊液以 $37000\times g$ 在 4°C 再次离心 40 min。如果还混浊, 使用纤维素膜 (孔径 $0.45\ \mu\text{m}$) 进行额外的过滤步骤。

在 *P. pastoris* 中表达的 6×组氨酸标记的 QC 的纯化

将 His 标记的 QC 首先通过固定金属亲和色谱 (IMAC) 进行纯化。在代表性的纯化中, 将 1000 ml 培养上清液应用于 Ni^{2+} -填充的 Chelating Sepharose FF 柱 ($1.6\times 20\ \text{cm}$, Pharmacia), 该柱用含 750 mM NaCl 的 50 mM, pH 6.8 的磷酸盐缓冲液以 5 ml/min 的流速平衡。用 10 倍柱体积的平衡缓冲液以及 5 倍柱体积的含 5mM 组氨酸的平衡缓冲液洗涤后, 通过改用含 150 mM NaCl 和 100 mM 组氨酸的 50 mM, pH 6.8 的磷酸盐缓冲液将结合蛋白质洗脱。所得洗脱液用 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 6.8, 在 4°C 进行透析过夜。随后, 通过阴离子交换色谱在用透析缓冲液平衡的 Mono Q6 柱 (BioRad) 上将 QC 进行进一步纯化。将含 QC 的组份以 4 ml/min 的流速上柱。然后将该柱用含 100 mM NaCl 的平衡缓冲液进行冲洗。通过两个梯度完成洗脱, 分别得到 30 或 5 倍柱体积的含 240 mM 和 360 mM NaCl 的平衡缓冲液。收集 6ml 馏分并通过 SDS-PAGE 分析其纯度。合并含同源 QC 的馏分并通过超滤浓缩。为长期储存 (-20°C), 可加入甘油至最终浓度为 50%。根据 Bradford 或 Gill 和 von Hippel (Bradford, M. M. 1976 *Anal Biochem* 72,248-254; Gill, S. C.和 von Hippel, P. H. 1989 *Anal Biochem* 182, 319-326.) 的方法对蛋白进行定量。

大肠杆菌中 QC 的表达和纯化

将编码 QC 的构建体 (construct) 转化进 M15 细胞 (Qiagen) 并在选

择性 LB 琼脂板上于 37℃ 下生长。于室温在含 1% 葡萄糖和 1% 乙醇的 LB 培养基上进行蛋白质表达。当培养物的 OD₆₀₀ 值达到约 0.8 时，用 0.1 mM IPTG 诱导表达过夜。经过一个冷冻和融化的循环后，通过加入在含 300 mM NaCl 和 2 mM 组氨酸的 50 mM、pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中的 2.5 mg/ml 溶菌酶进行约 30 min 的细胞溶解。通过以 37000×g 在 4℃ 离心 30 min 使该溶液澄清，随后应用玻璃粉(glass frit) (DNA 分离) 进行过滤以及应用纤维素过滤器对粗和细沉淀进行两个另外的过滤步骤。该上清液 (约 500ml) 以流速 1 ml/min 应用于 Ni²⁺-亲和柱 (1.6×20 cm)。用含 150 mM NaCl 和 100 mM 组氨酸的 50 mM 的磷酸盐缓冲液洗脱 QC。通过超滤将含 QC 的馏分浓缩。

来自木瓜胶乳的 QC 的纯化

根据之前报道的方法 (Zerhouni, S.等, 1989 *Biochim Biophys Acta* 138, 275-290) 的改良版本使用 BioCAD 700E (Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Germany) 进行木瓜胶乳 QC 的制备。如此处所述，将 50 g 胶乳溶于水并离心。用硫甲磺酸 S-甲酯实施蛋白酶的灭活，将所得粗提取物进行透析。透析之后，将整个上清液装在用 100 mM、pH 5.0 的乙酸钠缓冲液平衡的 SP 琼脂糖凝胶快速柱 (SP Sepharose Fast Flow column) (21×2.5 cm i. d.) 上 (流速 3 ml/min)。以 2 ml/min 的流速通过逐渐增加乙酸钠缓冲液的浓度在三步内完成洗脱。第一步为在 0.5 柱体积内采用 0.1 至 0.5 M 乙酸盐缓冲液的线性梯度。第二步为在四个柱体积内以 0.5 至 0.68 M 的线性增加缓冲液浓度。在最后的洗脱步骤中，应用一个柱体积的 0.85 M 的缓冲液。合并含最高酶活性的馏分 (6 ml)。通过超滤完成浓缩并将缓冲液变化为 0.02M Tris/HCl、pH 8.0 (Amicon, 膜分子量截留值 (cut-off) 为 10 kDa)。

将硫酸铵加入到浓缩的由离子交换色谱步骤所得的木瓜酶中至最终浓度为 2 M。将该溶液应用于 (21×2.5 cm i. d.) 用 2 M 硫酸铵、0.02 M

Tris/HCl, pH 8.0 平衡的丁基琼脂糖凝胶 4 快速柱 (Butyl sepharose 4 Fast Flow column) (流速 1.3 ml/min) 上。减少硫酸铵的浓度, 在三步内完成洗脱。第一步中以 1.3 ml/min 的流速应用 0.5 个柱体积的 2 至 0.6 M 的硫酸铵、0.02 M Tris/HCl, pH 8.0 的线性梯度。第二步中以 1.5 ml/min 的流速应用 5 个柱体积 0.6 至 0 M 的硫酸铵、0.02 M Tris/HCl、pH 8.0 的线性梯度。通过以 1.5 ml/min 的流速应用 2 个柱体积的 0.02 M Tris/HCl、pH 8.0 来进行最后的洗脱步骤。合并所有含 QC 活性的馏分, 并通过超滤浓缩。所得的同源 QC 在 -70°C 储存。使用 Bradford 法与由牛血清白蛋白得到的标准曲线相比较测定最终的蛋白浓度。

实施例 2: 谷氨酰胺酰基环化酶活性的测定

荧光分析

所有的测定在 30°C 下用 BioAssay Reader HTS-7000Plus 微孔板读板器 (Perkin Elmer) 完成。QC 活性使用 H-Gln- β NA 利用荧光测定法评估。该样品是由 0.2 mM 荧光底物、含 20 mM EDTA 的 0.2 M Tris/HCl、pH 8.0 中的 0.25U 焦谷氨酰氨肽酶 (Unizyme, Hørsholm, Denmark) 以及最终体积为 250 μ l 的适当地稀释的 QC 等分试样组成。激发/发射波长为 320/410 nm。通过加入谷氨酰胺酰基环化酶开始分析反应。在分析条件下 QC 活性由 β -萘胺标准曲线来确定。一个单位定义为在所述条件下每分钟催化自 H-Gln- β NA 生成 1 μ mol pGlu- β NA 的 QC 的量。

在第二种荧光分析中, 使用 H-Gln-AMC 作为底物来测定 QC 的活性。反应是利用 NOVOSTar 微孔板读板器 (BMG labtechnologies) 在 30°C 下进行。该样品是由不同浓度的荧光底物、含 5 mM EDTA 的 0.05M Tris/HCl、pH 8.0 中的 0.1U 焦谷氨酰氨肽酶 (Qiagen) 以及最终体积为 250 μ l 的适当地稀释的 QC 等分试样组成。激发/发射波长为 380/460 nm。通过加入谷氨酰胺酰基环化酶开始分析反应。在分析条件下 QC 活性由 7-氨基-4-甲基香豆素标准曲线来确定。使用 GraFit 软件评估动力学数据。

QC 的分光光度法分析

这种新的试验被用于测定大多数 QC 底物的动力学参数。QC 活性使用源自先前不连续分析 (Bateman, R. C. J. 1989 *J Neurosci Methods* 30,23-28) 改编的连续方法, 利用谷氨酸脱氢酶作为辅助酶 (auxiliary enzyme) 进行分光光度分析。该样品是由各自的 QC 底物、0.3 mM NADH、14 mM α -酮戊二酸和最终体积为 250 μ l 的 30 U/ml 谷氨酸脱氢酶组成。通过加入 QC 开始反应并通过监测 8-15 min 内 340 nm 处吸光度的减少跟踪 (persue)。产物生成的典型的时间过程见图 1。

在测定条件下评估最初的速率, 从氨气标准曲线来测定酶的活性。所有样品在 30°C 下使用 SPECTRAFluor Plus 或使用 Sunrise (均来自 TECAN) 的微孔板读板器进行测定。使用 GraFit 软件评估动力学数据。

抑制剂试验

对于抑制剂测试, 样品成分除了加入推定的抑制化合物外与以上所述的相同。为快速测定 QC 抑制作用, 样品包含 4 mM 的各自的抑制剂和浓度为 $1 K_M$ 的底物。为详细研究抑制作用并确定 K_i 值, 首先研究了抑制剂对辅助酶的影响。在所有情况下, 未发现对任一种酶产生影响, 因此可以可靠地测定 QC 抑制作用。使用 GraFit 软件通过用竞争性抑制的通用方程拟合过程曲线来评估抑制常数。

实施例 3: MALDI-TOF 质谱分析

使用具有线性飞行时间分析器的 Hewlett-Packard G2025 LD-TOF System 来进行基质辅助的激光解吸/电离质谱分析。该装置配备有 337 nm 的氮激光、电压加速源 (5 kV) 和 1.0 m 的飞行管道。检测器为阳离子模式, 使用与个人电脑相连接的 LeCroy 9350M 数字存储示波器来记录和过滤信号。样品 (5 μ l) 与等体积的基质溶液混合。对于基质溶液, 我们使

用通过将 30 mg 2',6'-二羟基苯乙酮 (Aldrich) 和 44 mg 柠檬酸氢二铵 (Fluka) 溶于 1 ml 乙腈/0.1% TFA 的水溶液 (1/1, v/v) 中制备的 DHAP/DAHC。将小体积 (约 1 μ l) 的基质—分析物—混合物转移至探针尖上并在真空室 (Hewlett-Packard G2024A 样品制备附件) 中立即蒸发以确保样品结晶快速而均匀。

为了长期测定 Glu¹ 环化作用, 于 30°C 在 100 μ l 0.1 M、pH 5.2 的乙酸钠缓冲溶液或 0.1 M Bis-Tris、pH 6.5 的缓冲溶液中温育 A β -衍生的肽。将该肽以 0.5 mM [A β 3-11a] 或 0.15 mM [A β 3-21a] 的浓度应用, 并在整个 24 小时加入 0.2 U QC。就 A β (3-21)a 而言, 该试验包含 1% 的 DMSO。在不同时间, 将样品从试管中移出, 根据厂商的建议用 ZipTips (Millipore) 提取的肽与基质溶液混合 (1: 1 v/v), 并随后记录质谱。阴性对照不包括 QC 或包含热灭活的酶。用于抑制剂研究的样品成分除了加入抑制化合物 (5 mM 苯并咪唑或 2 mM 1, 10-二氮杂菲) 外与上述的相同。

实施例 4: pH 依赖性

在一级速率条件下研究人和木瓜 QC 催化作用的 pH 依赖性, 从而反映质子浓度对专一性常数 k_{cat}/K_M 的影响。为了该目的, 使用以焦谷氨酰氨肽酶作为辅助酶、Gln- β NA 作为底物的偶联酶试验 (coupled enzymatic assay)。发现焦谷氨酰氨肽酶在 pH 5.5-8.5 (Tsuru, D. 等, 1978 *J Biochem* (Tokyo) 84, 467-476) 之间有活性且稳定。因此该试验使得可在此 pH-范围内进行 QC 催化的研究。如图 2 所示, 所得速率曲线符合经典钟型曲线。人 QC 具有非常窄的 pH 依赖性, 其最佳值约为 pH 7.8-8.0。在偏碱性 pH 下速率倾向于减小。这与直到 pH 8.5 (图 2, 插图) 活性并不下降的木瓜 QC 观察到的速率曲线形成对比。然而, 两种酶在 pH 8 都具有其最佳特异性。出人意料的是, 对曲线的评估显示出人及木瓜 QC 分别在 7.17 ± 0.02 和 7.15 ± 0.02 的酸性范围内具有相同的 pK_a 值。

在碱性 pH 值下人 QC 活性明显下降, 这是由于 pK_a 值约为 8.5 的基

团的解离所引起。就木瓜 QC 而言，在碱性 pH 范围未收集到额外的数据点从而能够可靠地确定第二 pK_a 值。与将数据以双解离模型拟合相比，将数据以单解离模型拟合得到几乎相同的 pK_a 值 ($pK_a 7.13 \pm 0.03$)，从而支持这一观点。这说明两个 pK_a 值相当独立。

pH 稳定性

通过在 30℃、pH 4-10 之间的不同 pH 值下温育植物和动物酶 30 min 来研究谷氨酰胺酰基环化酶的稳定性。然后在标准条件下测定 QC 活性。结果如图 3 所示。

来自木瓜胶乳的 QC 在试验 pH 范围内是稳定的，在酸性或碱性范围内没有明显的不稳定趋势。相反，人 QC 仅在 7 和 8.5 之间的 pH 范围内显示出相当的稳定性，表明它在 pH 值大于 8.5 和小于 6 时具有显著的不稳定性。因此，pH 8 左右的范围似乎对植物和人 QC 活性和稳定性为最佳，并且是实施 QC 的底物特异性比较的合适的 pH 值。

实施例 5：QC 底物特异性的测定

分光光度试验

按照实施例 2 所述进行连续分光光度试验。因此，通过在 340 nm 因氨气释放和随后因 α -酮戊二酸生成谷氨酸引起 NADH/ H^+ 的消耗所引起的吸光度降低反映 QC 活性。如图 1 所示，监测线性进程曲线，且在所测定的活性和 QC 浓度之间存在线性关系。此外，使用这里提出的连续试验得到的 H-Gln-Gln-OH 动力学参数（表 1）与使用非连续方法 ($K_M = 175 \pm 18 \mu M$ 、 $k_{cat} = 21.3 \pm 0.6 s^{-1}$) 得到的参数非常一致。另外，表 1 所示的底物 H-Gln-Ala-OH、H-Gln-Glu-OH、H-Gln-Gln-OH、H-Gln-OtBu 和 H-Gln-NH₂ 被木瓜 QC 转化的动力学参数与使用直接方法在 pH 8.8 及 37℃ 下（Gololobov, M. Y.等，1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377, 395-398）测得的参数非常一致。因此，很明显新的连续试验能提供可靠的结果。

二肽-、三肽-和二肽-替代品

利用上述新的连续试验测定了为木瓜和人 QC 的潜在底物的约 30 个化合物。结果如表 6 所示。通过比较其特异性表明, 与人酶相比, 几乎所有的短肽底物可更有效地由木瓜 QC 转化。令人感兴趣的是, 如通过比较 H-Gln-Tyr-Ala-OH、H-Gln-Phe-Ala-NH₂ 和 H-Gln-Trp-Ala-NH₂ 与其它三肽的特异性或通过比较发色底物 (chromophoric substrate) H-Gln-AMC、H-Gln-βNA 和 H-Gln-Tyr-OH 与二肽底物的反应性所显示, 对于在第二位置具有较大疏水性残基的两种酶底物最为有效。对于木瓜 QC, 该发现与早期发现的特异性与第二氨基酸残基的尺寸有关的结果 (Gololobov, M. Y. 等, 1996 *Biol Chem Hoppe Seyler* 377,395-398) 相一致。仅在 H-Gln-OtBu 上观察到植物和动物特异性的显著差别。尽管该酯被木瓜 QC 以与二肽底物相比相似的特异性所转化, 但该转化约比由人 QC 进行的转化慢一个数量级。

寡肽

除个别二肽和三肽以外, 还测试了许多寡肽被木瓜和人 QC 的转化(表 6)。有趣的是, 对于一系列的四肽, 人和木瓜 QC 两者间特异性的总体差异没有象在二肽和三肽底物上所观测到的那么大。这显示在第三和第四位的氨基酸仍影响尤其是人 QC 的动力学行为。然而一个例外为, 在结构为 H-Gln-X_{aa}-Tyr-Phe-NH₂ 的一系列四肽中在第二氨基酸位置具有脯氨酸残基的肽显示 k_{cat}/K_M 值显著减小(表 6)。人 QC 特异性降低更为明显, 导致与木瓜 QC 相比 k_{cat}/K_M 值大约相差 8 倍。

如通过比较 H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂、H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ 和 H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂ 与其它四肽的特异性所显示, 具有荷正电的氨基酸 C-端谷氨酰胺的底物的转化中也观测到人 QC 特异性的略微降低。显然, 特异性的降低主要由于较小的转化数。植物酶中不存在这种作用。

表 5: 人和木瓜 QC 的肽底物的动力学评估 (n.r., 非反应性; n.i., 无抑制; n.d. 未测定; *, 底物的抑制)

底物	人 QC				木瓜 QC			
	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_i^* (mM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_i^* (mM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
H-Gln-OH	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23 ± 0.1
H-Gln-AMC	54 ± 2	5.3 ± 0.1	n.d.	98 ± 2	42 ± 1	39.4 ± 0.4	n.d.	938 ± 13
H-Gln- β NA	70 ± 3	20.6 ± 0.5	1.21 ± 0.07	294 ± 6	38 ± 3	51.4 ± 1.4	1.20 ± 0.08	1353 ± 70
H-Gln-OtBu	1235 ± 74	6.7 ± 0.2	n.i.	5.4 ± 0.2	223 ± 9	49.4 ± 0.6	n.i.	222 ± 6
H-Gln-NH ₂	409 ± 40	12.8 ± 0.5	n.i.	31 ± 2	433 ± 13	44.8 ± 0.4	n.i.	103 ± 2
H-Gln-Gly-OH	247 ± 10	13.2 ± 0.2	n.i.	53 ± 1	641 ± 20	45.8 ± 0.4	n.i.	71 ± 2
H-Gln-Ala-OH	232 ± 5	57.2 ± 0.4	n.i.	247 ± 4	158 ± 8	69.8 ± 1.0	n.i.	442 ± 16
H-Gln-Gln-OH	148 ± 5	20.7 ± 0.2	n.i.	140 ± 2	44 ± 3	43.2 ± 0.7	n.i.	982 ± 51
H-Gln-Glu-OH	359 ± 10	24.7 ± 0.2	n.i.	58 ± 1	106 ± 5	50.3 ± 0.6	n.i.	475 ± 17
H-Gln-Val-OH	196 ± 5	17.2 ± 0.1	n.i.	88 ± 2	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Tyr-OH	211 ± 5	94 ± 1	n.i.	446 ± 6	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Gln-Tyr-NH ₂	79 ± 2	45.1 ± 0.4	n.i.	524 ± 8	103 ± 4	53.6 ± 0.7	n.i.	520 ± 13
H-Gln-Gly-Pro-OH	130 ± 5	25.3 ± 0.2	n.i.	195 ± 7	333 ± 15	41.7 ± 0.5	n.i.	125 ± 4
H-Gln-Tyr-Ala-OH	101 ± 4	125 ± 1	n.i.	930 ± 27	63 ± 3	104.0 ± 1.0	n.i.	1650 ± 63
H-Gln-Phe-Ala-NH ₂	69 ± 3	109 ± 1	n.i.	1811 ± 64	111 ± 5	132.1 ± 0.6	n.i.	1190 ± 48
H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	50 ± 2	47.0 ± 0.7	n.i.	940 ± 24	78 ± 5	151.8 ± 2.6	n.i.	1946 ± 91
H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	143 ± 4	33.5 ± 0.4	n.i.	234 ± 4	123 ± 10	49.2 ± 1.7	n.i.	400 ± 19
H-Gln-Asn-Gly-Ile-NH ₂	172 ± 5	56.6 ± 0.5	n.i.	329 ± 7	153 ± 9	51.4 ± 0.9	n.i.	336 ± 14
H-Gln-Ser-Tyr-Phe-NH ₂	55 ± 3	52.8 ± 0.8	n.i.	960 ± 38	135 ± 6	64.9 ± 1.0	n.i.	481 ± 14
H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH ₂	55 ± 2	29.6 ± 0.3	n.i.	538 ± 14	124 ± 6	48.9 ± 0.7	n.i.	394 ± 13
H-Gln-Pro-Tyr-Phe-NH ₂	1889 ± 152	31.7 ± 1.2	n.i.	17 ± 1	149 ± 14	18.8 ± 0.6	n.i.	126 ± 8
H-Gln-His-Tyr-Phe-NH ₂	68 ± 3	55.4 ± 0.7	n.i.	815 ± 26	92 ± 7	75.9 ± 1.4	n.i.	825 ± 48
H-Gln-Gln-Tyr-Phe-NH ₂	41 ± 2	41.4 ± 0.4	n.i.	1010 ± 40	45 ± 2	52.9 ± 0.7	n.i.	1176 ± 37
H-Gln-Glu-Tyr-Phe-NH ₂	47 ± 4	46 ± 1	n.i.	979 ± 62	100 ± 4	54.6 ± 0.6	n.i.	546 ± 16
H-Gln-Glu-Ala-Ala-NH ₂	77 ± 4	46 ± 1	n.i.	597 ± 18	102 ± 4	53.7 ± 0.6	n.i.	526 ± 15
H-Gln-Glu-Tyr-Ala-NH ₂	69 ± 2	42.1 ± 0.4	n.i.	610 ± 12	113 ± 5	44.7 ± 0.5	n.i.	396 ± 13
H-Gln-Glu-Ala-Phe-NH ₂	39 ± 3	39 ± 1	n.i.	1000 ± 51	81 ± 3	48.5 ± 0.45	n.i.	599 ± 17
H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	55 ± 2	45.8 ± 0.5	n.i.	833 ± 21	107 ± 6	58.5 ± 0.4	n.i.	547 ± 27
H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	54 ± 3	33.4 ± 0.5	n.i.	619 ± 25	118 ± 6	48.2 ± 0.8	n.i.	408 ± 14

由四肽得到的结果也产生另一种结论。正如已指出的,木瓜 QC 对二肽显示出较高的选择性。然而,对于在第二氨基酸位置含有谷氨酸的一系列

肽，如以表 6 中数据作图得到的图 4 所示，观测到人 QC 对于一些四肽具有较高的专一性常数。此外，与以木瓜 QC 得到的结果不同，随着链长从二肽增加到四肽，人 QC 的选择性增加。另外，记录到人 QC 对于在第三和第四氨基酸位置含有大体积 (bulk) 疏水性残基的肽具有最高选择性，提示与该酶具有疏水性相互作用。通过比较各个肽的动力学参数，变化似乎主要由 K_M 值降低引起，而发现肽转化的转化数相似。因此，认为人 QC 对较长肽的较高选择性是更为疏水的底物与该酶结合更紧密的结果。

通过比较酶对 H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ 和 H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ 或 H-Gln-Gln-OH 和 H-Gln-Gln-Tyr-Phe-OH 的专一性常数，对在 3rd 位和 4th 位含疏水性氨基酸的肽所观测到的人和植物 QC 之间的差异也变得明显。

还发现对于含有 N-端 Gln 和数量增加的 C-端 Ala 残基的同源底物，人 QC 具有更大的选择性 (表 7)。尽管人 QC 的选择性随底物长度增加而增大，但木瓜 QC 没有这样的趋势。因为人 QC 对序列中含有 Ser 残基的肽具有较小的特异性，因此侧链的种类似乎也很重要 (表 6)。

表 7: 底物长度对人和木瓜 QC 活性的影响

底物	人 QC			木瓜 QC		
	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
H-Gln-Ala-NH ₂	155 ± 9	40.1 ± 0.9	259 ± 9	212 ± 21	62.8 ± 3.0	296 ± 15
H-Gln-Ala-Ala-NH ₂	87 ± 3	76.3 ± 0.7	877 ± 22	164 ± 6	83.2 ± 1.0	507 ± 12
H-Gln-Ala-Ala-Ala-NH ₂	65 ± 3	60.5 ± 0.7	1174 ± 43	197 ± 8	74.6 ± 1.0	379 ± 10
H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-NH ₂	79 ± 6	55.3 ± 1.6	700 ± 33	216 ± 6	78.5 ± 1.0	363 ± 5

离子强度对催化作用的影响

所研究的有关对底物特异性产生影响的另一个参数为离子强度。出于该目的，在含和不含 0.5 M KCl 的条件下测定了几种底物环化的动力学参数 (表 7)。令人惊奇的是，就来自木瓜胶乳的 QC 和人的 QC 而言加入盐

不能明显改变具有不荷电的主链的底物的选择性。然而人 QC 对 H-Gln-Ala-OH 和 H-Gln-Glu-OH 的专一性常数随着 KCl 的加入而减小。正如个别的动力学参数所显示, 这种作用是由于 K_M 的增加和 k_{cat} 值的略微减少所引起。就木瓜 QC 而言, 对所测的任一参数都没有影响。该作用似乎同样不是由于荷负电的底物所引起, 因为对于荷负电的肽 H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH₂ 未发现参数发生变化。在荷正电的底物 H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ 和 H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂ 中发现盐的加入可产生有趣的影响。就植物和人 QC 而言, 所测定的对催化作用的正影响主要是因较小的 K_M 值和略微升高的转化数引起的。

表 8: 离子强度对人和木瓜 QC 的催化作用的影响

	底物	0.05M Tricine-NaOH, pH 8.0				0.05M Tricine-NaOH, pH 8.0, 0.5 M KCl			
		K_M (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)	K_M (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)
木瓜 QC	H-Gln-NH ₂	0.434 ± 0.015	43.3 ± 0.4	100 ± 3	n.i.	0.446 ± 0.010	45.2 ± 0.3	101 ± 2	n.i.
	H-Gln-βNA	0.036 ± 0.002	48.8 ± 1.0	1356 ± 50	1.14 ± 0.05	0.032 ± 0.002	47.2 ± 0.8	1475 ± 70	1.33 ± 0.07
	H-Gln-Ala-OH	0.137 ± 0.007	69.7 ± 0.9	509 ± 19	n.i.	0.143 ± 0.005	68.1 ± 0.6	480 ± 12	n.i.
	H-Gln-Glu-OH	0.098 ± 0.005	45.0 ± 0.5	459 ± 18	n.i.	0.094 ± 0.003	44.4 ± 0.3	472 ± 12	n.i.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0.079 ± 0.005	138 ± 3	1747 ± 73	n.i.	0.072 ± 0.004	133 ± 3	1847 ± 61	n.i.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0.106 ± 0.008	52.9 ± 1.2	499 ± 26	n.i.	0.065 ± 0.005	48.4 ± 1.0	745 ± 42	n.i.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0.102 ± 0.007	50 ± 1	493 ± 22	n.i.	0.053 ± 0.002	58.1 ± 0.7	1096 ± 28	n.i.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0.109 ± 0.005	52.4 ± 0.7	481 ± 16	n.i.	0.094 ± 0.003	53.6 ± 0.5	570 ± 13	n.i.
人 QC		0.05 M Tris-HCl, pH 8.0				0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M KCl			
	H-Gln-NH ₂	0.442 ± 0.030	12.8 ± 0.3	29 ± 1	n.i.	0.401 ± 0.014	12.2 ± 0.1	30 ± 1	n.i.
	H-Gln-βNA	0.076 ± 0.004	21.7 ± 0.5	285 ± 8	1.39 ± 0.08	0.063 ± 0.003	20.0 ± 0.4	318 ± 9	0.97 ± 0.04
	H-Gln-Ala-OH	0.269 ± 0.007	54.4 ± 0.5	202 ± 3	n.i.	0.357 ± 0.012	47.6 ± 0.6	133 ± 3	n.i.
	H-Gln-Glu-OH	0.373 ± 0.015	21.4 ± 0.3	57 ± 2	n.i.	0.607 ± 0.036	18.9 ± 0.5	31 ± 1	n.i.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0.054 ± 0.003	50.8 ± 0.6	941 ± 41	n.i.	0.056 ± 0.002	50.0 ± 0.4	893 ± 25	n.i.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0.166 ± 0.013	31 ± 1	187 ± 9	n.i.	0.091 ± 0.005	29.8 ± 0.5	327 ± 12	n.i.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0.051 ± 0.003	29.4 ± 0.5	577 ± 24	n.i.	0.034 ± 0.001	31.6 ± 0.3	929 ± 19	n.i.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0.060 ± 0.002	46.6 ± 0.5	777 ± 18	n.i.	0.061 ± 0.002	45.6 ± 0.5	748 ± 16	n.i.

生理学底物

在早期的研究中, 对于来自牛和猪垂体的 QC 已发现通过 QC 进行的 Gln¹-TRH 和 Gln¹-GnRH 的转化(Busby, W. H. J.等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536; Fischer, W. H.和 Spiess, J. 1987 *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3628-3632)。除已研究的垂体激素以外, 合成了三种可能的人 QC 的生理学底物, 即 Gln¹-胃泌素、Gln¹-神经降压肽和 Gln¹-FPP, 并测试其转化。它们转化的动力学参数在表 1 中列出。有趣的是, 谷氨酰胺酰基肽被转化

为根据其尺寸专一性常数增加的各自的焦谷氨酰胺，即首先为最大的具有 17 个氨基酸的前胃泌素（pro-gastrin），接着为前神经降压肽（pro-neurotensin）、pro-GnRH、pro-TRH 和 pro-FPP。这些发现与由合成肽得到的数据一致。

出人意料地，较长的底物也通过植物酶以较高的选择性进行转化，该结果是与由较短的寡肽得到的结果部分相反。在底物和远离作用位点的酶之间存在次级结合相互作用（secondary binding interaction）。

含经修饰的氨基酸的肽

为了进一步研究 QC 的特异性和选择性，合成了在第二位含经修饰的 N 端谷氨酰胺酰基残基或经修饰的氨基酸的肽。利用 MALDI-TOF 质谱来定性研究这些肽的转化（仍参见实施例 3）。由于谷氨酰胺酰基残基或其类似物的环化，分别探测到底物和催化产物的质量的差别。在每摩尔底物释放一摩尔的氨气的情况下，使用分光光度分析也定量地分析该转化。

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂。将该 N 端成支链的在 N 端含有两个谷氨酰胺酰基残基与赖氨酰残基通过肽-和部分异肽键结合的肽用人（图 5）和木瓜 QC（没有显示）以表观（apparently）相同的方式进行转化。如一致的底物转化所显示，两种谷氨酰胺酰基残基均转化为焦谷氨酸，对于不同的残基无任何可探测的优先性（图 5）。因此对于不同地结合的谷氨酰胺酰基残基来说 QC 的选择性没有根本的不同。

H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂。甲基化的谷氨酰胺酰基残基只被木瓜 QC 转化为焦谷氨酰残基（图 6）。另外，未监测到人 QC 被肽抑制，这显示甲基化的残基不能被人 QC 识别。

H-Glu(OMe)-βNA 和 *H-Glu-βNA*。这些化合物都不能被木瓜或人 QC 转化。利用焦谷氨酰氨肽酶作为辅助酶对这些荧光底物进行荧光分析。然而，O-甲基化的谷氨酸残基在 Tris 和 Tricine 缓冲液中表现出显著的不稳定性，倾向于非酶催化的环化作用。并且，两种 QC 作为底物对 *H-Gln-AMC* 的活性不被较长的肽 *H-Glu(OMe)-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂* 或 *H-Glu-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂* 抑制，这显示两种 QC 形式不能识别谷氨酸或衍生物。结果还提示肽自作用部位被排斥的原因不仅仅是谷氨酸残基的负电荷。

H-Gln-环(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)。对含分子内部分异肽键的 *H-Gln-环(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)* 的转化进行定量分析，揭示对于人和木瓜 QC 的 K_M 值分别为 $240 \pm 14 \mu\text{M}$ 和 $133 \pm 5 \mu\text{M}$ 。由于与人 QC ($22.8 \pm 0.6\text{s}^{-1}$) 相比，木瓜 QC ($49.4 \pm 0.6\text{s}^{-1}$) 催化的转化具有较高的转化数，因此植物酶具有 $372 \pm 9 \text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ 的高于人 QC 几乎 4 倍的 k_{cat}/K_M 值。因此，就木瓜 QC 而言，与具有小尺寸的底物如 *H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-NH₂* 相比，专一性常数仅稍小。然而，发现人 QC 的 k_{cat}/K_M 值为 $95 \pm 3 \text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ，与小尺寸的底物相比较约小一个数量级（表 5）。

H-β 高 Gln-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂。分别通过人和木瓜 QC 的催化作用将 N-端 β-高谷氨酰胺酰基残基转化为五元内酰胺环。通过之前所述的分光光度法及 MALDI-tof 分析所伴随的氮气释放。当不加入 QC 或 QC 被煮沸时未检测到氮气的释放，这表明环化的特异催化作用。有趣的是，来自番木瓜 ($K_M = 3.1 \pm 0.3 \text{mM}$, $k_{\text{cat}} = 4.0 \pm 0.4 \text{S}^{-1}$) 和人 ($K_M = 2.5 \pm 0.2 \text{mM}$, $k_{\text{cat}} = 3.5 \pm 0.1\text{S}^{-1}$) 的 QC 催化该肽的转化具有几乎一致的 k_{cat}/K_M 值，分别为 1.4 ± 0.1 和 $1.3 \pm 0.1 \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。因而与相似尺寸的在 N 端含谷氨酰胺酰基残基的肽相比，β-高谷氨酰胺残基被催化的效率大约小 1000 倍。这显示底物 α-碳的构造对于底物被 QC 形式识别很重要，但不是必需的。在环

化的长度和倾斜角度上，作为底物的基本要求为倾向于环化的 γ -酰胺基和未质子化的 N 端氨基基团，N-端谷氨酰胺酰基和 β -高谷氨酰胺酰基残基可以满足这一要求。

实施例 6: QC 底物的合成

寡肽。按照先前所述 (Schilling, S. 等, 2002 *Biochemistry* 41, 10849-10857) 使用肽合成仪 (Labortec SP650, Bachem, Switzerland) 以 0.5 mmol 的规模半自动化合成肽。较长的肽按照记载 (Manhart, S.等, 2003 *Biochemistry* 42,3081-3088) 使用自动化 Symphony 肽合成仪以 25 μ mol 的规模进行合成。所有的肽偶联应用改良的固相肽合成的 Fmoc 方案, 使用 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3,-四甲基脲(uronium)(TBTU; Novabiochem) /碱 (二异丙基乙胺或 N-甲基-吗啉; Merck), 或者较难的偶联使用 N-[(二甲基氨基)-1H-1, 2, 3,-三唑[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲烷铵六氟磷酸盐 N-氧化物 (4、5) (HATU; Applied Biosystems) /二异丙基乙胺作为活化试剂。在用含有混合物 (cocktail) 的三氟乙酸 (TFA; Merck) 从树脂上断裂后, 粗肽用制备 HPLC 使用无酸溶剂系统进行纯化以防止 N-端谷氨酰胺的进一步环化。制备 HPLC 通过 250-21 Luna RP18 柱 (Phenomenex) 以乙腈 (Merck) /水线性梯度 (在 40 min 内乙腈 5-40%或 65%) 实施。应用分析 HPLC 和 ESI-MS 确认肽的纯度并鉴定。

Glu (NH-NH₂)-Ser-Pro-Thr-Ala-NH₂。根据标准的 Fmoc-操作 (Schilling, S.等, 2002 *Biochemistry* 41, 10849-10857) 在 Rink amide MBHA 树脂 (Novabiochem) 上合成线性肽前体 (Fmoc-Glu-Ser-Pro-Thr- Ala-NH₂)。Fmoc-保护的肽从树脂上断裂后, 将该肽用乙醚 (Merck) 沉淀、过滤、干燥。在二氯甲烷(DCM, Merck)中应用 HMBA-AM 树脂 (1.16 mmol/g, Novabiochem) 进行前体肽 (3 当量) 的谷氨酸的 γ -羧酸基团的偶联。二环己基碳二亚胺 (DCC, Serva) (4 当量) 和二甲氨基吡啶 (DMAP, Aldrich)

(0.1 当量) 用作偶联剂。12 小时后过滤树脂, 用 DCM 冲洗, 重复该反应。用 20% 的哌啶 DMF 溶液 (3×5min) 将 N 端 Fmoc 基团去保护之后, 将肽树脂用 5% 的胍溶液 (20 ml/g) 处理 1.5 小时。将树脂过滤、用二甲基甲酰胺 (DMF, Roth, Germany) 和 TFA 洗涤。蒸发后, 将粗肽用乙醚沉淀, 收率为 76%。

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂。根据标准的 Fmoc/^tBu 操作在 Rink amide MBHA (Schilling, S.等, 2002 *Biochemistry* 41, 10849-10857) 上使用 Fmoc-Lys (Fmoc) -OH 作为倒数第二个氨基酸偶联来合成线性肽。用 20% 的哌啶 (Merck) 的 DMF 溶液将赖氨酸的两个氨基保护基去保护之后, 4 当量的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 得以偶联。标准的断裂操作得到 95% 的收率。

H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂。从装在 Fmoc-MI-AM (Novabiochem) 树脂上的 Fmoc-Glu-OtBu 起始合成 Fmoc-Gln(NMe)-OH。用 DCM 溶胀后, 用 DMF 洗涤树脂 (0.5g)、用 20% 哌啶的 DMF 溶液脱保护。将树脂倒入 5 ml DMF 中, 随后加入 5 当量 Fmoc-Glu-OtBu、5 当量 HATU 和 10 当量 DIPEA, 振摇 6 小时。过滤、洗涤后, 以标准的 TFA 断裂条件来断裂产品。根据记载 (Schilling, S.等, 2002 *Biochemistry* 41, 10849-10857) 合成肽 *H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂*。Fmoc-Gln(NMe)-OH 与 HATU/DIPEA 偶联过夜。标准的断裂操作得到 78% 的肽粗品。

H-Glu(OMe)-β-萘胺、*H-Gln-Val-OH*、*H-Gln-Tyr-OH*。应用标准的混合酸酐操作使用氯甲酸异丁酯 (Merck) 合成 Boc-保护的二肽。通过 1 N NaOH 的二氧六环溶液将 C-端甲基酯 Boc-Gln-Tyr-OMe 和 Boc-Gln-Val-OMe 进行皂化。使用 HCl/二氧六环溶液使 Boc-保护的肽脱保护 10 分钟。蒸发后将残余物用几种溶剂重结晶得到 60-70% 的固体化合物。

H-Gln-环 (Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)。在酸敏感的 2-氯三苯甲基树脂上合成线性前体 Boc-Gln (Trt)- Lys-Arg (Pmc)-Ala-Gly-Phe-OH。使用标准的利用 Fmoc- Lys (Mtt)-OH 的 Fmoc/Bu-方案进行偶联。在 DCM (10 次 5 min) 中用 3% 的 TFA 溶液断裂以后, 将该溶液在甲醇中 (MeOH; Merck) 用 10% 的吡啶 (Merck) 中和, 用 DCM 和 MeOH 洗 3 次, 浓缩至体积的 5%、粗肽用冰水沉淀。接着使用 DCC/N-羟基苯并三唑 (HOBt; Aldrich) 活化来环化粗肽。将粗肽溶于无水二氯甲烷中 (0.2 mmol/50ml) 中, 加入 0.2 mmol N-甲基吗啉和 0.4mmol 1-羟基苯并三唑。在 0℃ 将该溶液滴加进 0.4 mmol 二环己基碳二亚胺的 250 ml 二氯甲烷溶液中。在室温下搅拌过夜来完成该反应。将 N, N'-二环己基脲过滤后, 蒸除溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯中, 并用 1N HCl、NaHCO₃ 饱和溶液及水洗若干次。将该溶液用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、在真空下蒸干。

实施例 7: QC 效应物的特征

咪唑衍生物

测试作为 QC 抑制剂的在 5 元环的不同位置含取代基的咪唑及苯并咪唑衍生物 (表 3)。按照咪唑环编号。在实施例 2 中记载了所应用的方法。

C-4 (5) 和 C-4,5 衍生物。在咪唑环结构等效的 4-或 5-位或两个位置均带有取代基的化合物显示出对人 QC 抑制的明显减少。然而唯一的例外为已证明为最有效的抑制化合物之一的 N-ω-乙酰化的组胺。正如 5-羟甲基-4-甲基-咪唑具有与咪唑类似的抑制常数所显示, 在这些位置的小取代基对结合仅有微弱的作用。连接到这些位点上的大基团或更庞大的基团会减弱或破坏酶对化合物的结合。已知所测试的某些其它取代基发挥能够降低咪唑环的电子云密度的负诱导效应或中介效应, 这也促成了较低的结合常数。L-组氨酸和组氨酰胺 K_i 值的差异也表明了一定的电荷对结合的影响。荷电底物的静电排斥的证据在底物特异性研究中已显示, 即谷氨酰胺 (glutaminamide) 容易被人 QC 转化为产物, 而以游离谷氨酸作为底物未

观察到任何活性。

C-2 衍生物。所测试的所有衍生物都比咪唑更微弱地抑制 QC。比质子更大的任何取代基都能抑制正常的 QC 结合。仅仅由于 2-甲基-苯并咪唑的甲基，抑制常数就下降约一个数量级。比较苯并咪唑和 2-氨基-苯并咪唑的 K_i 值可发现非常类似的关系。此外，该结果表明这种作用与电性变化 (electronic alteration) 无关。

N-1 衍生物。在测试对人 QC 的抑制作用的咪唑衍生物中，发现与咪唑相比能提高 K_i 值的大多数化合物在一个氮原子上有变化。这些化合物也包括最有效的 QC 抑制剂之一，1-苄基咪唑。有趣的是，仅仅对该结构的微小变化都能导致抑制性质的丧失，如在 1-苯甲酰咪唑和苯基咪唑中所见，它们在实验条件下无活性。同样在这种情况下，所观测的变化似乎并不仅仅是由于苯基的负中介效应 (negative mesomeric effect) 导致咪唑环的电子密度降低所引起，因为庞大的显示正诱导效应的三甲基甲硅烷基与其它基团相比同样表现出较低的结合。有趣的是，该组中活性较弱的化合物之一为 1-氨基丙基-咪唑。既然立体地 (sterically) 类似的化合物 1-甲基咪唑和 1-乙烯基咪唑改善了与活性部位的结合，那么该化合物的功效微弱则是因碱性氨基所引起。因此，荷正电的氨基说明了 K_i 值较小的问题，通过比较 N- ω -乙酰化的组胺 (表 3) 与组胺 (表 4) 的 K_i 值确证了这一结果。

3,4 和 4,5 衍生化的作用。在 4 (5) 位或两者皆含取代基的咪唑衍生物与酶结合的效力有限。通过比较 L-组胺以及组胺生物降解中的两种中间体 3-甲基-4-组胺和 3-甲基-5-组胺的抑制常数可确定特定取代基的作用 (表 4)。已发现 L-组胺的 K_i 值与其乙酰化的对应物相比要小约一个数量级。就 3-甲基-4-组胺而言，一个氮原子的甲基化可使功效显著提高。然而，生

成 3-甲基-5-组胺的甲基化可导致抑制活性的完全丧失。因此，所观测的结果似乎主要是由于与碱性氮邻接的碳的衍生化导致的结合空间位阻所引起。据推测，该碱性氮在与酶结合中起关键的作用。

实施例 8: A β (3-40/42)衍生物的生成

该测定是采用 A β (3-40/42)的两种短的 N-末端肽序列，在 3 位包含谷氨酰胺而不是谷氨酸残基的 Gln³-A β (1-11)a（序列：DAQFRHDSGYE）以及 Gln³-A β (3-11)a 实施。采用 MALDL-TOF 质谱法来测试 DP IV 对两种肽的切割作用和 QC 对这两种肽的 N-末端谷氨酰胺残基的环化作用。使用纯化的 DP IV（猪肾）或猪垂体匀浆的粗品作为 QC 的来源实施测定，并测定两种酶的连续催化。

结果

1、通过 DPIV 催化的由 Gln³-A β 1-11a 至 Gln³-A β (3-11)a 的生成以及 DP IV 抑制剂 Val-吡咯烷酰胺(Val-Pyrr)对其的抑制

DPIV 及 DPIV 样活性切割 Gln³-A β (1-11)a 生成 Gln³-A β (3-11)a(图 7)。第三位置的残基因切割而暴露并因而可被其它酶，即 QC 修饰。正如所料，催化作用可被 Val-Pyrr 完全抑制（图 8）。

2、垂体匀浆中的 QC 催化的由 Gln³-A β (3-11)a 至[pGlu³]A β (3-11)a 的生成以及 1,10-二氮杂菲对其的抑制

存在于猪垂体匀浆中的谷氨酰胺酰基环化酶催化 Gln³-A β (3-11)a 转化为[pGlu³]A β (3-11)a(图 9)。通过加入 1,10-二氮杂菲可抑制[pGlu³]A β (3-11)a 的生成。

3、DPIV 和 QC 的连续催化导致生成[pGlu³]A β (3-11)a 以及 Val-Pyrr 和 1,10-二氮杂菲对其的抑制

在加入猪肾 DPIV 的猪垂体匀浆粗品中测定,发现由 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 生成 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 发生在 DPIV 和 QC 的连续催化之后(图 11)。当加入 QC 抑制剂 1,10-二氮杂菲(图 12)或 DP IV 抑制剂 Val-Pyr(图 13)时,不生成 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 。如同样由 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(2\text{-}11)\text{a}$ 的生成所示,出现的少量 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 是因为氨肽酶切割以及随后的谷氨酰胺环化。

4、粗垂体匀浆中由氨肽酶催化的 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 的生成

由于 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 的生成不依赖于 DPIV 的催化,因此在原生的垂体匀浆中不加入 DPIV 而研究 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1\text{-}11)\text{a}$ 的降解(图 14)。正如根据第 4 节的数据所预料,观察到 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 的生成。该数据表明 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(1\text{-}11)\text{a}$ 的降解同样可被氨肽酶催化,从而形成 $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 。因此,该结果表明焦谷氨酰(pyroglutamyl)的形成是该组织中 N-末端肽降解的终点,进一步支持了 QC 在斑块形成中的作用。

实施例 9: 重组人 QC 对 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 、 $(3\text{-}21)\text{a}$ 以及 $(3\text{-}40)$ 的转化

所有所测试的 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta$ 衍生肽都被人 QC 高效地转化为相应的焦谷氨酰形式(表 9)。由于 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}21)\text{a}$ 和 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}40)$ 在水溶液中的低溶解度,在 1%DMSO 存在下进行该测定。然而,由于 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}11)\text{a}$ 具有较好的溶解度,因此允许在存在或不存在 DMSO 时对 QC—催化转化的动力学进行分析(表 8)。放在一起考虑,对作为 QC 底物的链长为 8、18 及 37 个氨基酸的 $\text{A}\beta$ 肽的研究(参见表 9)证实了人 QC 活性随着底物长度而增强的发现。因此,考虑到专一性常数, $\text{Gln}^1\text{-胃泌素}$ 、 $\text{Gln}^1\text{-神经降压肽}$ 、 $\text{Gln}^1\text{-GnRH}$ 都属于最好的 QC-底物。类似地,迄今研究的最大的 QC 底物 $\text{Gln}^3\text{-A}\beta(3\text{-}40)$ 以及胰高血糖素,即使在 1%DMSO 存在下也显示出高的二级速率常数(分别为 $449\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 和 $526\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (表 9)。有趣的是,所研究的淀粉样多肽转化的动力学参数并不随着尺寸的增加而显著改变,表明仅 $\text{A}\beta$ 的 C-末端部分对 QC 催化具有中等程度的作用。因此,

由于具有较好的溶解度和实验操作性，对涉及这些肽的 N-末端氨肽酶加工的进一步研究是通过使用 A β 的更小的片段 Gln³-A β (1-11)a、Gln³-A β (3-11)a 以及 A β (3-11)a 实施。

表 9：在含有 1%DMSO 的缓冲液中重组人 QC 转化含有 N-末端 Gln 的肽的动力学参数

肽	K _M (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Gln ³]A β 3-11a	87 ± 3 [#]	55 ± 1 [#]	632 ± 10 [#]
[Gln ³]-A β 3-11a	155 ± 4	41.4 ± 0.4	267 ± 4
[Gln ³]A β 3-21a	162 ± 12	62 ± 3	383 ± 10
[Gln ³]A β 3-40	89 ± 10	40 ± 2	449 ± 28
胰高血糖素 (3-29)	19 ± 1	10.0 ± 0.2	526 ± 17

[#]在 DMSO 存在下测定

实施例 10：重组人 QC 对 A β (3-11)a 和 A β (3-21)a 的转化

在 QC 存在下对 A β (3-11)a 和 A β (3-21)a 的温育表明，与先前的研究不同，含谷氨酸的肽也能用作 QC-底物（图 15C 和 D）。分别在 pH 5.2 和 6.5 的条件下研究 QC 催化的[pGlu³]A β (3-11)a 和[pGlu³]A β (3-21)a 的生成。如果在加入 QC 开始试验之前向溶液中加入 QC-抑制剂苯并咪唑，则底物生成[pGlu³]A β (3-11)a 或[pGlu³]A β (3-21)a 的转化受到抑制（图 15E 和 F）。如果 QC 在加入之前煮沸，则 pGlu-肽的生成可忽略不计（图 15A 和 B）。

实施例 11：木瓜 QC-催化的 Gln- β NA 和 Glu- β NA 的环化作用的 pH-依赖性

根据 Michaelis-Menten 动力学木瓜 QC 在最高 2 mM（受底物溶解度的限制）的浓度范围内转化 Glu- β NA（图 16）。检视研究 pH 6.1-8.5 之间的 QC-催化的 Glu- β NA 转化的转化对底物浓度的图表，发现 Glu-底物的两个参数 K_M 和 K_{cat} 都是以 pH 依赖性的方式改变（图 16）。这与之前记载的 QC-催化的谷氨酸酯环化不同，其中在所给的 pH 范围内仅观察到 K_M

发生变化 (Gololobov, M. Y., Song, I., Wang, W., 和 Bateman, R. C. (1994) *Arch Biochem Biophys* 309,300-307)。

随后, 为研究 Glu-和 Gln-环化期间质子浓度的影响, 在一级速率定律条件下 (即底物浓度远远低于 K_M 值) 研究了 Glu- β NA 和 Gln- β NA 环化作用的 pH 依赖性 (图 17)。与最佳 pH 为 pH 6.0 的谷氨酸环化相比, 谷氨酰胺环化的最佳 pH 为 pH 8.0。尽管在各自最佳 pH 下的专一性常数相差约 80,000 倍, 但在 pH 6.0 左右 QC 对 EC 活性的比例仅仅约为 8,000。

对 pH 6.0 时无酶催化的由 Gln- β NA 至 pGlu 生成的研究持续 4 周, 并发现一级速率常数为 $1.2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 。然而, 在同一时期内, 并没有 pGlu- β NA 自 Glu- β NA 生成, 从而可估计对转化的限制性速率常数为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 。

实施例 12: 酶灭活/再活化过程

将人 QC 的等分试样(0.1-0.5mg, 1mg/ml)以 3000 倍过量的 5 mM 1,10-二氮杂菲或 5 mM 二吡啶羧酸的 pH 6.8 的 0.05 M Bis-Tris/HCl 溶液透析过夜进行灭活。随后, 通过以包含 1 mM EDTA 的 pH 6.8 的 0.05 M Bis-Tris/HCl 对样品进行透析 (3 周期, 2000 倍过量), 从而将灭活剂小心移除。在室温下使用 Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ni^{++} 、 Ca^{++} 、 K^{+} 和 Co^{++} 离子在浓度为 1.0、0.5、0.25 mM 的包含 0.5 mM EDTA 的 pH 6.8 的 0.025 M Bis-Tris 溶液中进行再活化试验 15 分钟。为避免因缓冲溶液中存在的痕量金属离子引起迅速再活化, QC 活性试验是在包含 2 mM EDTA 的 pH 8.0 的 0.05 M Tris/HCl 溶液中进行。

通过 1,10-二氮杂菲抑制猪 QC 已有记载 (Busby, W. H. J. 等. 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J.等. 2001 *Biochemistry* 40)。然而, 已发现 EDTA 对 QC 催化具有活化作用的事实表明被二氮杂菲的抑制并不是由于金属螯合作用导致 (Busby, W. H. J. 等, 1987 *J Biol Chem* 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J.等, 2001 *Biochemistry* 40)。同样, 除了受 1,10-二氮杂菲抑制外, 人 QC 催化的底物环化作用在其它金属酶抑制剂二吡啶

羧酸和 8-羟基喹啉存在下被彻底革除。这些螯合剂以竞争性和时间依赖性的方式抑制 QC，即发现以这些化合物延长温育之后已竞争性地抑制的最初活性会进一步降低（图 18、19）。有趣的是，无论温育时间多长或在任何条件下 EDTA 都不显示显著的抑制作用。

在以 5 mM 1,10-二氮杂菲或 5 mM 二吡啶羧酸彻底透析之后，人 QC 几乎完全失活。在以不含螯合剂的缓冲溶液反复整夜透析之后，QC 活性部分再活化至 50-60%。然而，当以含 1 mM EDTA 的缓冲溶液透析时，观测不到再活化。

通过以 0.5 mM ZnSO₄ 在 0.5 mM EDTA 存在下温育蛋白质 10 分钟，可在被二吡啶羧酸或 1,10-二氮杂菲灭活之后几乎完全恢复 QC 活性（图 20）。类似地，使用 Co⁺⁺和 Mn⁺⁺离子再活化可使 QC 活性部分恢复。即使在 0.25 mM Zn⁺⁺存在下，其活性也可能恢复到初始活性的 25%。当应用 Ni⁺⁺、Ca⁺⁺ 或 K⁺离子时未观察到再活化作用。类似地，以这些离子温育活性完全的 QC 对酶活性无任何影响。

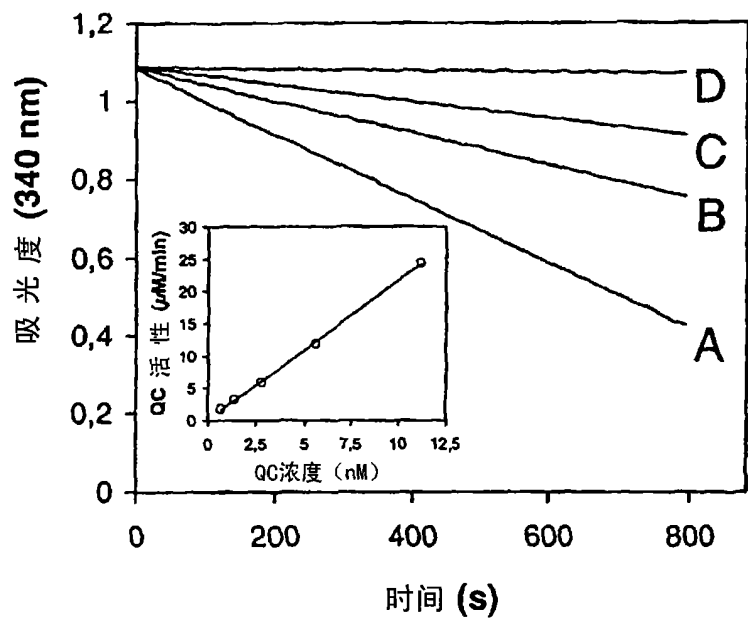


图1

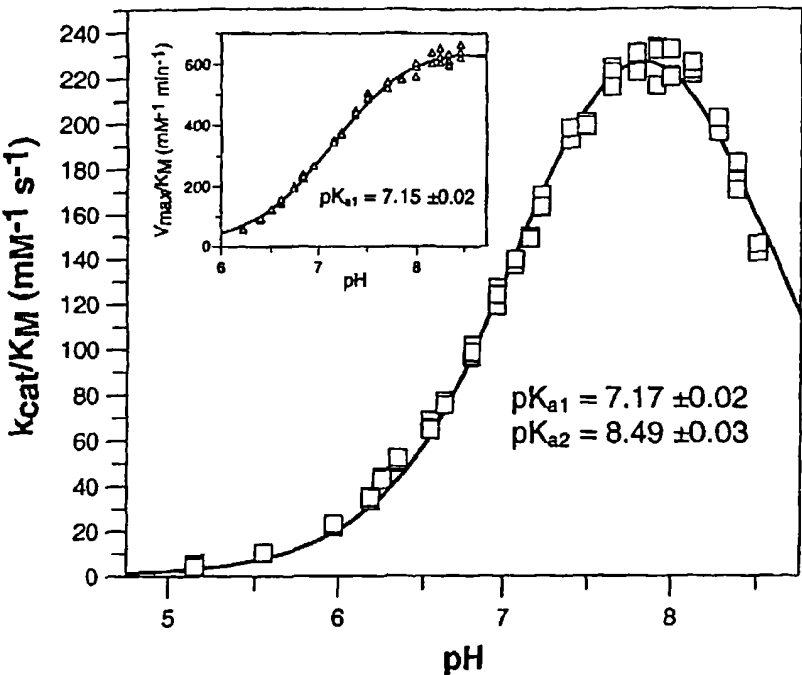


图2

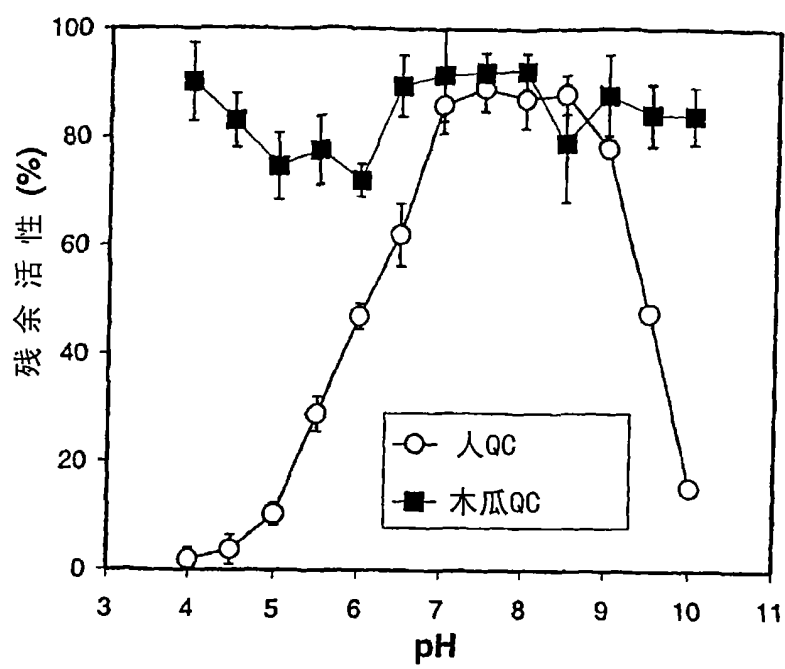


图3

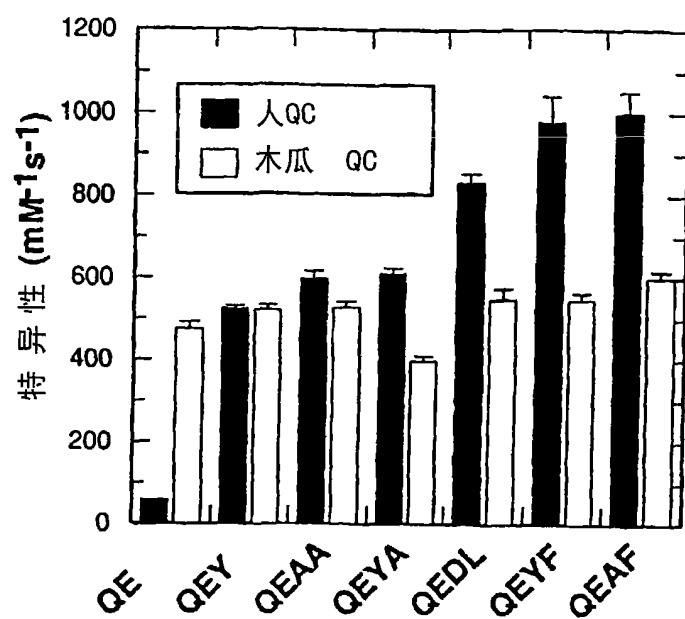


图4

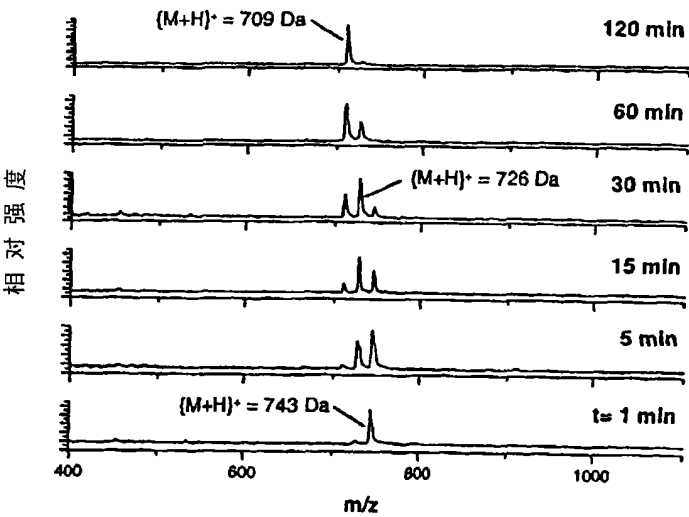


图5

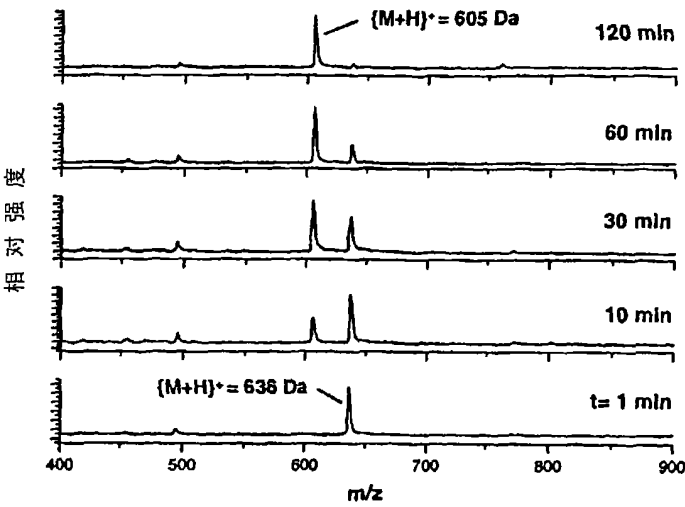


图6

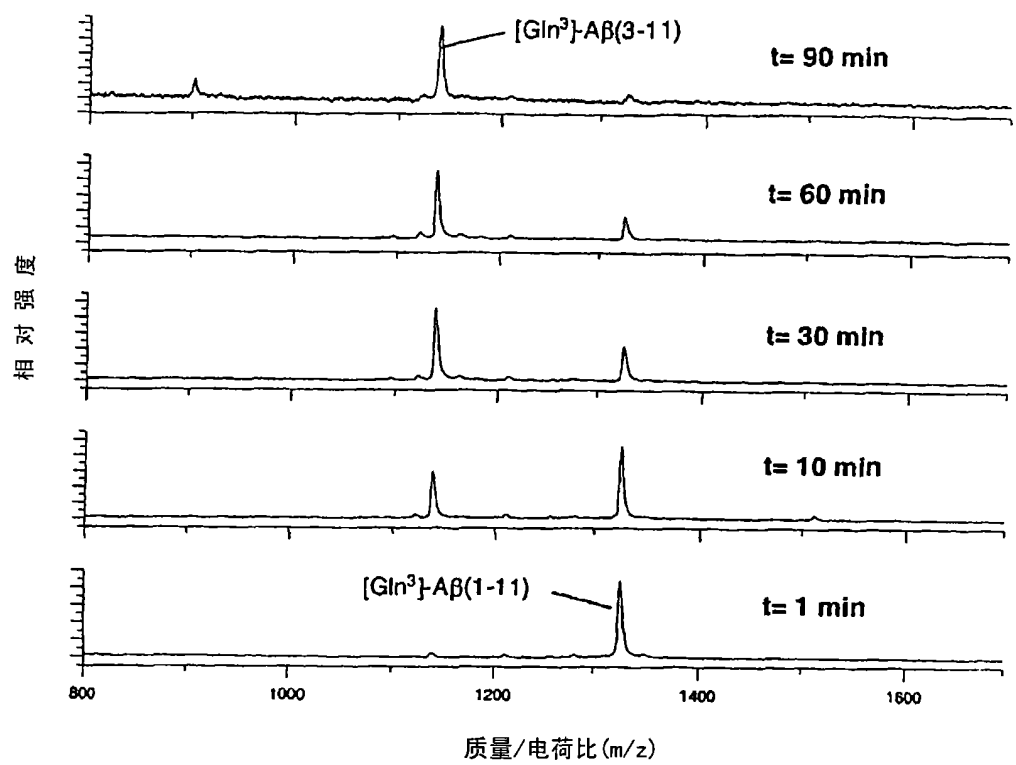


图7

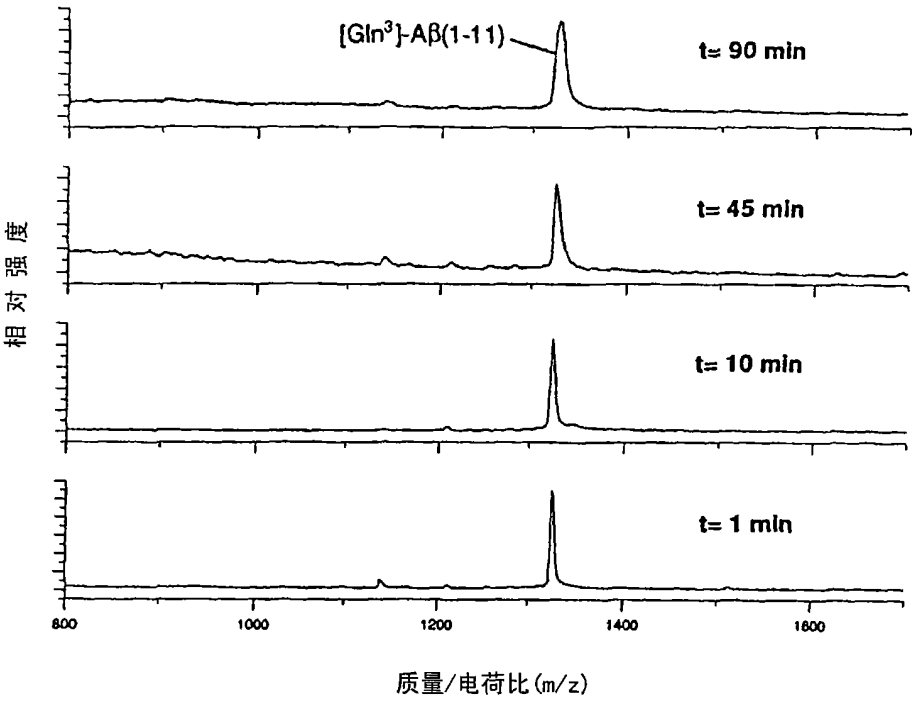


图8

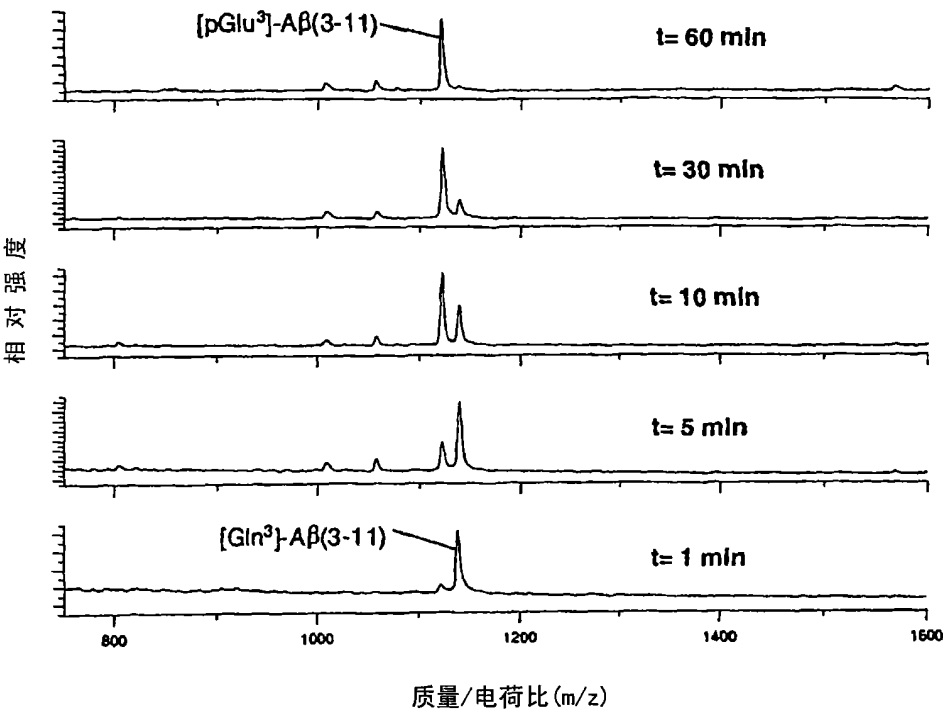


图9

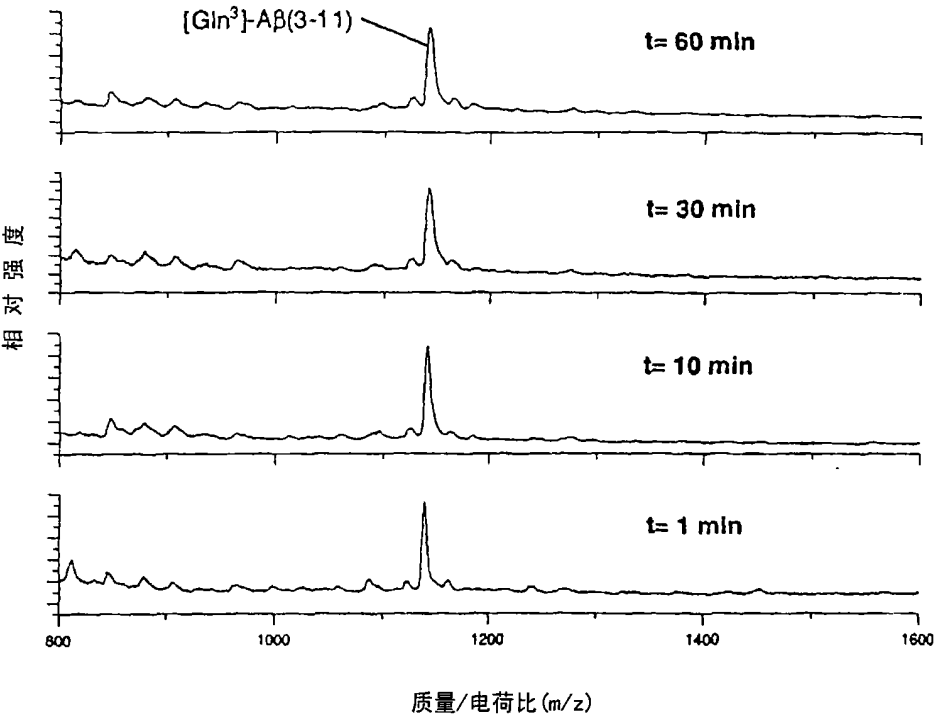


图10

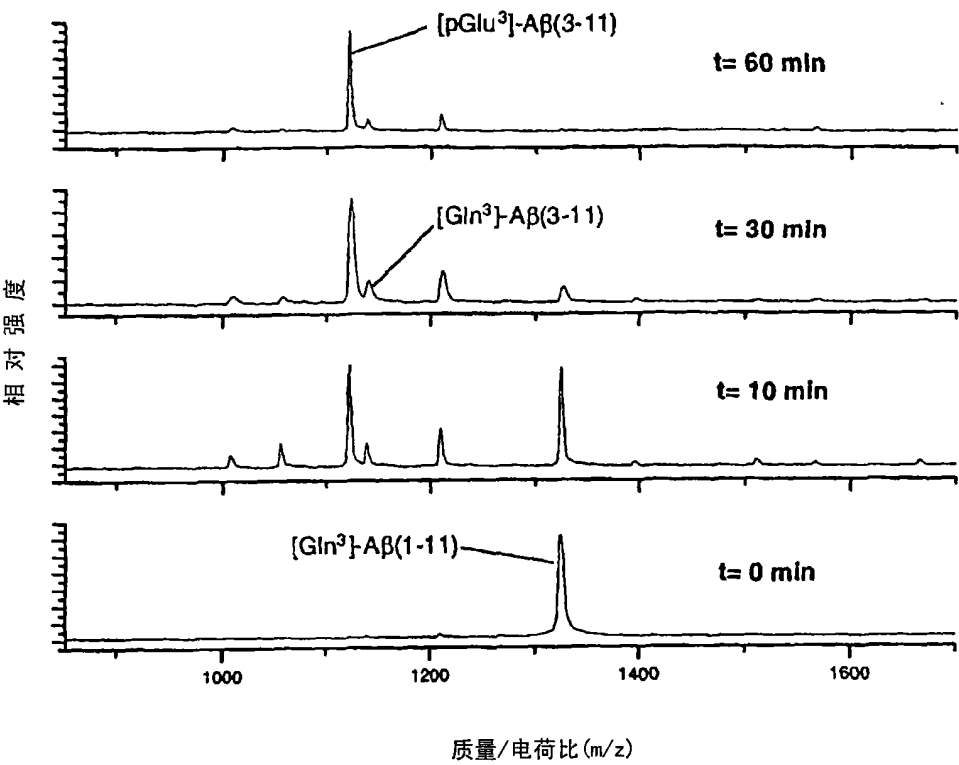


图11

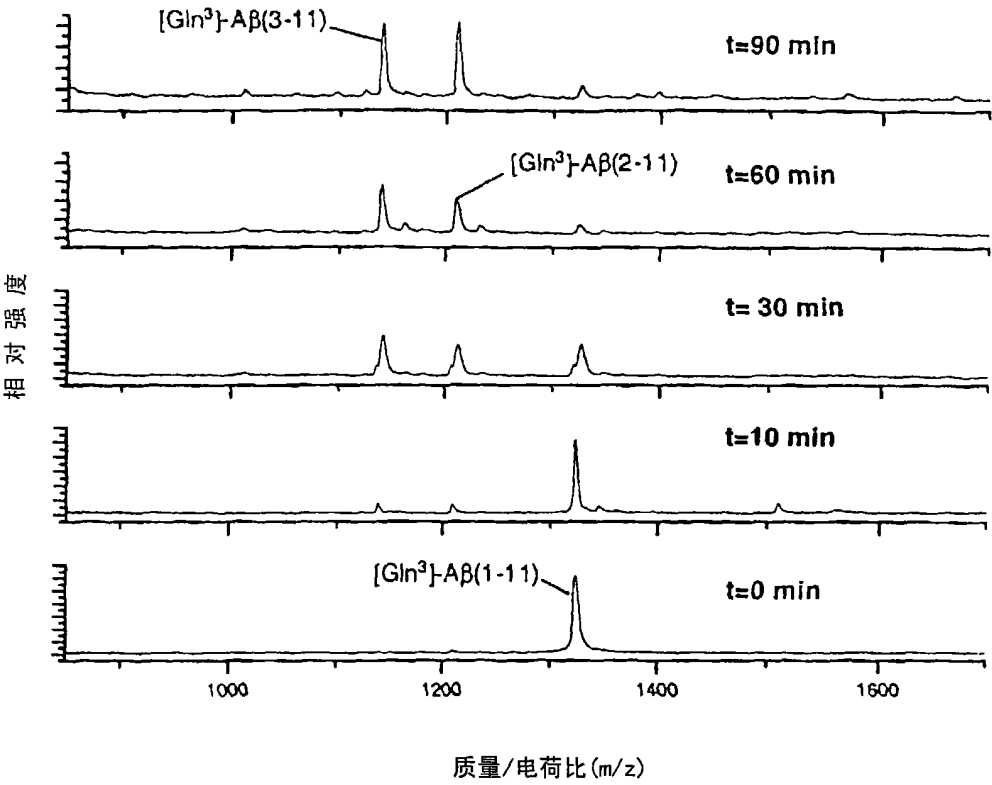


图12

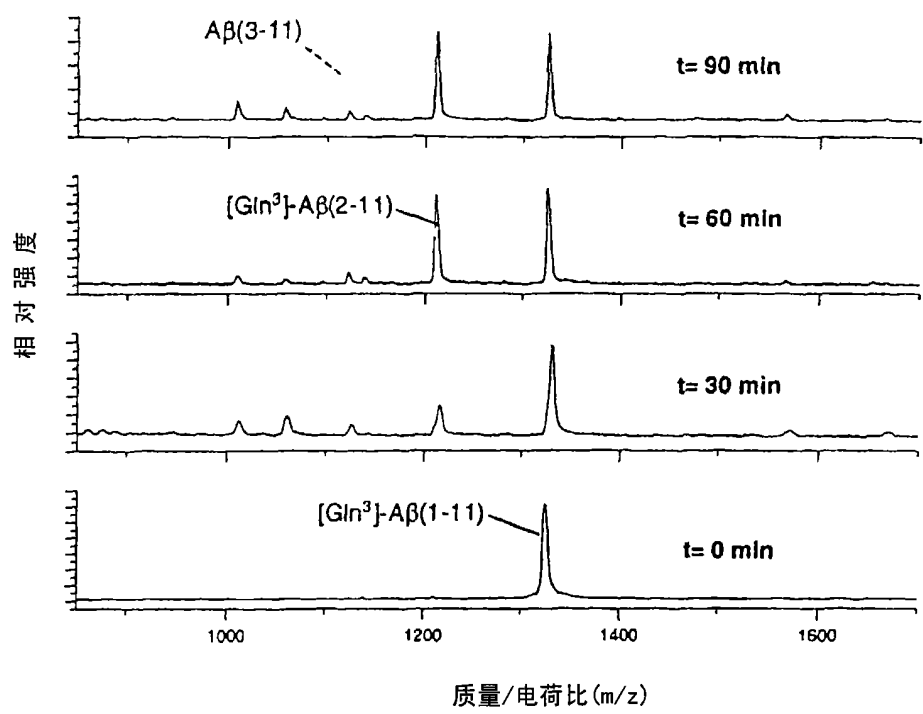


图13

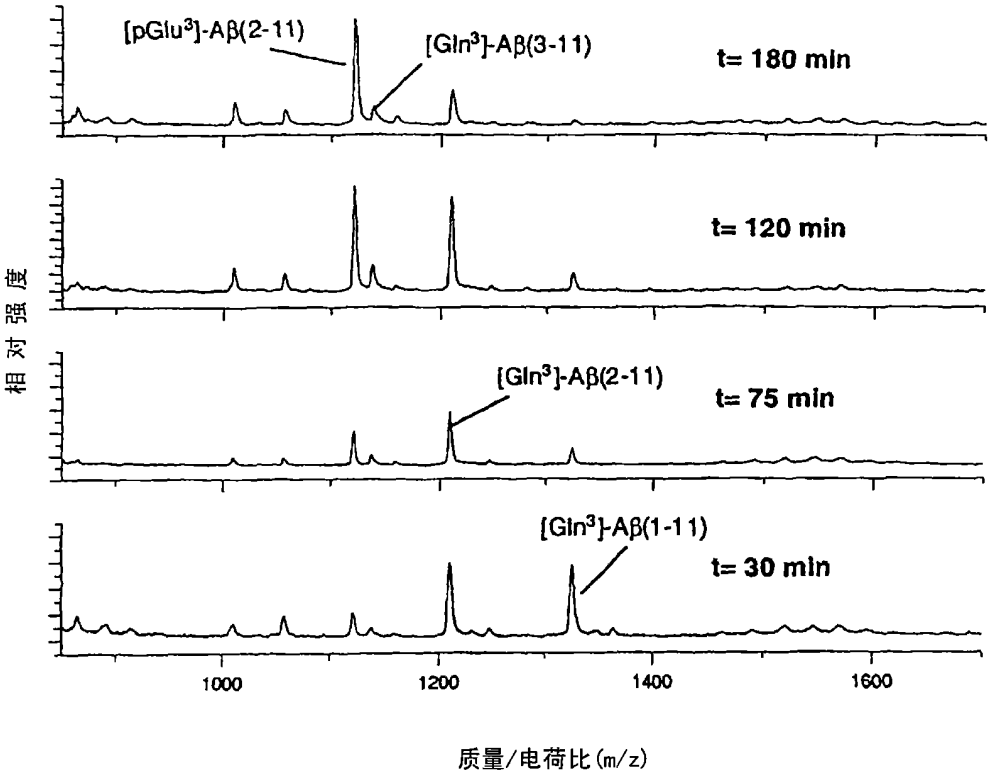


图14

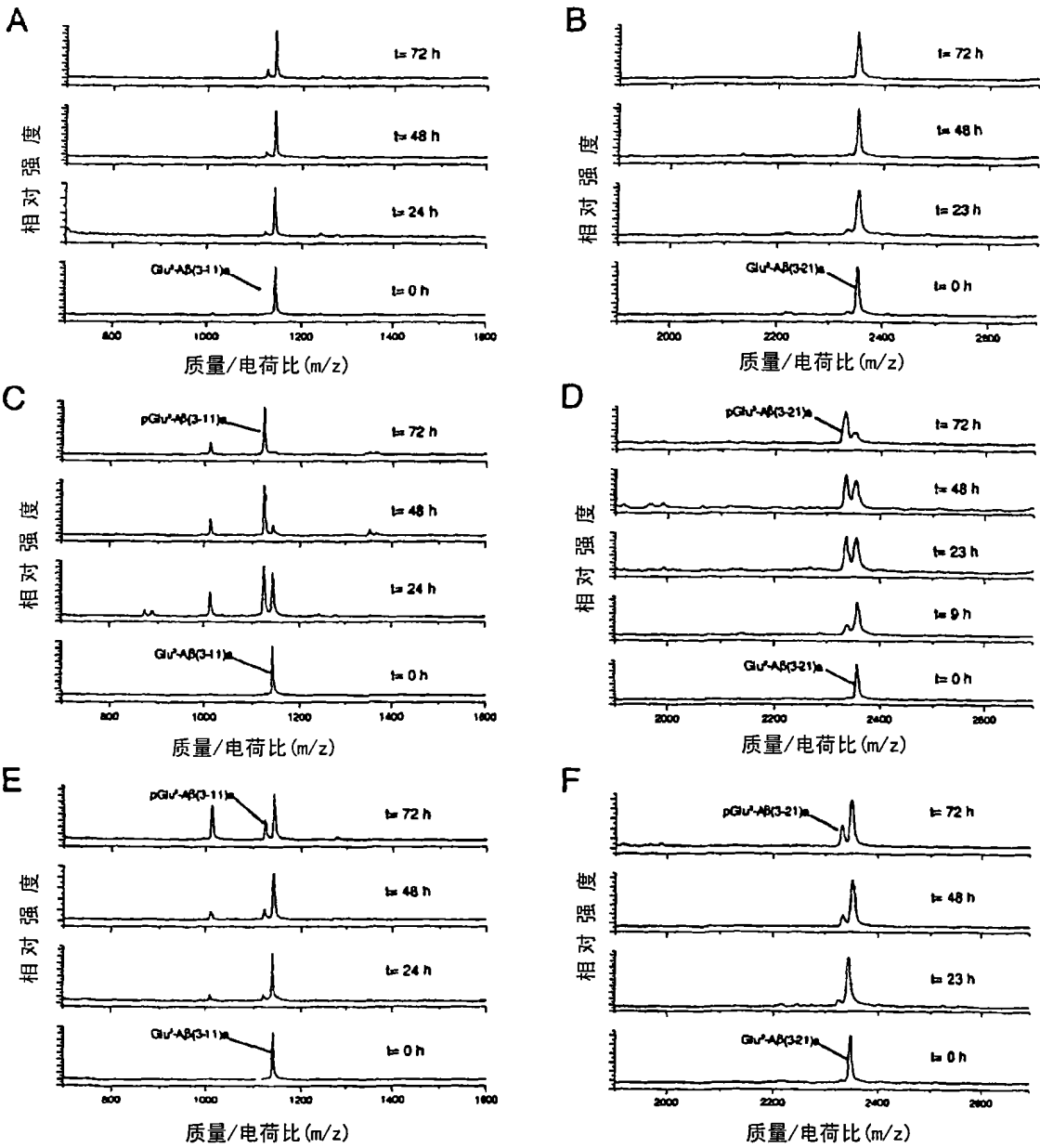


图15

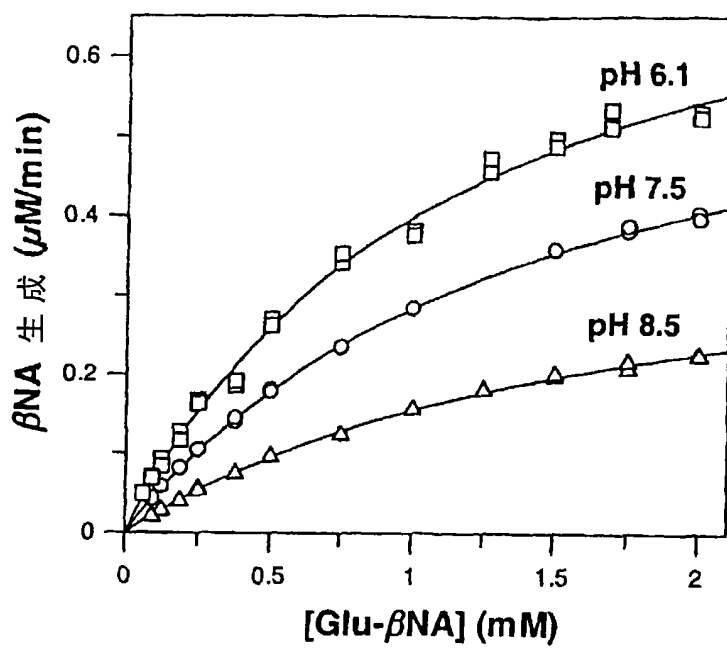


图16

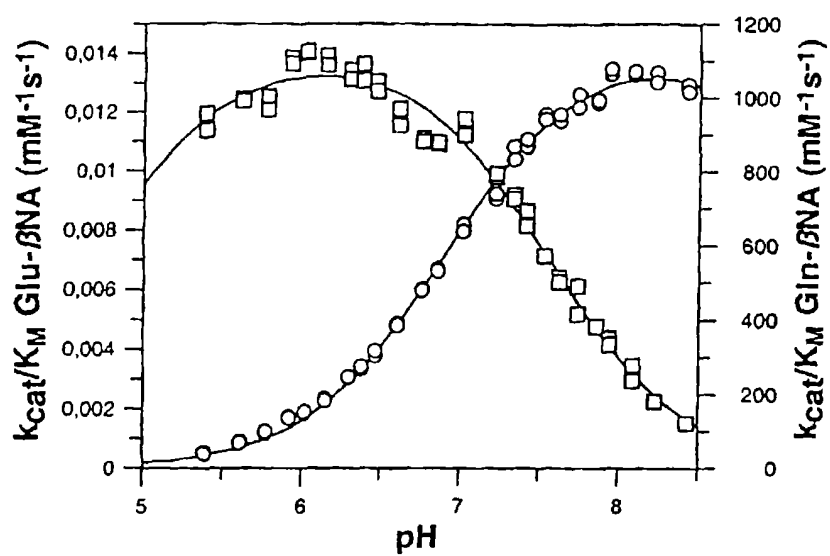


图17

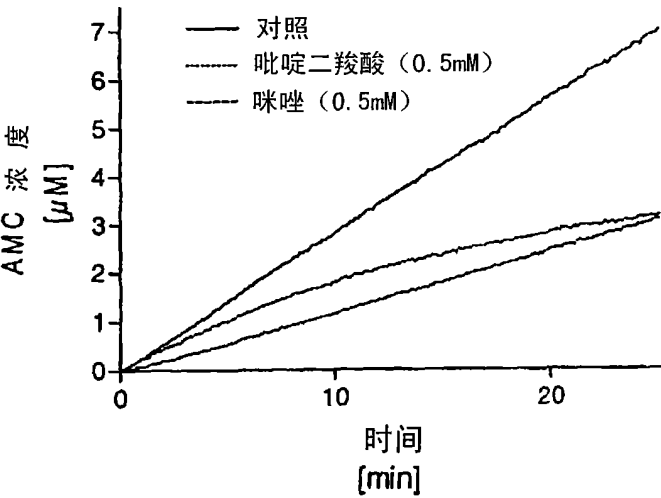


图18

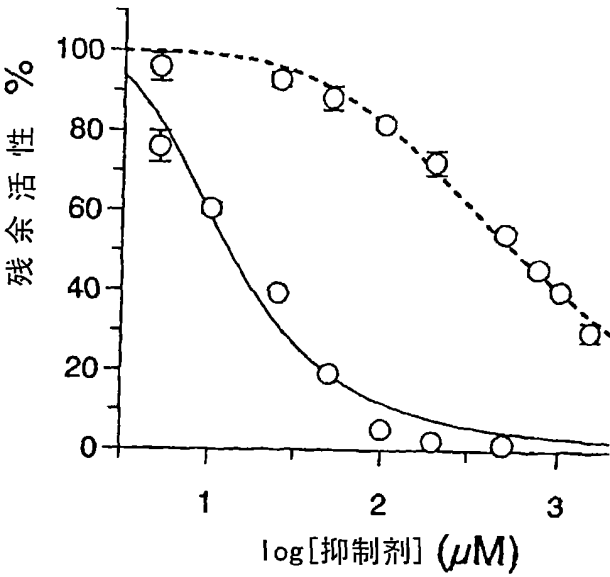


图19

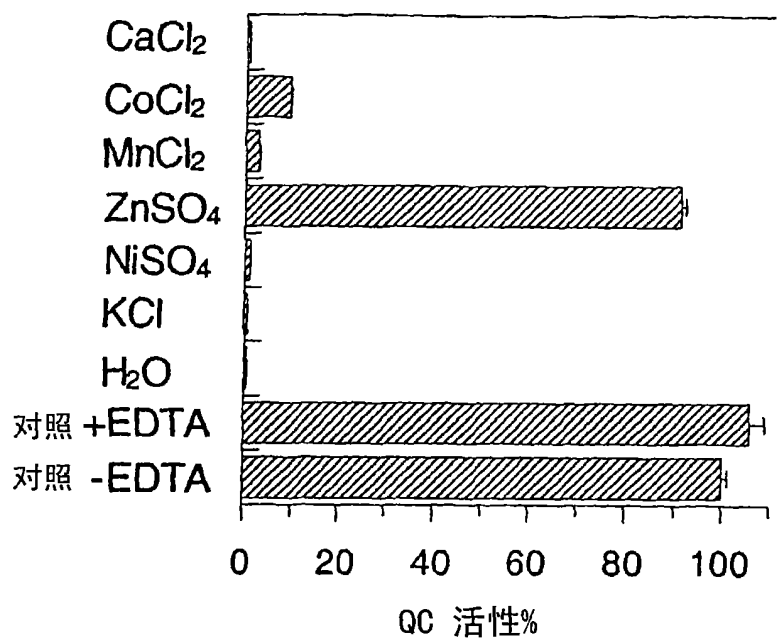


图20

```

hQC      MAGGRHRRVVGTLLHLLLVAALPWASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAILNSSLRQIAEGT
SGAP     -----APDIPLANVKAHLTQLS
hgCP II  -----ANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQ-K
              * *                : : .

hQC      SISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSAARQHIMQRIQRLQADWVLEIDTFLSQTPYGYRSF
SGAP     TIAAN--NGGN-----RAHGRPGYKASVDYVKAKLD--AAGYTTTLOQFTSGGATGYNLI
hgCP II  LLEKM--GGSAP---PDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTIYNVI
              :      . .      . . :      :      . .      * . :

hQC      SNIIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWMNRVFGATDSAVPCAMMLELAR---ALDKK
SGAP     ANWPG-GDP--NKVLMAGALDS--VSSG-----AGINDNGSGSAAVLETAL---AVSRA
hgCP II  GTLRGAVEP--DRYVILGGHRDS-----W----VFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKE
              . .      : *      : : : . * *      * *      . * : * .      : : :

hQC      LLSLKTVSDSKPDLSLQLIFFDGEEAFLHWSQDSLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQ
SGAP     GY--Q-----PDKHLRFAWWGAEELGLIGS---KFY-----VNNLPSADR--SK
hgCP II  GW--R-----PRRTILPASWDAEEFGLLGS---TEW-----AEENSR-LLQ
              :      *      : :      : . * *      * *      . :      * :

hQC      LHGMDLLVLLDLIGAPNPTFPNFF--PNSARWFERLQAIEHELH---ELGLLKDHSLEGR
SGAP     LAG---YLNFDMIGSPNPGYFVYDDDPVIEKTFKNYFAGLNVPT---EIETEGDGRSDHA
hgCP II  ERG-VAYINADSSIEGNYTLRVDCT-PLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKS
              *      : *      *      *      . . .      :      *      : .

hQC      Y---FQNYSY---G-G-----VIQDD-HIPFLRRGVP-VLHLIPSPFFEVWETMODNEE
SGAP     P---FKNVGVP--VG-G-----LFTGAGYTKSAAQAQK-WGGTAGQAFDRCYHSSCDSLS
hgCP II  PSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYP-LYESVYETYE
              * . .      * *      . :      :      . :      : * : : . .

hQC      NLDESTID-N-LNKILQVFVLEYLHL----
SGAP     NINDTALDRNSDAAAHAIWTLSSGTGEPPT
hgCP II  -LVEKFYD--PMFKYHLTVAQVRGGMVFEL
              : : .      *      .

```

图21

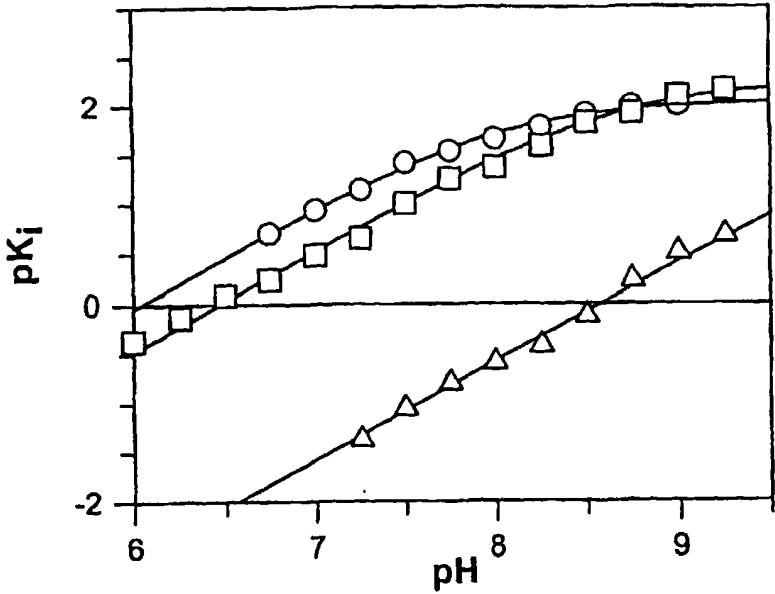


图22

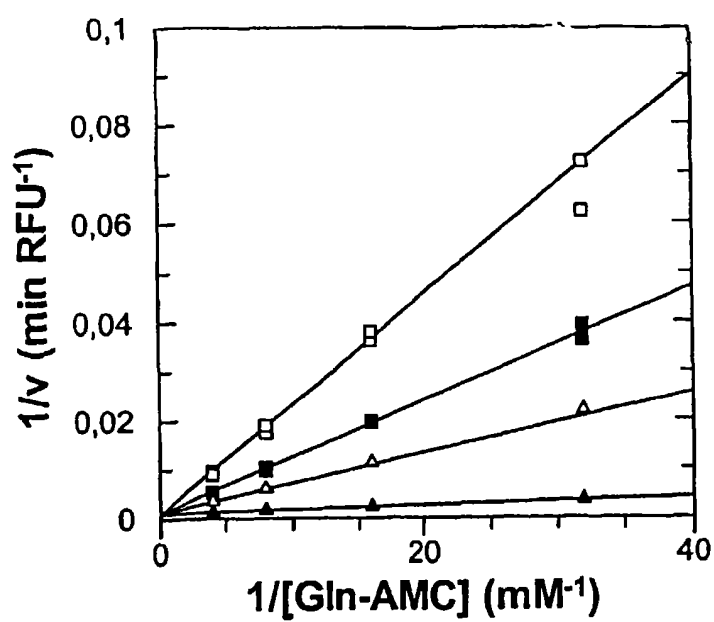


图23