

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к глутаминилциклазе (QC, КФ 2.3.2.5), которая катализирует внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты (5-оксопролин, pGlu*) с выделением в свободном состоянии аммиака и внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамата с образованием пироглутаминовой кислоты с выделением в свободном состоянии воды.

При создании настоящего изобретения были идентифицированы QC млекопитающих в качестве металлоферментов, выявлены новые физиологические субстраты QC в организме млекопитающих и разработаны пути применения эффекторов QC и фармацевтических композиций, содержащих эффекторы QC, для лечения состояний, которые можно лечить путем модуляции QC-активности. Кроме того, установлено, что взаимодействие с металлом является важным подходом для создания ингибиторов QC.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является применение эффекторов QC-активности в сочетании с ингибиторами DP IV (дипептидилпептидаза IV) или DP IV-подобных ферментов для лечения или облегчения состояний, которые можно лечить путем модуляции активности QC и/или DP IV.

Предложен также способ скрининга для идентификации и отбора эффекторов QC-активности.

Предпосылки создания изобретения

Глутаминилциклаза (QC, КФ 2.3.2.5) катализирует внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты (5-оксопролин, pGlu*) с выделением в свободном состоянии аммиака. QC впервые была выделена Messer из латекса тропического растения *Carica papaya* в 1963 г. (Messer M. *Nature* 4874, 1963, с. 1299). Спустя 24 года соответствующая ферментативная активность была обнаружена в гипофизе животных (Busby W.H.J. и др. *J. Biol. Chem.* 262, 1987, сс. 8532-8536; Fischer W.H. и Spiess J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1987, сс. 3628-3632). Для QC млекопитающих превращение Gln в pGlu с помощью QC было обнаружено для предшественников TRH (тиреолиберин) и GnRH (гонадолиберин) (Busby W.H.J. и др. *J. Biol. Chem.* 262, 1987, сс. 8532-8536; Fischer W.H. и Spiess J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1987, сс. 3628-3632). Кроме того, предварительные эксперименты по выявлению локализации QC позволили выявить ее совместную локализацию с предполагаемыми продуктами катализа в бычьем гипофизе, что является дополнительным доказательством ее функции в синтезе пептидных гормонов (Bockers T.M. и др. *J. Neuroendocrinol.* 7, 1995, сс. 445-453). В противоположность этому, физиологическая функция растительной QC все еще остается неясной. Предполагается, что фермент из *C. papaya* играет роль в защите растений от патогенных микроорганизмов (El Moussaoui A. и др. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2001, сс. 556-570). В настоящее время на основе сравнительного анализа последовательностей были выявлены предполагаемые QC из других растений (Dahl S.W. и др., *Protein Expr. Purif.* 20, 2000, сс. 27-36). Однако физиологическая функция этих ферментов все еще остается неясной.

Известные выделенные из растений и животных QC обладают строгой специфичностью в отношении L-глутамина в N-концевом положении субстратов, и установлено, что их кинетические характеристики описываются уравнением Михаэлиса-Ментена (Pohl T. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, сс. 10059-10063; Consalvo A.P. и др., *Anal. Biochem.* 175, 1988, сс. 131-138; Gololobov M.Y. и др., *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 377, 1996, сс. 395-398). Однако сравнение первичной структуры QC из *C. papaya* и высококонсервативных QC млекопитающих не выявило никакой гомологии последовательностей (Dahl S.W. и др., *Protein Expr. Purif.* 20, 2000, сс. 27-36). В то время, как растительные QC, вероятно, принадлежат к новому семейству ферментов (Dahl S.W. и др., *Protein Expr. Purif.* 20, 2000, сс. 27-36), установлено, что QC млекопитающих обладают выраженной гомологией последовательностей с бактериальными аминопептидазами (Bateman R.C. и др., *Biochemistry* 40, 2001, сс. 11246-11250), что позволило сделать заключение о различном эволюционном происхождении QC из растений и животных.

В EP 02011349.4 описаны полинуклеотиды, кодирующие глутаминилциклазу насекомых, а также кодируемые ими полипептиды. В этой заявке описаны также клетки-хозяева, которые содержат экспрессионные векторы, несущие полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении. Выделенные полипептиды и клетки-хозяева, содержащие QC насекомых, применяют в методах скрининга агентов, которые снижают глутаминилциклазную активность. Установлено, что такие агенты можно применять в качестве пестицидов.

Болезнь Альцгеймера (АБ) характеризуется аномальным накоплением внеклеточных амилоидных бляшек, непосредственно связанных с дистрофичными нейронами, реактивными астроцитами и микроглией (Terry R.D. и Katzman R., *Ann. Neurol.* 14, 1983, сс. 497-506; Glenner G.G. и Wong C.W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120, 1984, сс. 885-890; Intagaki S. и др. *J. Neuroimmunol.* 24, 1989, сс. 173-182; Funato H. и др., *Am. J. Pathol.* 152, 1998, сс. 983-992; Selkoe D.J., *Physiol. Rev.* 81, 2001, сс. 741-766). Амилоид-β-пептиды (Аβ-пептиды) являются основными компонентами старческих бляшек, и считается, что они непосредственно участвуют с патогенезе и развитии АБ, эта гипотеза подтверждается генетическими исследованиями (Glenner G.G. и Wong C.W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120, 1984, сс. 885-890; Borchelt D.R. и др., *Neuron.* 17, 1996, сс. 1005-1013; Lemere C.A. и др., *Nat. Med.* 2, 1996, сс. 1146-1150; Mann D.M. и Iwatsubo T. *Neurodegeneration* 5, 1996, сс. 115-120; Citron M. и др., *Nat. Med.* 3, 1997, сс. 67-72; Selkoe D.J., *Physiol. Rev.* 81, 2001, сс. 741-766). Аβ образуется в результате протеолитического процессинга β-амилоидного белка-предшественника (APP) (Kang, J. и др., *Nature* 325, 1987, сс. 733-736; Selkoe D.J.,

Trends Cell Biol. 8, 1998, сс. 447-453), который последовательно расщепляется β -секретазой на N-конце и γ -секретазой на C-конце $A\beta$ (Haass C. и Selkoe D.J., Cell 75, 1993, сс. 1039-1042; Simons M. и др., J. Neurosci. 16, 1996, сс. 899-908). Помимо доминирующих $A\beta$ -пептидов, у которых на N-конце находится L-Asp ($A\beta$ 1-42/40), в старческих бляшках присутствует множество гетерогенных укороченных на N-конце форм. Установлено, что такие укороченные пептиды обладают более высокой нейротоксичностью *in vitro* и у них существенно быстрее происходит агрегация по сравнению с полноразмерными изоформами (Pike C.J. и др., J. Biol. Chem. 270, 1995, сс. 23895-23898). Известно, что у пациентов на ранней стадии семейной АБ (СБА) происходит сверхпроизводство укороченных на N-конце пептидов (Saido T.C. и др., Neuron. 14, 1995, сс. 457-466; Russo C. и др., Nature 405, 2000, сс. 531-532), эти пептиды появляются в раннем возрасте в головном мозге пациентов, страдающих синдромом Дауна (ДС), и их количество увеличивается с возрастом (Russo C. и др. FEBS Lett. 409, 1997, сс. 411-416, Russo C. и др., Neurobiol. Dis. 8, 2001, сс. 173-180; Tekirian T.L. и др., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1998, сс. 76-94). И, наконец, их количество отражает развитие более серьезной формы заболевания (Russo C. и др., FEBS Lett. 409, 1997, сс. 411-416). Дополнительные посттрансляционные процессы могут также модифицировать N-конец в результате изомеризации или рацемизации аспартата в положении 1 и 7 и циклизации глутамата на остатках 3 и 11. Пироглутаматсодержащие изоформы в положении 3 [$pGlu^3$] $A\beta$ 3-40/42] представляют собой доминирующие формы - на их долю приходится примерно 50% общего количества укороченных на N-конце видов $A\beta$ в старческих бляшках (Mori H. и др., J. Biol. Chem. 267, 1992, сс. 17082-17086, Saido T.C. и др., Neuron. 14, 1995, сс. 457-466; Russo C. и др., FEBS Lett. 409, 1997, сс. 411-416; Tekirian T.L. и др., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1998, сс. 76-94; Geddes J.W. и др., Neurobiol. Aging 20, 1999, сс. 75-79; Harigaya Y. и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 2000, сс. 422-427), и они присутствуют также в преамилоидных повреждениях (Lalowski M. и др., J. Biol. Chem. 271, 1996, сс. 33623-33631). Накопление пептидов $A\beta$ N3(pE), вероятно, является следствием структурной модификации, которая усиливает агрегацию и придает устойчивость к большинству аминопептидаз (Saido T.C. и др., Neuron. 14, 1995, сс. 457-466; Tekirian T.L. и др., J. Neurochem. 73, 1999, сс. 1584-1589). Эти данные являются ключом к объяснению основной роли пептидов $A\beta$ N3(pE) в патогенезе АБ. Однако пока имеется относительно мало сведений об их нейротоксичности и способности к агрегации (He W. и Barrow C.J., Biochemistry 38, 1999, сс. 10871-10877; Tekirian T.L. и др., J. Neurochem. 73, 1999, сс. 1584-1589). Более того, совершенно нет данных о действии этих изоформ на глиальные клетки и о глиальном ответе на эти пептиды, хотя связь активированной глии со старческими бляшками точно установлена и глия может активно участвовать в накоплении амилоидных отложений. В современных исследованиях изучали токсичность, агрегацию и катаболизм пептидов $A\beta$ 1-42, $A\beta$ 1-40, [$pGlu^3$] $A\beta$ 3-42 и [$pGlu^3$] $A\beta$ 3-40 в культурах клеток нейронов и глии, и было установлено, что модификация пироглутамата усиливает токсичные свойства $A\beta$ -пептидов и ингибирует также их расщепление культивируемыми астроцитами. Shirotani с соавторами изучали образование пептидов [$pGlu^3$] $A\beta$ в первичных кортикальных нейронах, зараженных вирусом Синбис *in vitro*. Эти авторы сконструировали путем аминокислотной замены и делеции комплементарные ДНК амилоидного белка-предшественника, которые кодировали потенциальный предшественник [$pGlu^3$] $A\beta$. Для одного из искусственных предшественников, у которого на N-конце находился остаток глутамина вместо глутамата, присутствующего во встречающемся в естественных условиях предшественнике, сделано предположение о спонтанном превращении или ферментативном превращении с помощью глутаминилциклазы в пироглутамат. Механизм циклизации N-концевого глутамата в положении 3 во встречающемся в естественных условиях предшественнике пептида [$pGlu^3$] $A\beta$ *in vivo* не выяснен (Shirotani K., Tsubuki S., Lee H.J., Maruyama K. и Saido T.C., Neurosci. Lett. 327, 2002, сс. 25-28).

Дипептидилпептидаза IV (DP IV) представляет собой осуществляющую расщепление в положении после пролина (в меньшей степени после аланина, после серина или после глицина) сериновую протеазу, обнаруженную в различных тканях организма, включая почку, печень и кишечник, и она отщепляет N-концевые дипептиды от пептидной цепи. В настоящее время установлено, что DP IV играет важную роль в метаболизме нейропептидов, T-клеточной активации, прикреплении раковых клеток к эндотелию и в проникновении ВИЧ в лимфоидные клетки (см. WO 02/34242, WO 02/34243, WO 03/002595 и WO 03/002596).

Известно, что ингибиторы DP IV можно применять для лечения нарушенной толерантности к глюкозе и сахарного диабета (международная заявка на патент, публикация WO 99/61431, Pederson R.A. и др., Diabetes 47, 1998, сс. 1253-1258 и Pauly R.P. и др., Metabolism 48, 1999, сс. 385-389). В частности, в WO 99/61431 описаны ингибиторы DP IV, содержащие аминокислотный остаток и тиазолидиновую или пирролидиновую группу, и их соли, прежде всего L-треоизолейцилтиазазолидин, L-аллоизолейцилтиазазолидин, L-треоизолейцилпирролидин, L-аллоизолейцилпирролидин и их соли.

Дополнительными примерами низкомолекулярных ингибиторов дипептидилпептидазы IV являются такие агенты, как тетрагидроизохинолин-3-карбоксамидные производные, N-замещенные 2-цианпирролы и -пирролидины, N-(N'-замещенный глицил)-2-цианпирролидины, N-(замещенный глицил)тиазазолидины, N-(замещенный глицил)-4-циантиазазолидины, аминокислотные пирролидины и гетероциклические соединения. Ингибиторы дипептидилпептидазы IV описаны в US 6380398, US 6011155; US 6107317; US 6110949; US 6124305; US 6172081; WO

95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19834591, WO 97/40832, DE 19616486 C2, 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 и 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 и WO 03/024965, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки, прежде всего, касательно этих ингибиторов, их определения, применения и получения.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к новым физиологическим субстратам QC в организме млекопитающих, таким как Aβ3-40/42, [Gln³]Aβ3-40/42, [Glu¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹]гастрин, [Gln¹]нейротензин, [Gln¹]FPP, [Gln¹]CCL 2, [Gln¹]CCL 7, [Gln¹]CCL 8, [Gln¹]CCL 16, [Gln¹]CCL 18, [Gln¹]фракталкин, [Gln¹]орексин А, [Gln³]глюкагон3-29 и [Gln⁵]субстанция P5-11, и к применению эф- фекторов QC и фармацевтических композиций, содержащих эффекторы QC, для лечения состояний, ко- торые можно лечить путем модуляции активности QC.

С помощью экспериментов по ингибированию установлено, что человеческая QC представляет собой металлзависимую трансферазу. Апофермент QC может проявлять наибольшую реакционную спо- собность в присутствии ионов цинка, и металлсвязывающий мотив цинкзависимых аминокислотид аз при- сутствует также в человеческой QC. Соединения, которые взаимодействуют с активным сайтом связыва- ния металла, являются эффективными ингибиторами.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что рекомбинантная человеческая QC, а также активность QC в экстрактах, выделенных из головного мозга, катализирует циклизацию как N- концевого глутамила, так и глутамата. В этом исследовании убедительно доказано, что для катализи- руемого циклазой Glu¹-превращения оптимальным является значение pH, близкое к 6,0, а для Gln¹- превращения в pGlu-производное оптимальным является значение pH, близкое к 8,0. Поскольку образо- вание пептидов, родственных pGlu-Aβ, можно подавлять путем ингибирования рекомбинантной чело- веческой QC и QC-активности экстрактов, выделенных из гипофиза свиньи, фермент QC является мише- нью для разработки пути лечения болезни Альцгеймера.

Путем введения млекопитающим эффекторов QC-активности можно предупреждать, или облегчать, или лечить такие состояния, как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, язвенная болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, ши- зофрения, бесплодие, неоплазия, воспалительные реакции хозяина, рак, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные про- цессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нару- шенная связанная с гомеостазом регуляция энергетического метаболизма, нарушенная функция вегетатив- ной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенная регуляция общей воды организма.

Кроме того, путем введения млекопитающему эффекторов QC-активности можно стимулировать пролиферацию клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферацию слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острую секрецию кислоты и дифференцировку продуцирующих кисло- ту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноцитоподобных клеток.

Кроме того, путем введения млекопитающему эффекторов QC-активности можно подавлять про- лиферацию миелоидных клеток-предшественников.

Путем введения ингибиторов QC можно также подавлять мужскую фертильность.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является применение эф- фекторов QC-активности в сочетании с ингибиторами DP IV или ферментов, подобных DP IV, для лече- ния или облегчения состояний, которые можно лечить путем модуляции активности QC и/или DP IV.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, предназначенным для парен- терального, энтерального или орального введения, которые содержат по меньшей мере один эффектор QC необязательно в сочетании с общепринятыми носителями и/или эксципиентами или которые содер- жат по меньшей мере один эффектор QC в сочетании по меньшей мере с одним ингибитором DP IV не- обязательно в сочетании с общепринятыми носителями и/или эксципиентами.

Разработаны также способы скрининга для идентификации и отбора эффекторов QC.

Краткое описание чертежей

Эти и другие аспекты настоящего изобретения проиллюстрированы ниже со ссылкой на чертежи, на которых показано:

на фиг. 1 - кривые, характеризующие процесс циклизации H-Gln-Ala-OH, катализируемой чело- веческой QC, по снижению абсорбции при 340 нм. Образцы содержали 0,3 мМ НАДН/H⁺, 14 мМ α-кето- глутаровую кислоту, 30 ед./мл глутаматдегидрогеназы и 1 мМ H-Gln-Ala-OH. На кривых А-Г представ- лены результаты, полученные с использованием различных концентраций QC: А, 10 мед. (0,001 стан- дартной единицы)/мл, Б, 5 мед./мл, В, 2,5 мед./мл. На кривой Г представлены результаты, полученные без QC. Обнаружена линейная зависимость полученной активности от концентрации QC (вклейка);

на фиг. 2 - зависимость от pH активности человеческой QC и QC из папайи (вставка), которую опре-

деляли в условиях скорости реакции первого порядка с использованием в качестве субстрата Gln- β NA. Для человеческой QC использовали буферную систему, обеспечивающую постоянную ионную силу, предложенную Ellis и Morrison, в состав которой входили 25 мМ MES, 25 мМ уксусная кислота и 50 мМ Трис (Ellis K.J. и Morrison J.F., *Methods Enzymol.* 87, 1982, сс. 405-426). Из-за некоторого ингибирующего действия Трис на фермент QC из папайи изучали с использованием 50 мМ Морс-буфера. Ионную силу доводили до 0,05М, добавляя NaCl. Профили скорости реакции оценивали путем аппроксимации с использованием модели, основанной на концепции диссоциирующих групп. Для QC из папайи при аппроксимации данных с использованием модели однократной диссоциации установлено, что значение pK_a составляло $7,13 \pm 0,03$;

на фиг. 3 - данные о воздействии значений pH на стабильность QC из латекса папайи и человеческой QC. Маточный раствор фермента разбавляли в 20 раз 0,1М буфером с различными значениями pH (натрий-цитратный буфер, pH 4-7 и натрийфосфатный буфер, pH 7-10). Растворы ферментов инкубировали при 30°C в течение 30 мин и затем оценивали ферментативную активность согласно стандартному протоколу;

на фиг. 4 - результаты сравнения констант специфичности k_{cat}/K_M для набора субстратов, содержащих глутамат в положении второй аминокислоты. В то время, как при переходе от ди- к трипептидам было обнаружено повышение специфичности человеческой QC, никаких изменений в этом варианте не обнаружено для QC из папайи. Представленные диаграммы получены на основе параметров, приведенных в табл. 3;

на фиг. 5 - данные об образовании pGlu-Lys(pGlu)-Arg-Leu-Ala-NH₂ из H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂, катализируемом человеческой QC. Превращение субстрата оценивали по зависящему от времени изменению в соотношении m/z, обусловленному выбросом аммиака. Образец имел следующий состав: 0,5 мМ субстрат, 38 нМ QC в 40 мМ трис/HCl, pH 7,7. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу. Очень близкая зависимость обнаружена и для QC из папайи;

на фиг. 6 - данные об образовании pGlu-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ из H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂, катализируемом QC из папайи. Превращение субстрата оценивали по зависящему от времени изменению в соотношении m/z, обусловленному выбросом метиламина. Образец имел следующий состав: 0,5 мМ субстрат, 0,65 мкМ QC из папайи в 40 мМ Трис/HCl, pH 7,7. В указанные моменты времени образцы изымали из лабораторной пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу. Никакого превращения субстрата не обнаружено в образцах без QC из папайи или при добавлении к субстрату вплоть до 1,5 мкМ человеческой QC (данные не представлены);

на фиг. 7 - данные об образовании [Gln³]-A β 3-11 из [Gln³]A β 1-11, катализируемом DP IV. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 8 - данные о предупреждении расщепления [Gln³]A β 1-11 с помощью ингибитора DP IV Val-пирролидида (Val-Пугт). В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 9 - данные об образовании [pGlu³]A β 3-11 из [Gln³]A β 3-11, катализируемом QC. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 10 - данные об ингибировании образования [pGlu³]A β 3-11 из [Gln³]A β 3-11 с помощью ингибитора QC 1,10-фенантролина. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 11 - данные об образовании [pGlu³]A β 3-11 из [Gln³]A β 1-11 после последовательного катализа с помощью DP IV и QC. В указанные моменты времени образцы изымали из лабораторной пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 12 - данные об ингибировании образования [pGlu³]A β 3-11 из [Gln³]A β 1-11 с помощью ингибитора QC 1,10-фенантролина в присутствии каталитически активных DP IV и QC. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 13 - данные о снижении образования [pGlu³]A β 3-11 из [Gln³]A β 1-11 с помощью ингибитора DP IV Val-Пугт в присутствии каталитически активных DP IV и QC. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 14 - данные об образовании [pGlu³]A β -пептид3-11 из [Gln³]A β 1-11 после последовательного катализа аминокатализатором(ами) и QC, которые присутствовали в гомогенате гипофиза свиньи. В указанные моменты времени образцы изымали из аналитической пробирки, смешивали с матричным раствором (1:1, об./об.) и затем подвергали масс-спектрометрическому анализу;

на фиг. 15 А и Б - масс-спектры A β 3-11a и A β 3-21a, инкубированных в присутствии рекомбинантной человеческой QC, которую кипятили в течение 10 мин перед применением. На фиг. 15 В и Д представлены масс-спектры A β 3-11 и A β 3-21a в присутствии активной человеческой QC, что приводило к образованию [pGlu³]A β 3-11a и [pGlu³]A β 3-21a, соответственно. На фиг. 15 Д и Е представлены масс-спектры A β 3-11a и A β 3-21a в присутствии активной QC и 5 мМ бензимидазола, подавляющего образование [pGlu³];

на фиг. 16 - скорости реакции катализируемого QC из папайи превращения Glu- β -NA в зависимости от концентрации субстрата. Начальные скорости оценивали в 0,1М пирофосфатном буфере, pH 6,1 (квадраты), 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5 (кружки) и 0,1М боратном буфере, pH 8,5 (треугольники). Значения кинетических параметров: $K_M=1,13\pm0,07$ мМ, $k_{cat}=1,13\pm0,04$ мин⁻¹ (pH 6,1); $K_M=1,45\pm0,03$ мМ, $k_{cat}=0,92\pm0,01$ мин⁻¹ (pH 7,5); $K_M=1,76\pm0,06$ мМ, $k_{cat}=0,56\pm0,01$ мин⁻¹ (pH 8,5);

на фиг. 17 - зависимость от pH превращения Gln- β NA (кружочки) и Glu- β NA (квадраты), которую определяли в условиях скорости реакции первого порядка ($S \ll K_M$). Использовали концентрацию субстрата 0,01 и 0,25 мМ, соответственно. Для обоих вариантов использовали трехкомпонентную буферную систему, включающую 0,05М уксусную кислоту, 0,05М пирофосфорную кислоту и 0,05М трицин. Все буферы доводили до одинаковой проводимости путем добавления NaCl для того, чтобы избежать различий в ионной силе. Данные аппроксимировали с помощью уравнений, позволивших установить для двух диссоциирующих групп значения pK_a 6,91 $\pm$ 0,02 и 9,5 $\pm$ 0,1 для Gln- β NA и 4,6 $\pm$ 0,1 и 7,55 $\pm$ 0,02 для Glu- β NA. Значения pK_a для аминогрупп соответствующего субстрата, которые определяли титрованием, составили 6,97 $\pm$ 0,01 (Gln- β NA) и 7,57 $\pm$ 0,05 (Glu- β NA). Все определения осуществляли при 30°C;

на фиг. 18 - кривые, характеризующие процесс катализируемой человеческой QC циклизации H-Gln-АМС в присутствии имидазола, дипикколиновой кислоты и без ингибитора. Гиперболическая форма кривой в присутствии дипикколиновой кислоты свидетельствует об удалении иона металла из активного сайта QC;

на фиг. 19 - зависящая от времени инактивация QC с помощью гетероциклического хелатора 1,10-фенантролина. После инкубации фермента QC с ингибитором в отсутствие субстрата (сплошная линия) обнаружена пониженная ферментативная активность по сравнению с образцами, которые не подвергали предварительной инкубации с ингибитором (пунктирная линия), что свидетельствует об удалении иона металла из активного сайта QC;

на фиг. 20 - реактивация человеческой QC ионами одновалентных и двухвалентных металлов. QC инактивировали добавлением 2 мМ дипикколиновой кислоты в 50 мМ бис-трис-буфере, pH 6,8. Затем фермент подвергали диализу в противотоке 50 мМ бис-трис-буфера, pH 6,8, содержащего 1,0 мМ ЭДТК. Для реактивации фермента осуществляли инкубацию инактивированного образца фермента с ионами металлов в концентрации 0,5 мМ в присутствии 0,5 мМ ЭДТК для того, чтобы избежать неспецифической реактивации следами ионов металлов, присутствующих в буферных растворах. В качестве контролей использовали содержащие фермент образцы, которые не инактивировали, но так же, как и инактивированный фермент, подвергали диализу в противотоке раствора ЭДТК (+ЭДТК), и образцы фермента, которые подвергали диализу в противотоке буферных растворов, не содержащих ЭДТК (-ЭДТК);

на фиг. 21 - сравнительный анализ последовательностей человеческой QC (hQC) и других представителей семейства M28 металлопептидаз Clan MH. Сравнительный анализ множества последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW в ch.EMBnet.org с принимаемыми по умолчанию параметрами. Превращение связанных с ионом цинка остатков обнаружено для человеческой QC (hQC; GenBank X71125), Zn-зависимой аминопептидазы из *Streptomyces griseus* (SGAP; Swiss-Prot P80561) и в N-ацетилированном-альфа-связанном кислотном дипептидазном домене (NAALADase I) (остатки 274-587) человеческой глутаматкарбоксипептидазы II (hGCP II; Swiss-Prot Q04609). Аминокислоты, участвующие в связывании металла, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В случае человеческой QC эти остатки, вероятно, являются «двойниками» пептидаз.

Пептидные последовательности

Упомянутые и применяемые согласно настоящему описанию пептиды имеют следующие последовательности.

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 1-11a:

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

A β 3-11a:

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

A β 1-21a:

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

Aβ3-21a:

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

Gln³-Aβ3-40:

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-Aβ3-21a:

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

Gln³-Aβ1-11a:

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

Gln³-Aβ3-11a:

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

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к эффекторам глутаминилциклазы (QC), предназначенным:

а) для лечения болезней у млекопитающих, которые можно лечить путем модуляции активности QC *in vivo*;

б) и/или для модуляции физиологических процессов, основанных на действии pGlu-содержащих пептидов, обусловленном модуляцией активности QC.

Кроме того, настоящее изобретение относится к соединениям, предназначенным для ингибирования глутаминилциклазы (QC, КФ 2.3.2.5) и/или QC-подобных ферментов в организме млекопитающего и к применению ингибиторов QC-активности для лечения патологических состояний, связанных с QC-активностью.

В настоящем изобретении предложен также новый способ лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна. N-концы амилоидных β-пептидов, отложение которых происходит в головном мозге при болезни Альцгеймера и синдроме Дауна, несут пироглутаминовую кислоту. Образование pGlu представляет собой важное событие в развитии и прогрессировании заболевания, так как известно, что амилоидные β-пептиды характеризуются повышенной тенденцией к агрегации β-амилоидов и токсичностью, чем, вероятно, обусловлено начало и развитие болезни (Russo C. и др., J. Neurochem. 82, 2002, сс. 1480-1489).

В противоположность этому, во встречающихся в естественных условиях Aβ-пептидах (3-40/42) в качестве N-концевой аминокислоты присутствует глутаминовая кислота. К настоящему времени отсутствуют данные о превращении Glu в pGlu. Кроме того, пока не обнаружена спонтанная циклизация Glu-пептидов в pGlu-пептиды. Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является выяснение роли QC в болезни Альцгеймера и синдроме Дауна. Эта задача решается с помощью синтеза Aβ3-11 и Aβ1-11, которые содержат аминокислоту глутамин вместо глутаминовой кислоты в положении 3, определения особенностей этих модифицированных амилоидных β-пептидов в качестве субстратов для QC, DP IV и DP IV-подобных ферментов и аминоклотаза и применения ингибиторов QC для предупреждения образования pGlu из N-концевого глутаминильного остатка выведенных из амилоида β-пептидов 1-11 и 3-11. Результаты описаны в примере 8. Примененный метод описан в примере 3.

К настоящему времени отсутствуют какие-либо сведения об участии QC в развитии заболевания, поскольку N-концевой аминокислотой в Aβ (3-40/42 или 11-40/42) является глутаминовая кислота. Однако QC является единственным известным ферментом, который обладает способностью образовывать pGlu на N-конце пептидов. Другие объекты настоящего изобретения касаются следующих данных и открытий:

а) побочная реакция катализируемой QC циклизации глутаминовой кислоты с образованием пироглутаминовой кислоты происходит с очень низкой скоростью,

б) глутаминовая кислота β-амилоидного белка-предшественника (APP) или образованные из нее амилоидные β-пептиды превращаются в глутамин после трансляции с помощью неизвестной ферментативной активности, а на второй стадии QC катализирует циклизацию глутамин с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β-пептида,

в) глутаминовая кислота превращается в глутамин после трансляции с помощью химического катализа или автокатализа, а затем QC катализирует циклизацию глутамин с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β-пептида,

г) в гене APP присутствуют мутации, которые кодируют амилоидный β-белок, что приводит к замене Glu в положении 3 на Gln. После трансляции и процессинга N-конца QC катализирует циклизацию глутамин с образованием пироглутаминовой кислоты,

д) глутамин включается в возникающую пептидную цепь APP вследствие функционального нарушения неизвестной ферментативной активности, и поэтому QC катализирует циклизацию N-концевого глутамин с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β-пептида.

QC участвует в имеющей решающее значение стадии во всех 5 перечисленных выше случаях, а именно в образовании пироглутаминовой кислоты, которая способствует агрегации амилоидных β-пептидов. Таким образом, ингибирование QC приводит к предупреждению осаждения бляшкообразующих Aβ3-40/41/43 или Aβ11-40/41/43, вызывая появление и прогрессирование болезни Альцгеймера и синдрома Дауна, в независимости от механизма, посредством которого происходит циклизация.

Глутамат обнаружен в положениях 3, 11 и 22 амилоидного β -пептида. Среди прочего описана мутация, приводящая к замене глутаминовой кислоты (E) на глутамин (Q) в положении 22 (соответствующая амилоидному белку-предшественнику APP 693, Swissprot P05067), в качестве мутации, приводящей к цереброартериальному амилоидозу датского типа.

Установлено, что β -амилоидные пептиды, несущие остаток пироглутаминовой кислоты в положении 3, 11 и/или 22, являются более цитотоксическими и гидрофобными по сравнению с $A\beta$ 1-40/42/43 (Saido T.C., Medical Hypotheses 54(3), 2000, сс. 427-429).

Многочисленные N-концевые вариации в различных местоположениях β -сайта можно получать с помощью β -секретазы, фермента, расщепляющего β -сайт амилоидного белка-предшественника (BACE) (Huse J.T. и др., J. Biol. Chem. 277 (18), 2002, сс. 16278-16284), и/или процессинга с помощью аминопептидазы. Во всех случаях циклизация может происходить согласно описанным выше механизмам а)-д).

Таким образом, к настоящему времени отсутствуют экспериментальные данные, подтверждающие ферментативный путь превращения Glu^1 -пептидов в $pGlu$ -пептиды с помощью неизвестной глутамилциклазы (EC), что соответствует механизму а) (Garden R.W., Moroz T.P., Gleeson J.M., Floyd P.D., Li L.J., Rubakhin S.S. и Sweedler J.V. J. Neurochem. 72, 1999, сс. 676-681; Hosoda R. и др. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1998, сс. 1089-1095). К настоящему времени не была обнаружена такая ферментативная активность, которая может осуществлять циклизацию Glu^1 -пептидов, протонированных на N-конце и несущих отрицательно заряженный остаток $Glu^1\gamma$ -карбоксилата, при слабых щелочных значениях pH.

QC-активность в отношении Gln^1 -субстратов очень резко снижалась при значениях pH ниже 7,0. В противоположность этому, установлено, что превращение Glu^1 может происходить в кислых реакционных средах (Iwatsubo T., Saido T.C., Mann D.M., Lee V.M. и Trojanowski J.Q., Am. J. Pathol. 149, 1996, сс. 1823-1830; Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P. и Teller J.K., FEBS Lett. 409, 1977, сс. 411-416; Russo C., Salis S., Dolcini V., Venezia V., Song X.H., Teller J.K. и Schettini G., Neurobiol. Dis. 8, 2001, сс. 173-180; Tekirian T.L., Saido T.C., Markesbery W.R., Russell M.J., Wekstein D.R., Patel E. и Geddes J.W., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1998, сс. 76-94; Russo C., Violani E., Salis S., Venezia V., Dolcini V., Damonte G., Benatti U., D'Arrigo C., Patrone E., Carlo P. и Schettini G., J. Neurochem. 82, 2002, сс. 1480-1489; Hosoda R., Saido T.C., Otvos L., Jr., Arai T., Mann D.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q. и Iwatsubo T., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1998, сс. 1089-1095; Garden R.W., Moroz T.P., Gleeson J.M., Floyd P.D., Li L.J., Rubakhin S.S. и Sweedler J.V., J. Neurochem. 72, 1999, сс. 676-681).

При создании настоящего изобретения изучался вопрос о том, может ли QC распознавать и участвовать в превращении выведенных из амилоида- β пептидов в слабокислых условиях. Для этой цели синтезировали и исследовали в качестве потенциальных субстратов фермента пептиды $[Gln^3]A\beta$ 1-11a, $A\beta$ 3-11a, $[Gln^3]A\beta$ 3-11a, $A\beta$ 3-21a, $[Gln^3]A\beta$ 3-21a и $[Gln^3]A\beta$ 3-40. Эти последовательности были выбраны для имитации встречающихся в естественных условиях укороченных на N-конце и на C-конце пептидов $[Glu^3]A\beta$ и пептидов $[Gln^3]A\beta$, которые могут присутствовать в результате посттрансляционного амидирования Glu .

При создании настоящего изобретения было установлено, что QC из папайи и человеческая QC катализируют циклизацию как глутамила, так и глутамила. По-видимому, первичной физиологической функцией QC является прекращение созревания гормонов в эндокринных клетках посредством циклизации глутамина до или во время процесса секреции гормона. Известно, что такие секреторные пузырьки характеризуются кислым значением pH. Таким образом, побочная активность фермента в узком диапазоне значений pH от 5,0 до 7,0 может представлять собой открытую при создании настоящего изобретения глутамилциклазную активность, которая трансформирует также пептиды Glu - $A\beta$. Однако из-за существенно меньшей скорости Glu -цикликации по сравнению с Gln -конверсией вопрос о том, может ли циклизация глутамила играть важную физиологическую роль, является спорным. При этом циклизация глутамила участвует в патологии нейродегенеративных заболеваний.

При создании настоящего изобретения при изучении зависимости этой ферментативной реакции от значений pH установлено, что непротонированный N-конец играет ключевую роль для циклизации Gln^1 -пептидов и, соответственно, значение pK_a субстрата идентично значению pK_a при QC-катализе (см. фиг. 17). Таким образом, QC стабилизирует внутримолекулярное нуклеофильное воздействие непротонированной α -аминогруппы на γ -карбонильный углерод, который приобретает электрофильные свойства в результате амидирования (схема 1).

В отличие от одновалентного заряда, присутствующего в пептидах, несущих N-концевой глутамин, N-концевой остаток Glu в содержащих Glu пептидах в большинстве случаев несет двухвалентный заряд при нейтральных значениях pH. Для глутамата характерно значение pK_a примерно 4,2 и 7,5 для γ -карбоксильного остатка и для α -аминогруппы, соответственно. То есть при нейтральных и щелочных значениях pH хотя азот α -аминогруппы является частично или полностью непротонированным и нуклеофильным, γ -карбоксильная группа является непротонированной и поэтому не проявляет никакой электрофильной, характерной для карбонила, активности. Поэтому внутримолекулярная циклизация представляется невозможной.

Однако при значениях pH примерно 5,2-6,5, с учетом соответствующих значений pK_a , обе функциональные группы присутствуют в неионизированной форме в концентрациях примерно 1-10% ($-NH_2$) или 10-1% ($-COOH$) от общей массы N-концевого содержащего Glu пептида. В результате при слабокислых значениях pH присутствуют виды N-концевых Glu -пептидов, в которых обе группы являются неза-

ряженными, и поэтому представляется возможным, что QC может стабилизировать промежуточное звено внутримолекулярной циклизации с образованием pGlu-пептида. То есть, если γ -карбоксильная группа является протонированной, то углерод карбонила является достаточно электрофильным, что позволяет осуществлять нуклеофильное воздействие на него непротонированной α -аминогруппы. При таких значениях pH ион гидроксила функционирует в качестве уходящей группы (схема 3). Эти предположения подтверждаются данными о зависимости от pH, полученными для катализируемого QC превращения Glu- β NA (см. пример 11). В отличие от превращения с помощью QC глутамата Gln- β NA, оптимум pH катализа сдвигается в кислотный диапазон значений pH, примерно pH 6,0, т.е. диапазон значений pH, при котором одновременно присутствует значительное количество видов молекул субстрата, которые несут протонированную γ -карбоксильную и непротонированную α -аминогруппу. Кроме того, характеризующее кинетическую реакцию конкретное значение pK_a , составляющее $7,55 \pm 0,02$, очень хорошо согласуется со значением, установленным для α -аминогруппы Glu- β NA с помощью титрования ($7,57 \pm 0,05$).

С физиологической точки зрения, при pH 6,0 константа скорости реакции второго порядка (или константа специфичности k_{cat}/K_M) катализируемой QC циклизации глутамата может быть примерно в 8000 раз ниже, чем константа, характеризующая циклизацию глутамата (фиг. 17). Однако не связанное с ферментом превращение обоих модельных субстратов Glu- β NA и Gln- β NA является очень незначительным, что согласуется с данными о незначительном образовании pGlu-пептида, полученными при создании настоящего изобретения. Следовательно, из соотношения констант скорости ферментативной и неферментативной реакций (при сравнении констант скорости реакции второго порядка для ферментативного катализа с соответствующими константами скорости реакции первого порядка для неферментативной циклизации коэффициент каталитической эффективности составляет 10^9 - $10^{10} M^{-1}$ для Gln- и Glu-превращения, соответственно) можно оценить, что для образования pGlu с помощью QC может быть достигнуто ускорение по меньшей мере в 10^8 раз. Из этих данных можно сделать вывод о том, что *in vivo* возможным является только ферментативный путь, приводящий к образованию pGlu.

Поскольку QC присутствует в больших количествах в головном мозге, а также принимая во внимание высокую скорость превращения, составляющую $0,9 \text{ мин}^{-1}$, которая в последние годы установлена для созревания 30 мкМ (Gln-)TRH-подобного пептида (Prokai L., Prokai-Tatrai K., Ouyang X., Kim H.S., Wu W.M., Zharikova A. и Bodor N., J. Med. Chem. 42, 1999, сс. 4563-4571), можно предсказать, что время полужизни соответствующего глутаматного субстрата при его циклизации составляет примерно 100 ч, что совпадает с предложенными в настоящем описании реакционными условиями. Кроме того, принимая во внимание компартментализацию и локализацию в головном мозге QC/EC в пути секреции, *in vivo* в неповрежденных клетках фактические концентрации фермента и субстрата и условия реакции могут оказаться еще более оптимальными для ферментативной циклизации. А также, если N-концевой Glu заменяют на Gln, то можно ожидать еще более быстрое образование pGlu, опосредуемое QC. *In vitro* обе реакции подавлялись при внесении ингибиторов QC/EC-активности (фиг. 9, 10 и 15).

В целом, при создании настоящего изобретения установлено, что человеческая QC, которая присутствует в больших количествах в головном мозге, вероятно, катализирует образование амилоидогенных пептидов pGlu-A β из предшественников Glu-A β и Gln-A β , на долю которых приходится более чем 50% отложений бляшек при болезни Альцгеймера. Эти данные позволили установить, что QC/EC участвуют в образовании старческих бляшек и вследствие этого представляют собой новую мишень для разработки лекарственных средств, предназначенных для лечения болезни Альцгеймера.

Второй вариант осуществления настоящего изобретения касается того, что выведенные из амилоида- β пептиды являются субстратом для дипептидилпептидазы IV (DP IV) или подобных DP IV ферментов, предпочтительно дипептидилпептидазы II (DP II). DP IV, DP II или другие подобные DP IV ферменты высвобождают дипептид из N-конца модифицированного амилоидного β -пептида (1-11), что приводит к образованию амилоидного β -пептида (3-11), у которого в качестве N-концевого аминокислотного остатка присутствует глутамин. Эти результаты представлены в примере 8.

Перед расщеплением с помощью DP II, DP IV или другого подобного DP IV фермента пептидная связь между аспарагиновой кислотой (остаток 1 амилоидного β -пептида) и аланином (остаток 2 амилоидного β -пептида) может быть изомеризована с образованием изоаспартильного остатка, что описано в литературе (Kuo Y.-M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J., Roher A.E., BBRC 237, 1997, сс. 188-191; Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H. и Shirasawa T., Arch. Biochem. Biophys. 381, 2000, сс. 225-234).

Эти изоаспартильные остатки придают амилоидному β -пептиду устойчивость к расщеплению аминопептидазой, и в результате коровые бляшки содержат более высокие количества изоAsp¹-амилоидных β -пептидов, что позволяет предположить пониженное превращение на N-конце.

Однако в настоящем изобретении впервые продемонстрировано, что под воздействием дипептидилпептидаз может высвобождаться N-концевой дипептид N-изоAsp¹-Ala²-OH, прежде всего, в кислотных условиях. Кроме того, при создании изобретения было установлено, что изомеризация может предшествовать также расщеплению β -секретазой и что изомеризация может ускорять протеолитическое расщепление, что приводит к выделению в свободном состоянии N-концевой изоаспартильной связи изоAsp¹-амилоидных β -пептидов, которые, в свою очередь, являются объектом для обновления с помощью DP II,

DP IV или подобных DP IV ферментов (Momand J. и Clarke S., *Biochemistry* 26, 1987, сс. 7798-7805; Kuo Y.-M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J., Roher A.E., *BBRC* 237, 1997, сс. 188-191). Таким образом, ингибирование образования изоаспартила может приводить к снижению расщепления β -секретазой и, в свою очередь, к пониженному образованию амилоидных β -пептидов. Кроме того, блокада превращения изоAsp¹-амилоидного β -пептидов путем ингибирования DP II, DP IV или подобных DP IV ферментов должна препятствовать катализируемому QC/EC образованию [pGlu³]A β из [Glu³]A β .

Согласно третьему варианту осуществления настоящего изобретения комбинацию ингибиторов активности DP IV и ингибиторов QC можно применять для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

Совместное действие DP IV и/или подобных DP IV ферментов и QC иллюстрируют следующие факты:

а) DP IV и/или подобные DP IV ферменты расщепляют A β 1-40/42, при этом высвобождается дипептид, содержащий H-Asp-Ala-OH и A β 3-40/42,

б) побочная реакция катализируемой QC циклизации глутаминовой кислоты с образованием пироглутаминовой кислоты происходит с очень низкой скоростью,

в) глутаминовая кислота превращается в глутамин на N-конце после трансляции с помощью неизвестной ферментативной активности, а затем QC катализирует циклизацию глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β -пептида,

г) глутаминовая кислота превращается в глутамин после трансляции с помощью химического катализа или автокатализа, а на второй стадии QC катализирует циклизацию глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β -пептида,

д) в гене APP присутствуют мутации, которые кодируют амилоидный β -белок, что приводит к замене Glu в положении 3A β Gln. После трансляции и процессинга N-конца QC катализирует циклизацию глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты,

е) глутамин включается в возникающую пептидную цепь APP вследствие функционального нарушения неизвестной ферментативной активности, и поэтому QC катализирует циклизацию N-концевого глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты после процессинга N-конца амилоидного β -пептида.

QC-активность в отношении N-концевого Gln может запускаться также действием различных пептидаз. Аминопептидазы могут удалять последовательно Asp и Ala из N-конца A β 1-40/41/43, демаскируя тем самым аминокислоту в положении 3, которая может подвергаться циклизации. Дипептидилпептидазы, такие как DP I, DP II, DP IV, DP 8, DP 9 и DP 10, в одну стадию осуществляют удаление дипептида Asp-Ala. Таким образом, ингибирование аминопептидазной или дипептидилпептидазной активности можно применять для предупреждения образования A β 3-40/41/43.

Совместное действие ингибиторов DP IV и/или подобных DP IV ферментов и снижающих активность эффекторов QC можно проиллюстрировать следующим образом:

а) ингибиторы DP IV и/или подобных DP IV ферментов ингибируют превращение A β 1-40/42 в A β 3-40/42,

б) тем самым предотвращается воздействие на N-концевую глутаминовую кислоту и не происходит ее превращение в глутамин либо ферментативным путем, либо с помощью химического катализа, что в дальнейшем делает возможным образование пироглутаминовой кислоты,

в) ингибиторы QC предупреждают также образование пироглутаминовой кислоты из любых молекул A β 3-40/42 с модифицированными остатками и тех модифицированных молекул A β 3-40/42, которые образуются в результате мутаций гена APP.

При создании настоящего изобретения аналогичное совместное действие DP IV или подобных DP IV ферментов и QC было продемонстрировано также для других пептидных гормонов, таких как глюкагон, СС-хемокины и вещество Р.

Глюкагон представляет собой состоящий из 29 аминокислот полипептид, который выделяется из альфа-клеток панкреатических островков, и его функцией является поддержание нормальной глициемии путем стимуляции печеночного гликогенолиза и глюконеогенеза. Несмотря на важность этого вопроса, сохраняются противоположные мнения о механизме, ответственном за клиренс глюкагона в организме. Pospisilik с соавторами изучали ферментативный метаболизм глюкагона с помощью высокочувствительных методов масс-спектрометрии для идентификации продукта на молекулярном уровне. Инкубация глюкагона с очищенной свиной дипептидилпептидазой IV (DP IV) приводила к последовательному производству глюкагона 3-29 и глюкагона 5-29. В человеческой сыворотке расщепление до глюкагона 3-29 сопровождалось быстрой N-концевой циклизацией глюкагона, что препятствовало дальнейшему опосредуемому DP IV гидролизу. Биологический анализ глюкагона после его инкубации с очищенной DP IV или нормальной крысиной сывороткой продемонстрировал значительное снижение гипергликемической активности, в то время как аналогичная инкубация с крысиной сывороткой с дефицитом DP IV не приводила ни к какому снижению биологической активности глюкагона. Расщепление, для оценки которого применяли масс-спектрометрию и биологический анализ, блокировали с помощью специфического ингибитора DP IV изолейцилтиазолидина. Эти результаты свидетельствуют о том, что DP IV представляет собой основной фермент, участвующий в расщеплении и инактивации глюкагона. Эти данные нашли важное применение для определения уровня глюкагона в человеческой плазме (Pospisilik и др., *Regul. Pept.*, 12; 96(3), январь 2001, сс. 133-41).

Хемотаксический белок человеческих моноцитов (MCP)-2 впервые был выделен из стимулирован-

ных клеток остеосаркомы в качестве хемокина, производимого вместе с MCP-1 и MCP-3. Von Coillie с соавторами (Van Coillie E. и др., *Biochemistry* 37, 1998, сс. 12672-12680) клонировали из библиотеки кДНК человеческих яиц кДНК MCP-2 с удлинением на 5'-конце. Она кодировала состоящий из 76 остатков белок MCP-2, но отличалась от известной полученной из костного мозга последовательности кДНК MCP-2 кодоном 46, который кодировал Lys вместо Gln. Осуществляли анализ биологической активности этого варианта MCP-2Lys46, полученного в результате полиморфизма одного нуклеотида (SNP), и MCP-2Gln46. Кодированные области субклонировали в бактериальном экспрессионном векторе рHEN1 и после трансформации им *Escherichia coli* из периплазмы выделяли два варианта белка MCP-2. С помощью расщепления по Эдману подтвердили наличие на NH₂-конце остатка Gln вместо pGlu. rMCP-2Gln46 и rMCP-2Lys46 и копии с циклическим NH₂-концом оценивали на клетках моноцитов в опытах по мобилизации кальция и оценке хемотаксиса. Никаких различий в биологической активности не обнаружено между изоформами rMCP-2Gln46 и rMCP-2Lys46. Однако для обоих вариантов MCP-2 установлено, что наличие NH₂-концевого пироглутамата имело решающее значение для хемотаксиса, но не было важно для мобилизации кальция. Укорочение NH₂-конца rMCP-2Lys46 с помощью сериновой протеазы CD26/дипептидилпептидазы IV (CD26/DPP IV) приводило к высвобождению NH₂-концевого дипептида Gln-Pro, в то время как синтетический MCP-2, несущий на NH₂-конце pGlu, остался неповрежденным. Укороченный с помощью CD26/DPP IV rMCP-2Lys46(3-76) оказался практически полностью неактивным как в опытах по оценке хемотаксиса, так и в опытах по оценке передачи сигнала.

Эти данные свидетельствуют о том, что NH₂-концевой pGlu в MCP-2 является не только необходимым для хемотаксической активности, но также защищает белок от расщепления с помощью CD26/DPP IV (van Coillie E. и др., *Biochemistry*, 37, 1998, сс. 12672-80).

При создании настоящего изобретения с помощью анализа методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС) установлено, что образование N-концевого остатка пироглутамата в глюкагоне 3-29 (Pospisilik и др., 2001) и в изоформах MCP-2 (van Coillie и др., 1998), катализируется QC.

Кроме того, с помощью ЖХ/МС доказано, что после катализируемого DP IV удаления двух дипептидов Lys-Pro и Arg-Pro из N-конца вещества P оставшееся [Gln⁵]вещество P5-11 трансформируется с помощью QC с образованием [pGlu⁵]вещества P5-11.

Ингибиторы DP IV описаны в WO 99/61431. В частности, описаны ингибиторы DP IV, содержащие аминокислотный остаток и тиазолидиновую или пирролидиновую группу, и их соли, прежде всего L-треоизолейцилтиазолидин, L-аллоизолейцилтиазолидин, L-треоизолейцилпирролидин, L-аллоизолейцилтиазолидин, L-аллоизолейцилпирролидин и их соли.

Дополнительными примерами низкомолекулярных ингибиторов дипептидилпептидазы IV являются такие агенты, как тетрагидроизохинолин-3-карбоксамидные производные, N-замещенные 2-цианпирролы и -пирролидины, N-(N'-замещенный глицил)-2-цианпирролидины, N-(замещенный глицил)тиазолидины, N-(замещенный глицил)-4-циантиазолидины, аминокислотные пирролидины и гетероциклические соединения. Ингибиторы дипептидилпептидазы IV описаны в US 6380398, US 6011155; US 6107317; US 6110949; US 6124305; US 6172081; WO 95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19834591, WO 97/40832, DE 19616486 C2, 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 и 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 и WO 03/024965, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки, прежде всего касательно этих ингибиторов, их определения, применения и получения.

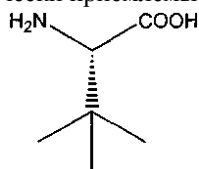
Предпочтительными для применения в сочетании с эффекторами QC являются такие ингибиторы DP IV, как NVP-DPP728A (1-[[[2-[[5-цианпиридин-2-ил]амино]этил]амино]ацетил]-2-циан(S)-пирролидин) (фирма Novartis), описанный у Hughes и др., *Biochemistry* 38, 1999, сс. 11597-11603, LAF-237 (1-[(3-гидроксиадамант-1-иламино)ацетил]пирролидин-2(S)-карбонитрил), описанный у Hughes и др., Meeting of the American Diabetes Association, 2002, реферат № 272 (фирма Novartis), TSL-225 (триптофил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота), описанная у Yamada и др., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1998, сс. 537-1540, 2-цианпирролидин и 4-цианпирролидин, описанные у Asworth и др., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 1996, сс. 1163-1166 и сс. 2745-2748, FE-999011, описанный у Sudre и др., *Diabetes* 51, 2002, сс. 1461-1469 (фирма Ferring), и соединения, описанные в WO 01/34594 (фирма Guilford), при их использовании в дозах, которые указаны в приведенных выше ссылках.

Более предпочтительными ингибиторами DP IV, которые можно применять в сочетании с эффекторами QC, являются дипептидные соединения, в которых аминокислоту предпочтительно выбирают из встречающихся в естественных условиях аминокислот, таких, например, как лейцин, валин, глутамин, глутаминовая кислота, пролин, изолейцин, аспарагины и аспарагиновая кислота. Подобные дипептидам соединения, применяемые согласно изобретению, в концентрации (в пересчете на дипептидные соединения) 10 мкМ снижают активность в плазме дипептидилпептидазы IV или ферментов-аналогов DP IV по меньшей мере на 10%, прежде всего по меньшей мере на 40%. Часто *in vivo* требуется также снижение активности по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 70%. Предпочтительные соединения могут

обладать также способностью снижать активность, максимум, на 20 или 30%.

Предпочтительными дипептидными соединениями являются N-валилпролил, O-бензоилгидроксил-амин, аланилпирролидин, изолейцилтиазолидин, например L-аллоизолейцилтиазолидин, L-треоизолейцилпирролидин и их соли, прежде всего фумараты, и L-аллоизолейцилпирролидин и его соли. Особенно предпочтительными соединениями являются глутаминилпирролидин и глутаминилтиазолидин, H-Asn-пирролидин, H-Asn-тиазолидин, H-Asp-пирролидин, H-Asp-тиазолидин, H-Asp(NHOH)-пирролидин, H-Asp(NHOH)-тиазолидин, H-Glu-пирролидин, H-Glu-тиазолидин, H-Glu(NHOH)-пирролидин, H-Glu(NHOH)-тиазолидин, H-His-пирролидин, H-His-тиазолидин, H-Pro-пирролидин, H-Pro-тиазолидин, H-Ile-азидидин, H-Ile-пирролидин, H-L-алло-Ile-тиазолидин, H-Val-пирролидин и H-Val-тиазолидин и их фармацевтически приемлемые соли. Эти соединения описаны в WO 99/61431 и EP 1304327.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение эффекторов QC в сочетании с напоминающими субстрат пептидными соединениями, которые можно использовать для конкурентной модуляции катализа, осуществляемого дипептидилпептидазой IV. Предпочтительными пептидными соединениями являются 2-аминооктановая кислота-Pro-Ile, Abu-Pro-Ile, Aib-Pro-Ile, Aze-Pro-Ile, Cha-Pro-Ile, Ile-Hyp-Ile, Ile-Pro-алло-Ile, Ile-Pro-трет-бутил-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, трет-бутил-Gly-Pro-D-Val, трет-бутил-Gly-Pro-Gly, трет-бутил-Gly-Pro-Ile, трет-бутил-Gly-Pro-Ile-амид, трет-бутил-Gly-Pro-трет-бутил-Gly, трет-бутил-Gly-Pro-Val, Thr-Pro-Ile, Tic-Pro-Ile, Trp-Pro-Ile, Tyr(P)-Pro-Ile, Tyr-Pro-алло-Ile, Val-Pro-алло-Ile, Val-Pro-трет-бутил-Gly, Val-Pro-Val и их фармацевтически приемлемые соли, в которых трет-бутил-Gly обозначает



а Ser(Bzl) и Ser(P) обозначают бензилсерин и фосфорилсерин, соответственно. Tyr(P) обозначает фосфорилтирозин. Эти соединения описаны в WO 03/002593.

Другими предпочтительными ингибиторами DP IV, которые можно применять согласно настоящему изобретению в сочетании с эффекторами QC, являются пептидилкетоны, например гидробромид 2-метилкарбонил-1-N-[(L)-аланил-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, гидробромид 2-метилкарбонил-1-N-[(L)-валинил-(L)-пролил-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, гидробромид 2-[(ацетилоксиметил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, гидробромид 2-[(бензоилоксиметил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил]-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, 2-[(2,6-дихлорбензил)тиометил]карбонил]-1-N-[(L)-аланил]-(L)-валинил]-(2S)-пирролидин, гидробромид 2-[(бензоилоксиметил)карбонил]-1-N-[глицил-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, трифторацетат 2-[(1,3]-тиазолетиазол-2-ил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил]-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, трифторацетат 2-[(бензотиазолетиазол-2-ил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил]-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина, трифторацетат 2-[(бензотиазолетиазол-2-ил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил] глицил]-(2S)-пирролидина, трифторацетат 2-[(пиридин-2-ил)карбонил]-1-N-[(L)-аланил]-(L)-валинил]-(2S)-пирролидина и другие их фармацевтически приемлемые соли. Эти соединения описаны в WO 03/033524.

Кроме того, согласно настоящему изобретению в сочетании с эффекторами QC можно применять замещенные аминокетоны. Предпочтительными замещенными аминокетонами являются

- хлорид 1-циклопентил-3-метил-1-оксо-2-пентанаминия,
 - хлорид 1-циклопентил-3-метил-1-оксо-2-бутанаминия,
 - хлорид 1-циклопентил-3,3-диметил-1-оксо-2-бутанаминия,
 - хлорид 1-циклогексил-3,3-диметил-1-оксо-2-бутанаминия,
 - хлорид 3-(циклопентилкарбонил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина,
 - хлорид N-(2-циклопентил-2-оксоэтил)циклогексанаминия
- и другие их фармацевтически приемлемые соли.

Ранее считалось, что из редкой группы специфических для пролина протеаз DP IV является единственным связанным с мембраной ферментом, специфическим для пролина в качестве предпоследнего остатка на аминоконце полипептидной цепи. Однако были выявлены другие молекулы, даже не обладающие структурной гомологией DP IV, но обладающие соответствующей ферментативной активностью. Подобные DP IV-ферменты, которые были выявлены к настоящему времени, представляют собой, например, протеин α , участвующий в активации фибробластов, дипептидилпептидазу IV β , белок, подобный дипептидиламинопептидазе, N-ацетилированная α -связанная кислотная дипептидаза, пролиндипептидаза покоящихся клеток, дипептидилпептидаза II, аттрактин и белок, родственник дипептидилпептидазе IV (DPP 8), DPL1 (DPX, DP6), DPL2 и DPP 9, которые описаны в обзорных статьях Sedo и Malik (Sedo и Malik, Biochim. Biophys. Acta., 36506, 2001, сс. 1-10) и Abbott и Gorrell (Abbott C.A. и Gorrell M.D. в: Ectopeptidases, под ред. Langner и Ansorge, изд-во Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002, сс. 171-195). В настоящее время описано клонирование и характеристики дипептидилпептидазы 10 (DPP 10) (Qi S.Y. и др., Biochemical Journal Immediate Publication, публикация 28 марта 2003г., рукопись BJ20021914).

Эффекторы в контексте настоящего описания обозначают молекулы, которые связываются с ферментом и понижают или повышают его активность *in vitro* и/или *in vivo*. Некоторые ферменты несут сайты связывания для небольших молекул, которые влияют на их каталитическую активность; молекулу-стимулятор называют активатором. Ферменты могут нести даже несколько сайтов, которые распознаются более чем одним активатором или ингибитором. Ферменты могут обнаруживать концентрации различных молекул и использовать эту информацию для изменения собственной активности.

Эффекторы могут модулировать ферментативную активность, поскольку ферменты могут принимать как активную, так и неактивную конформацию: активаторы являются позитивными эффекторами, ингибиторы являются негативными эффекторами. Эффекторы воздействуют не только на активные сайты ферментов, но также на регуляторные сайты или аллостерические сайты, последнее понятие применяют для того, чтобы подчеркнуть, что регуляторный сайт представляет собой элемент фермента, отличный от каталитического сайта, и для того, чтобы отделить эту форму регуляции от конкуренции между субстратами и ингибиторами на каталитическом сайте (Darnell J., Lodish H. и Baltimore D., *Molecular Cell Biology*, 2-ое изд., изд-во Scientific American Books, New York, 1990, с 63).

В пептидах, предлагаемых в настоящем изобретении, каждый аминокислотный остаток обозначен однобуквенным или трехбуквенным кодом, который соответствует тривиальному названию аминокислоты, общепринятые обозначения которых представлены ниже.

<u>Аминокислота</u>	<u>Однобуквенный символ</u>	<u>Трехбуквенный символ</u>
Аланин	A	Ala
Аргинин	R	Arg
Аспарагин	N	Asn
Аспарагиновая кислота	D	Asp
Цистеин	C	Cys
Глутамин	Q	Gln
Глутаминовая кислота	E	Glu
Глицин	G	Gly
Гистидин	H	His
Изолейцин	I	Ile
Лейцин	L	Leu
Лизин	K	Lys
Метионин	M	Met
Фенилаланин	F	Phe
Пролин	P	Pro
Серин	S	Ser
Треонин	T	Thr
Триптофан	W	Trp
Тирозин	Y	Tyr
Валин	V	Val

Понятие «QC» в контексте настоящего описания обозначает глутаминилциклазу (QC) и QC-подобные ферменты. QC и QC-подобные ферменты имеют идентичную или сходную ферментативную активность, обозначенную далее как QC-активность. Следует отметить, что QC-подобные ферменты могут принципиально отличаться от QC по молекулярной структуре.

Понятие «QC-активность» в контексте настоящего описания обозначает внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты (pGlu*), или N-концевого L-гомоглутамина, или L-β-гомоглутамина с образованием циклического пироогомоглутаминового производного с выделением в свободном состоянии аммиака (см. ниже схемы 1 и 2).

Схема 1

Циклизация глутамина с помощью QC

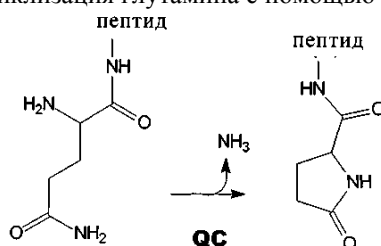
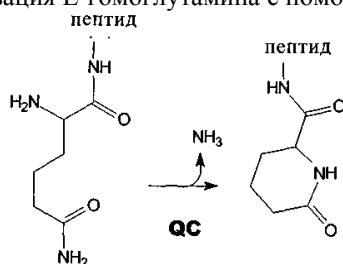


Схема 2
Циклизация L-гомоглутамина с помощью QC



Понятие «ЕС» в контексте настоящего описания обозначает побочную активность QC и QC-подобных ферментов, таких как глутаматциклаза (ЕС), которая обозначена далее как ЕС-активность.

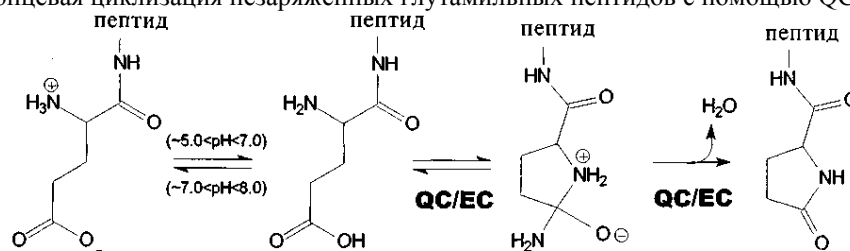
Понятие «ЕС-активность» в контексте настоящего описания обозначает внутримолекулярную циклизацию N-концевых глутаматных остатков с образованием пироглутаминовой кислоты (pGlu*) с помощью QC (см. ниже схему 3).

Понятие «металлзависимый фермент» в контексте настоящего описания обозначает фермент(ы), который (ые) связывает(ют) ион металла для того, чтобы осуществлять присущую ему(им) каталитическую функцию и/или для которого(ых) требуется связывание иона металла для формирования каталитически активной структуры.

Молекулы, которые связываются с ферментами и понижают или повышают их активность, называют «эффекторы». Эффекторы могут модифицировать ферментативную активность, поскольку ферменты могут иметь как активную, так и неактивную конформацию: активаторы являются позитивными эффекторами; ингибиторы являются негативными эффекторами. Эффекторы связываются с регуляторными сайтами или аллостерическими сайтами (от греческого «другая форма»), это понятие применяют для того, чтобы подчеркнуть, что регуляторный сайт представляет собой элемент фермента, отличный от каталитического сайта, и для того, чтобы отделить эту форму регуляции от конкуренции между субстратами и ингибиторами на каталитическом сайте.

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения предпочтительными могут являться либо активаторы, либо ингибиторы.

Схема 3
N-концевая циклизация незаряженных глутамильных пептидов с помощью QC (ЕС)



Следующим объектом настоящего изобретения является идентификация новых физиологических субстратов QC. Их идентифицировали, осуществляя эксперименты по циклизации, описанные в примере 5, с использованием пептидов млекопитающих. Предварительно человеческую QC и QC из папайи выделяли согласно процессу, описанному в примере 1. Применяемые методы описаны в примере 2, а применяемый пептидный синтез изложен в примере 6. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Новые физиологические субстраты глутаминилциклазы
(* , количественное определение проведено с помощью MALDI-TOF-экспериментов)

Субстрат	Человеческая QC			QC из папайи		
	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)
[Gln ¹]-гастрин	31 ± 1	54,1 ±0,6	1745,2 ±36,9	34 ± 2	25,8 ±0,5	759 ± 30
[Gln ¹]-нейротензин	37 ± 1	48,8 ±0,4	1318,9 ±24,8	40 ± 3	35,7 ±0,9	893 ± 44
[Gln ¹]-FPP	87 ± 2	69,6 ±0,3	800,0 ± 14,9	232 ± 9	32,5 ±0,4	140 ± 4
[Gln ¹]-TRH	90 ± 4	82,8 ±1,2	920,0 ± 27,6	н.д.	н.д.	н.д.
[Gln ¹]-GnRH	53 ± 3	69,2 ±1,1	1305,7 ±53,2	169 ± 9	82,5 ±1,9	488,2 ±14,8
[Gln ³]-глюкагон(3-29)			*			*
[Gln ⁵]-вещество P(5-11)			*			*

Все анализы осуществляли в оптимальном диапазоне активности и стабильности либо человеческой, либо растительной QC, что продемонстрировано в примере 4.

Аминокислотные последовательности физиологически активных пептидов, несущих N-концевой остаток глутамина и, следовательно, являющихся субстратами для фермента QC, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности физиологически активных пептидов с N-концевыми остатками глутамина

Пептид	Аминокислотная последовательность	Функция
гастрин 17 Swiss-Prot: P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF (амид)	Гастрин стимулирует слизистую желудка к производству и секреции соляной кислоты и поджелудочную железу к секреции ее пищеварительных ферментов. Он стимулирует также сокращение гладких мышц и усиливает кровоток и секрецию воды в желудке и тонком кишечнике.
нейротензин Swiss-Prot: P30990	QLYENKPRRP YIL	Нейротензин играет эндокринную и паракринную роль в регуляции метаболизма жиров. Он вызывает сокращение гладких мышц.
FPP	QEP амид	Трипептид, родственный тиреотропин-релизинг-фактору (TRH), обнаружен в семенной плазме. В современных исследованиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> установлено, что FPP играет важную роль в регуляции фертильности спермы.
TRH Swiss-Prot: P20396	QHP амид	TRH функционирует в качестве регулятора биосинтеза TSH в передней доле гипофиза и в качестве нейротрансмиттера/нейромодулятора в центральной и периферической нервной системе.
GnRH Swiss-Prot: P01148	QHWSYGL RP(G) амид	Стимулирует секрецию гонадотропинов; стимулирует секрецию, как лютеинизирующего, так и фолликулостимулирующего гормона.
CCL16 (малый индуцибельный цитокин A16) Swiss-Prot: O15467	QPKVPEW VNTPTCCCLK YYEKVLPRL VVG YRKALNC HLPAHFVTK RNREVCNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLSQ	Обладает хемотаксической активностью для лимфоцитов и моноцитов, но не для нейтрофилов. Проявляет также высокую миелосупрессорную активность, подавляет пролиферацию миелоидных клеток-предшественников. Рекомбинантный SCYA16 обладает хемотаксической активностью для моноцитов и THP-1-моноцитов, но не для покоящихся лимфоцитов и нейтрофилов. Индуцирует поток кальция в THP-1-клетках, которые предварительно десенсибилизированы посредством предыдущей экспрессии RANTES.

CCL8 (малый индуцибельный цитокин A8) Swiss-Prot: P80075	QPDVSI PITCCFNVIN RKIPQRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты, лимфоциты, базофилы и эозинофилы. Может играть роль в неоплазии и воспалительных реакциях хозяина. Этот белок может связывать гепарин.
CCL2 (малый индуцибельный цитокин A2) Swiss-Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWWQDSMDHL DKQTQTPKT	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты и базофилы, но не нейтрофилы или эозинофилы. Повышает противоопухолевую активность моноцитов. Участвует в патогенезе заболеваний, характеризующихся инфильтрацией моноцитов, таких как псориаз, ревматоидный артрит или атеросклероз. Может участвовать в рекрутменте моноцитов в стенке артерий в процессе развития атеросклероза. Связывается с CCR2 и CCR4.
CCL18 (малый индуцибельный цитокин A18) Swiss-Prot: P55774	QVGTNKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	Хемотаксический фактор, привлекающий лимфоциты, но не моноциты или гранулоциты. Может участвовать в В-клеточной миграции в В-клеточные фолликулы в лимфатических узлах. Привлекает нестимулированные Т-лимфоциты к дендритным клеткам и активированные макрофаги в лимфатических узлах, обладает хемотаксической активностью для нестимулированных Т-клеток, CD4+ и CD8+-Т-клеток и поэтому может играть роль, как в гуморальных, так и в клеточно-опосредуемых иммунных ответах.
Фракталкин (нейротактин) Swiss-Prot: P78423	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASCGK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRTPAAGG MDESIVLEPE ATGESSSLEP TPSSQEAQRA LGTSPPELPTG VTGSSGTRLP PTPKAQDGGP VGTELFVRPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWGQ GQSPRPENSL EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMAHVSVPV VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLITP VPDAQAATRR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCPR KMAGEMA EGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	Растворимая форма является хемотаксической для Т-клеток и моноцитов, но не для нейтрофилов. Связанная с мембраной форма усиливает адгезию таких лейкоцитов с эндотелиальными клетками. Может играть роль в регуляции процессов адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелии. Связывается с cx3cr1.

CCL7 (малый индуцибельный цитокин A7) Swiss-Prot: P80098	QPVGIN TSTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWVQDFMKHL DKKTQTPKL	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты и эозинофилы, но не нейтрофилы. Усиливает противоопухолевую активность моноцитов. Индуцирует также высвобождение желатиназы В. Этот белок может связывать гепарин. Связывается с CCR1, CCR2 и CCR3.
орексин А (гипокретин-1) Swiss-Prot O43612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGI LTL	Нейропептид, который играет важную роль в регуляции всасывания пищи и в нарушении сна, вероятно, из-за координации комплекса поведенческих и физиологических реакций этих комплементарных, связанных с гомеостазом функций. Он играет также существенную роль в связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, нарушении функции вегетативной нервной системы, нарушении гормонального баланса и нарушении регуляции общей воды организма. Орексин-А связывается как с OX1R, так и с OX2R с высокой (7) аффинностью.
вещество Р	RPK PQQFFGLM	Принадлежит к тахикаинам. Тахикины представляют собой активные пептиды, которые возбуждают нейроны, вызывают поведенческие реакции, являются эффективными вазодилататорами и усиливающими секрецию факторами и сокращают (прямо или косвенно) целый ряд гладких мышц.

Согласно четвертому варианту осуществления изобретения были идентифицированы в качестве новых физиологических субстратов QC пептиды [Gln¹]гастрин (длиной 17 и 34 аминокислоты), [Gln¹]нейротензин и [Gln¹]FPP. Гастрин, нейротензин и FPP несут остаток pGlu в N-концевом положении. Установлено, что у всех пептидов этот N-концевой остаток pGlu образован из N-концевого глутамина с помощью QC-катализа. В результате эти пептиды активизируются с точки зрения их биологической функции при превращении N-концевого остатка глутамина в pGlu.

Клетки, обладающие способностью к трансдукции через эпителий, прежде всего несущие гастрин (G) клетки, осуществляют координацию секреции желудочной кислоты и поступающей в желудок пищи. В современных исследованиях установлено, что из предшественника гастрин образуются продукты с множеством видов активности и что существует целый ряд важных моментов в биосинтезе гастрин. Участвующие в биосинтезе предшественники и промежуточные продукты (прогастрин и Gly-гастрины), возможно, представляют собой факторы роста; их продукты, амидированные гастрины, регулируют пролиферацию эпителиальных клеток, дифференцировку продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток (ECL-клеток) и экспрессию генов, связанных с синтезом и хранением гистамина в ECL-клетках, а также острую стимуляцию секреции кислоты. Гастрин стимулирует также производство представителей семейства эпидермального фактора роста (EGF), которые, в свою очередь, ингибируют функцию париетальных клеток, но стимулируют рост поверхностных эпителиальных клеток. Концентрации гастрин в плазме у пациентов, зараженных *Helicobacter pylori*, у которых, как известно, существует повышенный риск возникновения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка, повышены (Dockray G.J., J. Physiol. 15, 1999, сс 315-324).

Известно, что пептидный гормон гастрин, который выделяется из антральных G-клеток, стимули-

рует синтез и высвобождение гистамина из ECL-клеток в кислородпродуцирующую слизистую через CCK-2-рецепторы. Мобилизованный гистамин индуцирует секрецию кислоты в результате связывания с H(2)-рецепторами, локализованными на париетальных клетках. В современных исследованиях сделано предположение о том, что гастрин, как в виде полностью амидированной, так и в виде менее процессированных форм (прогастрин и удлинённый глицином гастрин), также является фактором роста в желудочно-кишечном тракте. Было установлено, что основное трофическое действие амидированного гастрина связано с кислородпродуцирующей слизистой желудка, где он вызывает повышенную пролиферацию стволовых клеток желудка и ECL-клеток, что приводит к увеличению массы париетальных и ECL-клеток. С другой стороны, основной мишенью трофического действия менее процессированного гастрина (например, удлинённого глицином гастрина), вероятно, является слизистая ободочной кишки (Koh T.J. и Chen, D., Regul. Pept. 93, 2000, сс. 37-44).

Согласно пятому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение повышающих активность эффекторов QC для стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, прежде всего пролиферации слизистых клеток желудка, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток (ECL) и экспрессии генов, связанных с синтезом и хранением гистамина в ECL-клетках, а также для стимуляции острой секреции кислоты у млекопитающих путем поддержания или повышения концентрации активного [pGlu¹]гастрина.

Согласно шестому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение понижающих активность эффекторов QC для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка, связанного или не связанного с *Helicobacter pylori*, у млекопитающих путем снижения скорости превращения неактивного [Gln¹]гастрина в активный [pGlu¹]гастрин.

Нейротензин (НТ) представляет собой нейропептид, участвующий в патофизиологии шизофрении, который специфически модулирует системы нейротрансмиттеров (нейромедиаторов), регуляция которых, как продемонстрировано ранее, нарушается при этом заболевании. Клинические исследования, при которых определяли концентрации НТ в спинно-мозговой жидкости (СМЖ), позволили выявить группу страдающих шизофренией пациентов с пониженными концентрациями НТ в ЦСЖ, которые восстанавливались при эффективном лечении с помощью антипсихотических лекарственных средств. Известны также данные, которые являются важным подтверждением роли НТ-систем в механизме действия антипсихотических лекарственных средств. Поведенческие и биохимические реакции при введении НТ в центральную нервную систему очень сходны с реакциями на системное введение антипсихотических лекарственных средств, и антипсихотические лекарственные средства повышают нейротрансмиссию НТ. Совокупность этих данных привела к гипотезе о том, что НТ функционирует в качестве эндогенного антипсихотического агента. Кроме того, обычные и атипичные антипсихотические лекарственные средства по-разному изменяют нейротрансмиссию НТ в области черного тела и в мезолимбических допаминсохраняющих конечных областях, и эти эффекты обуславливают способность вызывать побочные действия и эффективность, соответственно (Binder E.B. и др., Biol. Psychiatry, 50, 2001, сс. 856-872).

Согласно седьмому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение повышающих активность эффекторов QC для приготовления антипсихотических лекарственных средств и/или для лечения шизофрении у млекопитающих. Эффекторы QC либо поддерживают, либо повышают концентрацию активного [pGlu¹]нейротензина.

Стимулирующий оплодотворение пептид (FPP), трипептид, родственник тиреотропин-рилизинг-фактору (TRH), обнаружен в семенной плазме. Современные исследования *in vitro* и *in vivo* позволили установить, что FPP играет важную роль в регуляции фертильности спермы. В частности, FPP, прежде всего, стимулирует «включение» не способных к оплодотворению (неактивных) сперматозоидов и существенно быстрее делает их фертильными, а затем поддерживают эту способность посредством того, что сперматозоиды не подвергаются спонтанной потере акросомы и вследствие этого не теряют способность к оплодотворению. Аденозин, который, как известно, регулирует путь трансдукции сигнала аденилилциклазы (АС)/цАМФ, приводит к аналогичным реакциям и фактически усиливает их. Установлено, что и FPP, и аденозин стимулируют производство цАМФ в неактивных клетках, но ингибируют его в активных клетках, причем FPP-рецепторы каким-то образом взаимодействуют с аденозиновыми рецепторами и G-протеинами для осуществления регуляции АС. Эти события влияют на состояние фосфорилирования тирозина различных белков, некоторые из которых важны для начального «включения», другие, вероятно, участвуют в самой реакции акросомы. Кальцитонин и ангиотензин II, также обнаруженные в семенной плазме, оказывают аналогичные действия *in vitro* на неактивные сперматозоиды и могут усиливать реакции на FPP. Эти молекулы оказывают аналогичные действия *in vivo*, оказывая влияние на фертильность путем стимуляции и затем поддержания способности к оплодотворению. Любое уменьшение доступности FPP, аденозина, кальцитонина и ангиотензина II или дефекты в их рецепторах участвуют в развитии мужского бесплодия (Fraser L.R. и Adeoya-Osiguwa S.A., Vitam. Horm. 63, 2001, сс. 1-28).

Согласно восьмому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение понижающих активность эффекторов QC для приготовления препятствующих оплодотворению лекарственных средств и/или для снижения фертильности у млекопитающих. Понижающие активность эффек-

торы QC снижают концентрацию активного [pGlu¹]FPP, что приводит к предупреждению способности к оплодотворению спермы и к дезактивации сперматозоидов. В противоположность этому, установлено, что повышающие активность эффекторы QC могут стимулировать фертильность особей мужского пола и их можно применять для лечения бесплодия.

Согласно девятому варианту осуществления настоящего изобретения были идентифицированы дополнительные физиологические субстраты QC. Они представляют собой [Gln¹]CCL2, [Gln¹]CCL7, [Gln¹]CCL8, [Gln¹]CCL16, [Gln¹]CCL18 и [Gln¹]фракталкин (более подробные характеристики приведены в табл. 2). Эти полипептиды играют важную роль в таких физиологических состояниях, как подавление пролиферации миелоидных клеток-предшественников, неоплазии, воспалительных реакций хозяина, рака, псориаза, ревматоидного артрита, атеросклероза, гуморальных и клеточно-опосредуемых иммунных ответов, процессов адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий.

В настоящее время в клинических опытах изучено несколько цитотоксических вакцин на основе пептидов Т-лимфоцитов против гепатита В, вируса иммунодефицита человека и меланомы. Одной из перспективных вакцин против миеломы, которую применяют индивидуально или в сочетании с другими опухолевыми антигенами, является декапептид ELA. Этот пептид является аналогом иммунодоминантного пептида антигена Melan-A/MART-1 с N-концевой глутаминовой кислотой. Известно, что аминокислотная группа и гамма-карбоксильная группа глутаминовых кислот, а также аминокислотная группа и гамма-карбоксамидная группа глутаминов легко конденсируются с образованием пироглутаминовых производных. Для решения указанных проблем, связанных со стабильностью, было разработано несколько пептидов, представляющих интерес с фармацевтической точки зрения, которые содержали пироглутаминовую кислоту вместо N-концевого глутамина или глутаминовой кислоты без потери фармакологических свойств. Однако по сравнению с ELA у производного пироглутаминовой кислоты (PyrELA), а также N-концевого кэпированного ацетилом производного (AcELA) не удалось сохранить цитотоксическую активность, присущую Т-лимфоцитами (CTL). Несмотря на то, что в PyrELA и AcELA были внесены кажущиеся очень небольшими модификации, эти два производных, вероятно, обладают более низкой аффинностью по сравнению с ELA к специфическому классу I главного комплекса гистосовместимости. Следовательно, для того, чтобы полностью сохранить активность ELA, следует избегать образования PyrELA (Beck A. и др., *J. Pept. Res.* 57(6), 2001, сс. 528-38.). В последние годы установлено, что при меланоме происходит также сверхэкспрессия глутаминилциклазы (QC) (Ross D.T. и др., *Nat. Genet.* 24, 2000, сс. 227-235).

Согласно десятому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение эффекторов QC для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения патофизиологических состояний, например для подавления пролиферации миелоидных клеток-предшественников, неоплазии, воспалительных реакций хозяина, рака, злокачественного метастаза, меланомы, псориаза, ревматоидного артрита, атеросклероза, нарушенных гуморальных и клеточно-опосредуемых иммунных ответов, процессов адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий.

Согласно одиннадцатому варианту осуществления настоящего изобретения был идентифицирован [Gln¹]орексин в качестве физиологического субстрата QC. Орехсин А представляет собой нейропептид, который играет важную роль в регуляции всасывания пищи и нарушения сна, вероятно, в результате координации комплекса поведенческих и физиологических реакций этих комплементарных связанных с гомеостазом функций. Он играет также существенную роль в связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, функции вегетативной нервной системы, гормональном балансе и регуляции общей воды организма.

Согласно двенадцатому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение эффекторов QC для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения нарушенного всасывания пищи и сна, нарушенной связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, нарушенной функции вегетативной нервной системы, нарушенного гормонального баланса и нарушенной регуляции общей воды организма.

Экспансия полиглутамина в некоторые белки приводит к возникновению нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Кеннеди. Их механизм пока остается неясным. Биохимические свойства полиглутаминовых повторов предполагает наличие одного из возможных объяснений: эндолитическое расщепление связи глутаминил-глутаминил с последующим образованием пироглутамата может принимать участие в патогенезе в результате повышения катаболической стабильности, гидрофобности, амилоидогенеза и нейротоксичности полиглутаминильных белков (Saido T., *Med. Hypotheses*, 54(3), март 2000, сс. 427-429).

Таким образом, согласно тринадцатому варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение эффекторов QC для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения болезни Паркинсона и болезни Гентингтона.

Согласно четырнадцатому варианту осуществления настоящего изобретения предложен общий путь снижения или ингибирования ферментативной активности QC. Предложены также репрезентативные ингибиторы.

Первоначально в качестве ингибиторов QC млекопитающих был описан только 1,10-фенантролин и восстановленный 6-метилптерин (Busby W.H.J. и др., *J. Biol. Chem.* 262, 1987, сс. 8532-8536). ЭДТК не ингибирует QC, из чего было сделано заключение, что QC не представляет собой металлзависимый фермент (Busby W.H.J. и др., *J. Biol. Chem.* 262, 1987, сс. 8532-8536, Bateman R.C.J. и др., *Biochemistry* 40, 2001, сс. 11246-11250, Booth R.E. и др., *BMC Biology* 2, 2004). Однако при создании настоящего изобретения

установлено, что человеческая QC и другие QC животного происхождения являются металлзависимыми ферментами, что доказано по характеристикам ингибирования QC 1,10-фенантролином, дипикколиновой кислотой, 8-гидроксихинолином и другими хелаторами (фиг. 18, 19) и по реактивации QC ионами переходных металлов (фиг. 20). И, наконец, зависимость от металлов вытекает при сравнении с последовательностями других зависимых от металлов ферментов, что свидетельствует о превращении хелатирующих аминокислотных остатков также и в человеческой QC (фиг. 21). Взаимодействие соединений с ионом металла, связанным с активным сайтом, представляет собой общий путь ингибирования QC-активности.

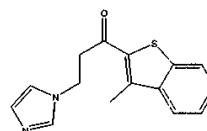
При создании настоящего изобретения установлено, что имидазольные производные являются эффективными ингибиторами QC. С помощью непрерывного анализа (подробно описанного в примере 2) проанализирован целый ряд имидазольных производных в плане их способности ингибировать человеческую QC в качестве представителя высококонсервативных QC млекопитающих.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены имидазольные производные, а также гистидин и его производные в качестве понижающих активность эффекторов QC и описаны их характеристики с точки зрения типа ингибирования и эффективности. Структуры и значения K_i представлены в табл. 3 и 4. Результаты подробно описаны в примере 7.

Таблица 3

Константы ингибирования имидазольных производных в катализируемой человеческой QC реакции (Опыты проводили при 30°C в 0,05М трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 5 мМ ЭДТК)

Соединение	Значение K_i (мМ)	Структура
Структуры ядра		
имидазол	$0,103 \pm 0,004$	
бензимидазол	$0,138 \pm 0,005$	
N-1-производные		
1-бензимидазол	$0,0071 \pm 0,0003$	
1-метилимидазол	$0,030 \pm 0,001$	
1-винилимидазол	$0,049 \pm 0,002$	
диимидазолид шавелевой кислоты	$0,078 \pm 0,002$	
N-ацетилимидазол	$0,107 \pm 0,003$	
N-(триметилсилил)имидазол	$0,167 \pm 0,007$	
N-бензоилимидазол	$0,174 \pm 0,007$	
1-(2-оксо-2-фенилэтил)имидазол	$0,184 \pm 0,005$	
1-(3-аминопропил)имидазол	$0,41 \pm 0,01$	
1-фенилимидазол	ингибирование отсутствует	
1,1'-сульфонидимидазол	ингибирование отсутствует	
C-4(5)-производные		
N-омега-ацетилгистамин	$0,017 \pm 0,001$	
L-гистидинамид	$0,56 \pm 0,04$	
H-His-Trp-OH	$0,60 \pm 0,03$	
L-гистидинол	$1,53 \pm 0,12$	
L-гистидин	$4,4 \pm 0,2$	
4-имидазолкарбоксальдегид	$7,6 \pm 0,7$	
метилловый эфир имидазол-4-карбоновой кислоты	$14,5 \pm 0,6$	
L-гистамин	$0,85 \pm 0,04$	
C-4,5-производные		
5-гидроксиметил-4-метилимидазол	$0,129 \pm 0,005$	
амид 4-аминоимидазол-5-карбоновой кислоты	$15,5 \pm 0,5$	
4,5-дифенилимидазол	ингибирование отсутствует	
4,5-дицианонимидазол	ингибирование отсутствует	
C-2-производные		
2-метилбензимидазол	$0,165 \pm 0,004$	
2-этил-4-метилимидазол	$0,58 \pm 0,04$	
2-аминобензимидазол	$1,8 \pm 0,1$	
2-хлор-1H-бензимидазол	ингибирование отсутствует	
Прочие		
3-(1H-имидазол-1-ил)-1-(3-метилбензо[b]тиофен-2-ил)пропан-1-он	$0,0025 \pm 0,0001$	



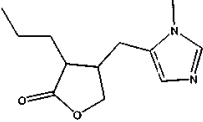
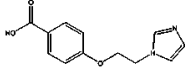
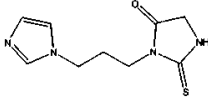
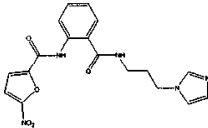
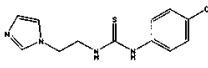
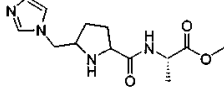
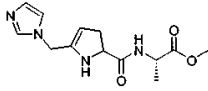
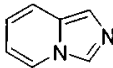
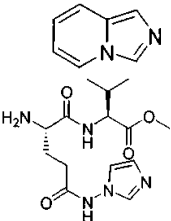
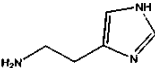
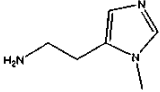
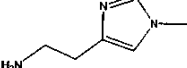
4-[(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-3-пропидигидрофуран-2-(3H)-он	0,0067 ± 0,0003	
4-[2-(1H-имидазол-1-ил)этокси]бензойная кислота	0,0034 ± 0,0001	
3-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]-2-тиоксоимидазолидин-4-он	0,00041 ± 0,00001	
5-нитро-2-[2-[(3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)амино]карбонил]фенил]фурамид	0,0066 ± 0,0004	
N-(4-хлорфенил)-N'-[2-(1H-имидазол-1-ил)этил]тиомочевина	0,00165 ± 0,00007	
метилвый эфир 2-[(5-имидазол-1-илметилпирролидин-2-карбонил)амино]пропионовой кислоты	0,0322 ± 0,0007	
метилвый эфир 2-[(5-имидазол-1-илметил-2,3-дигидро-1H-пиррол-2-карбонил)амино]пропионовой кислоты	н.д.	
имидазо<1.5а>пиридин	0,0356 ± 0,0005	
метил-(2S)-2-[[2-(2S)-2-амино-5-(1H-имидазол-1-иламино)-5-оксопентаноил]амино]-3-метилбутаноат	0,164 ± 0,004	

Таблица 4

Ингибирование QC L-гистамином и его двумя биологическими метаболитами (также называемыми телеметилгистаминами)

Соединение	Значение K _i (мМ)	Структура
L-гистамин	0,85 ± 0,04	
3-метил-4-(β-аминоэтил)имидазол	0,120 ± 0,004	
1-метил-4-(β-аминоэтил)имидазол	н.д.	

При создании изобретения в процессе изучения ферментативной активности неожиданно было установлено, что помимо N-концевого глутаминильного остатка, N-концевые β -гомоглутаминильные остатки удовлетворяют характеристикам в качестве субстратов QC из растений и млекопитающих. N-концевой β -гомоглутаминильный остаток превращался в 5-членное лактамовое кольцо посредством реакции, катализируемой человеческой QC и QC из папайи, соответственно. Результаты описаны в примере 5. Применяемый метод проиллюстрирован в примере 2, а пептидный синтез осуществляли согласно методу, описанному в примере 6.

Еще один предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способам скрининга эффекторов QC.

Предпочтительный способ скрининга для идентификации модифицирующих активность эффекторов QC из группы соединений, предусматривает стадии, которые заключаются в том, что:

- а) приводят в контакт соединения с QC в условиях, которые позволяют осуществлять их связывание;
- б) добавляют субстрат QC;
- в) оценивают превращение субстрата или необязательно определяют остаточную QC-активность; и
- г) количественно оценивают изменения в превращении субстрата и/или ферментативной активности QC для идентификации модифицирующей активность эффектора.

Другой предпочтительный способ скрининга аналогичен методу идентификации и отбора эффекторов, которые взаимодействуют непосредственно или опосредованно с ионом металла, связанным с активным сайтом QC, и он предусматривает стадии, которые заключаются в том, что:

- а) приводят в контакт соединения с QC в условиях, которые позволяют осуществлять их связывание;
- б) добавляют субстрат QC, который подвергается превращению с помощью QC;
- в) оценивают превращение субстрата или необязательно определяют остаточную QC-активность; и
- г) количественно оценивают изменения в превращении субстрата и/или ферментативной активности QC, где изменения можно использовать для идентификации модифицирующей активность эффектора.

Предпочтительными для применения в вышеуказанных методах скрининга являются QC млекопитающих или QC из папайи. Особенно предпочтительной является QC млекопитающих, так как эффекторы, идентифицированные с помощью указанных способов скрининга, можно использовать для лечения болезней млекопитающих, прежде всего человека.

Эти агенты, отобранные с помощью описанных выше способов скрининга, могут осуществлять снижение превращения по меньшей мере одного из субстратов QC (негативные эффекторы, ингибиторы) или путем увеличения превращения по меньшей мере одного субстрата QC (позитивные эффекторы, активаторы).

Соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть превращены в кислотно-аддитивные соли, прежде всего фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли.

Соли соединений, предлагаемых в изобретении, могут находиться в форме неорганических или органических солей.

Соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, можно превращать и применять в форме кислотно-аддитивных солей, прежде всего в форме фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей. Фармацевтически приемлемая соль, как правило, находится в форме, в которой основная боковая цепь протонирована неорганической или органической кислотой. Репрезентативными органическими или неорганическими кислотами являются соляная, бромистоводородная, перхлорная, серная, азотная, фосфорная, уксусная, пропионовая, гликолевая, молочная, янтарная, малеиновая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, бензойная, миндальная, метансульфоновая, гидроксизтансульфоновая, бензолсульфоновая, щавелевая, паноновая, 2-нафталинсульфоновая, паратолуолсульфоновая, циклогексансульфамовая, салициловая, сахариновая или трифторуксусная кислота. Подразумевается, что все формы соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, в виде кислотно-аддитивных солей подпадают под объем настоящего изобретения.

Учитывая близкое сходство соединений в свободной форме и соединений в форме соли, следует иметь в виду, что когда в настоящем описании упоминается соединение, то при этом подразумевается соответствующая его соль, при условии, что существует возможность ее получения и применения в определенных условиях.

Если соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют по меньшей мере один хиральный центр, то они могут существовать в виде энантиомеров. Если соединения имеют два или более хиральных центра, то они могут, кроме того, существовать в виде диастереоизомеров. Следует иметь в виду, что все такие изомеры и их смеси подпадают под объем настоящего изобретения. Кроме того, некоторые кристаллические формы соединений могут существовать в полиморфной форме, и такие соединения подпадают под объем настоящего изобретения. Кроме того, некоторые соединения могут образовывать сольваты с водой (т.е. гидраты) или с обычными органическими растворителями, и подразумевается, что такие сольваты также подпадают под объем настоящего изобретения.

Соединения, включая их соли, можно получать также в форме гидратов или в форме, содержащей другие растворители, применяемые для их кристаллизации.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу предупреждения или лечения состояния, опосредуемого модуляцией активности фермента QC у индивидуума, нуждающегося в этом, который заключается в том, что вводят любое из соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, или содержащих их фармацевтических композиций в количестве и согласно схеме приема лекарственного средства, терапевтически эффективных для лечения состояния. Кроме того, под объем настоящего изобретения подпадает применение соединений, предлагаемых настоящим изобретением, и их соответствующих фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения или лечения состояния у индивидуума, опосредуемого модуляцией активности фермента QC. Соединение можно вводить пациенту с помощью любого стандартного пути введения, включая (но не ограничиваясь ими) внутривенное, оральное, подкожное, внутримышечное, внутрикожное, парентеральное введение и их комбинации.

Другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения являются фармацевтические композиции, представляющие собой лекарственные средства, которые содержат по меньшей мере одно соединение, предлагаемое в изобретении, или его соль необязательно в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или растворителями.

Фармацевтические композиции могут находиться, например, в форме препаратов для парентерального или энтерального введения и содержать соответствующие носители или могут находиться в форме препаратов для орального введения, которые могут содержать соответствующие носители, пригодные для орального введения. Предпочтительно они находятся в форме препаратов для орального введения.

Эффекторы QC-активности, вводимые согласно изобретению, можно применять в составе фармацевтических препаратов или комплексов препаратов в качестве ингибиторов или в сочетании с ингибиторами, субстратами, псевдосубстратами, ингибиторами экспрессии QC, связывающимися белками или антителами к таким белковым ферментам, которые снижают концентрацию белка QC в организме млекопитающих. Соединения, предлагаемые в изобретении, позволяют осуществлять регулирование лечения применительно к конкретным пациентам и заболеваниям, в частности при их использовании можно избегать индивидуальной непереносимости, аллергии и побочных действий.

Соединения обладают также различной зависимостью активности от времени. Таким образом, у врача, осуществляющего лечение, имеется возможность различного подхода к индивидуальному состоянию пациента: он может точно регулировать, с одной стороны, быстроту начала действия и, с другой стороны, продолжительность действия и, прежде всего, интенсивность действия.

Предпочтительный способ, предлагаемый в изобретении, представляет собой новый подход к лечению или предупреждению состояния, опосредуемого модуляцией активности фермента QC у млекопитающих. Его преимущество заключается в том, что он является простым, пригодным для коммерческого применения и удобным для применения, прежде всего, при лечении заболеваний, которые обусловлены нарушением баланса концентрации физиологически активных субстратов QC, например перечисленных в табл. 1 и 2, прежде всего, для лечения млекопитающих, прежде всего, для лечения человека.

Соединения предпочтительно можно вводить, например, в форме фармацевтических композиций, которые содержат действующее вещество в сочетании с общепринятыми добавками, такими как разбавители, эксципиенты и/или носители, известные в данной области техники. Их можно вводить, например, парентерально (например, i.v. в физиологическом растворе) или энтерально (например, орально в виде композиции со стандартными носителями).

В зависимости от их эндогенной стабильности и биологической доступности можно вводить одну или несколько доз соединений в день для достижения требуемой нормализации уровней глюкозы в крови. Такие дозы для человека могут составлять, например, от примерно 0,01 до 250,0 мг в день, предпочтительно от примерно 0,01 до 100 мг соединения на кг веса тела.

Путем введения млекопитающим эффекторов QC-активности можно предупреждать, или облегчать, или лечить такие состояния, как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, язвенная болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрения, бесплодие, неоплазия, воспалительные реакции хозяина, рак, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нарушенная связанная с гомеостазом регуляция энергетического метаболизма, нарушенная функция вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенная регуляция общей воды организма.

Кроме того, путем введения млекопитающему эффекторов QC-активности можно стимулировать пролиферацию клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферацию слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острую секрецию кислоты и дифференцировку продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток.

Кроме того, введение млекопитающему эффекторов QC-активности может приводить к потере функции сперматозоидов, подавляя тем самым мужскую фертильность. Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ регуляции и контроля мужской фертильности и применение понижающих QC-активность эффекторов для приготовления контрацептивных лекарственных средств для особей

мужского пола.

Кроме того, путем введения млекопитающему эффекторов QS-активности можно подавлять пролиферацию миелоидных клеток-предшественников.

Соединения, применяемые согласно изобретению, можно включать хорошо известным методом в состав стандартных композиций, таких, например, как таблетки, капсулы, драже, пилюли, суппозитории, гранулы, аэрозоли, сиропы, жидкие, твердые и кремообразные эмульсии и суспензии и растворы, с использованием инертных нетоксичных фармацевтически приемлемых носителей и добавок или растворителей. В каждой из таких композиций обладающие терапевтической эффективностью соединения предпочтительно присутствуют в концентрации примерно от 0,1 до 80 мас.%, более предпочтительно от 1 до 50 мас.% в пересчете на общую массу смеси, т.е. в количествах, достаточных для обеспечения требуемого диапазона доз.

Субстанции можно применять в качестве лекарственных средств в форме драже, капсул, жевательных капсул, таблеток, капель, сиропов или также в виде суппозитория или в виде назальных спреев.

Композиции можно предпочтительно приготавливать, например, путем разбавления действующего вещества растворителями и/или носителями необязательно с применением эмульгаторов и/или диспергаторов, например, в том случае, когда в качестве разбавителя используют воду, необязательно можно применять в качестве вспомогательных растворителей органические растворители.

Примерами эксципиентов, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются вода, нетоксичные органические растворители, такие как парафины (например, фракции нефтепродуктов), растительные масла (например, рапсовое масло, арахисовое масло, кунжутное масло), спирты (например, этиловый спирт, глицерин), гликоли (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль); твердые носители, такие, например, как природные измельченные в порошок минералы (например, высокодисперсный диоксид кремния, силикаты), сахара (например, сахар-сырец, лактоза и декстроза); эмульгаторы, такие как неионные и анионные эмульгаторы (например, эфиры полиоксиэтилена и жирной кислоты, простые эфиры полиоксиэтилена и жирного спирта, алкилсульфонаты и арилсульфонаты), диспергаторы (например, лигнин, сульфитный щелок, метилцеллюлоза, крахмал и поливинилпирролидон) и замасливатели (например, стеарат магния, тальк, стеариновая кислота и лаурилсульфат натрия) и необязательно коррегенты.

Введение можно осуществлять стандартным методом, предпочтительно энтерально или парентерально, прежде всего, орально. При энтеральном введении таблетки могут содержать в дополнение к указанным носителям дополнительные добавки, такие как цитрат натрия, карбонат кальция и фосфат кальция, наряду с различными добавками, такими как крахмал, предпочтительно картофельный крахмал, желатин и т.п. Кроме того, дополнительно в процессе таблетирования можно применять замасливатели, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. В случае водных суспензий и/или эликсиров, предназначенных для орального введения, можно добавлять к действующим веществам помимо вышеуказанных эксципиентов различные коррегенты или красители.

В случае парентерального введения можно применять растворы действующих веществ с использованием пригодных жидких носителей. Было установлено, что, как правило, в случае внутривенного введения предпочтительно вводить количества, составляющие примерно от 0,01 до 2,0 мг/кг, предпочтительно примерно от 0,01 до 1,0 мг/кг веса тела в день, и в случае энтерального введения доза составляет примерно от 0,01 до 2 мг/кг, предпочтительно примерно от 0,01 до 1 мг/кг веса тела в день.

Тем не менее, в некоторых случаях необходимо отступать от указанных количеств в зависимости от веса тела экспериментального животного или пациента или от пути введения, а также в зависимости от вида животного и его индивидуальной реакции на лекарственное средство или от интервала, с которым осуществляют введение. Следовательно, в определенных случаях может оказаться достаточным применять дозы, меньшие, чем указанные выше минимальные количества, в то время как в других случаях указанный верхний предел может быть превышен. В случаях, когда требуется вводить относительно большие количества, может оказаться целесообразным разделять эти количества на несколько однократных доз, вводимых в один день. Для применения для лечения человека можно использовать тот же самый диапазон доз. Вышеуказанные комментарии применимы также и в этом случае.

Примеры фармацевтических композиций

1. Капсулы, содержащие по 100 мг соединения, предлагаемого в изобретении, на капсулу.

Для получения примерно 10000 капсул приготавливают раствор, имеющий следующий состав.

Соединение, предлагаемое в изобретении	1,0 кг
Глицерин	0,5 кг
Полиэтиленгликоль	3,0 кг
Вода	<u>0,5 кг</u>
	5,0 кг

Раствор вносят в мягкие желатиновые капсулы хорошо известным методом. Капсулы можно применять путем разжевывания или проглатывания.

2. Таблетки или таблетки с покрытием или драже, содержащие по 100 мг соединения, предлагаемого в изобретении.

Для приготовления 100000 таблеток используют следующее количество ингредиентов.

Соединение, предлагаемое в изобретении, тонкоизмельченное	10,00 кг
Глюкоза	4,35 кг
Лактоза	4,35 кг
Крахмал	4,50 кг
Целлюлоза, тонкоизмельченная	4,50 кг

Указанные выше компоненты смешивают и затем добавляют раствор, содержащий

Поливинилпирролидон	2,0 кг
Полисорбат	0,1 кг
Вода	Примерно 5,0 кг

и гранулируют хорошо известным методом путем пропускания влажной массы через решетчатую мельницу, после чего добавляют 0,2 кг стеарата магния и сушат. Конечную смесь для таблеток массой 30,0 кг подвергают обработке с получением выпуклых таблеток массой 300 мг. В идеальном случае, на таблетки можно наносить покрытие или сахарное покрытие хорошо известным методом. Целесообразно, чтобы фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, содержали комбинацию по меньшей мере одного эффектора QS-активности и по меньшей мере одного ингибитора DP IV. Такие фармацевтические композиции можно применять для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

Пример 1. Получение человеческой QS и QS из папайи.

Штаммы-хозяева и среды.

Штамм *Pichia pastoris* X33 (AOX1, AOX2), который применяли для экспрессии человеческой QS, выращивали, трансформировали и анализировали согласно инструкциям производителя (фирма Invitrogen). Среда, необходимые для *P. pastoris*, т.е. забуференную глицерином (BMGY) сложную среду или метанольную (BMMY) сложную среду и базальную (минимальную) соляную среду для ферментации, готовили согласно рекомендациям производителя.

Молекулярное клонирование плазмидных векторов, кодирующих человеческую QS.

Все процедуры клонирования осуществляли с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Для экспрессии в дрожжах использовали вектор pPICZαB (фирма Invitrogen). Вектор pQE-31 (фирма Qiagen) применяли для экспрессии человеческой QS в *E. coli*. кДНК зрелой QS, начинающуюся с кодона 38, сливали в рамке считывания с плазмидой, кодирующей метку 6xHis. После амплификации с использованием праймеров pQСус-1 и pQСус-2 (табл. 1) и субклонирования фрагмент встраивали в экспрессионный вектор, используя сайты рестрикции SphI и HindIII.

Трансформация *P. pastoris* и экспрессия в небольших объемах (маломасштабная экспрессия).

Плазмидную ДНК амплифицировали в штамме *E. coli* JM109 и очищали согласно рекомендациям производителя (фирма Qiagen). В применяемой для экспрессии плазмиде pPICZαB существуют 3 сайта рестрикции, пригодных для линейаризации. Поскольку SacI и BstXI осуществляют расщепление внутри кДНК QS, для линейаризации был выбран сайт PmeI. 20-30 мкг плазмидной ДНК линейаризовали с помощью PmeI, осаждали этанолом и растворяли в стерильной деионизированной воде. Затем 10 мкг ДНК использовали для трансформации компетентных клеток *P. pastoris* путем электропорации согласно инструкциям производителя (фирма BioRad). Отбор осуществляли на планшетах, содержащих 150 мкг/мл зеоцина. Одна трансформация с использованием линейаризованной плазмиды позволяла получать несколько сотен трансформантов.

Для тестирования рекомбинантных клонов дрожжей в отношении экспрессии QS рекомбинанты выращивали в течение 24 ч в 10-мл конических пробирках, содержащих 2 мл среды BMGY. Затем дрожжи центрифугировали и ресуспендировали в 2 мл среды BMMY, содержащей 0,5% метанола. Эту концентрацию поддерживали, добавляя метанол каждые 24 ч в течение вплоть до 72 ч. Затем определяли QS-активность в супернатанте. Присутствие слитого белка подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга, используя антитело к 6xHis-метке (фирма Qiagen). Клоны, проявляющие наиболее высокую QS-активность, отбирали для дополнительных экспериментов и ферментации.

Крупномасштабная экспрессия в ферментере.

Экспрессию QS осуществляли в 5-л реакторе (модель Biostat B, фирма B. Braun biotech.), практически в соответствии с руководством «*Pichia fermentation process guidelines*» (фирма Invitrogen). В целом, метод состоял в следующем: клетки выращивали в базальной солевой среде для ферментации, дополненной следовыми количествами солей и глицерином в качестве единственного источника углерода (pH 5,5). В процессе фазы начальной загрузки продолжительностью примерно 24 ч и последующей фазы с периодической подпиткой продолжительностью примерно 5 ч проходило накопление клеточной массы. После достижения массы клеток во влажном состоянии 200 г/л осуществляли индукцию экспрессии QS, применяя трехстадийную метанольную подпитку, так, чтобы полное время ферментации составляло примерно 60 ч. Затем клетки удаляли из содержащего QS супернатанта путем центрифугирования при 6000xg, 4°C в течение 15 мин. Значение pH доводили до 6,8, добавляя NaOH и образовавшийся мутный раствор центрифугировали при 37000xg, 4°C в течение 40 мин. Если раствор оставался мутным, приме-

няли дополнительную стадию фильтрации через целлюлозную мембрану (размер пор 0,45 мкм).

Очистка меченной с помощью 6 остатков гистидина (6xHis) QC, экспрессированной в *P. pastoris*.

Меченную с помощью His QC сначала очищали с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованном металле (ИМАХ). Для осуществления общепринятой очистки 1000 мл супернатанта культуры вносили на содержащую Ni^{2+} хелатирующую сефарозную FF колонку (1,6x20 см, фирма Pharmacia), которую уравнивали 50 мМ фосфатным буфером, pH 6,8, содержащим 750 мМ NaCl, со скоростью потока 5 мл/мин. После промывки колонки уравнивающим буфером, взятым в объеме, равном 10 объемам колонки, и уравнивающим буфером, содержащим 5 мМ гистидин, взятым в объеме, равном 5 объемам колонки, связанный белок элюировали путем замены на 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,8, содержащий 150 мМ NaCl и 100 мМ гистидин. Полученный элюат подвергали диализу в противотоке 20 мМ бистрис/HCl-буфера, pH 6,8, при 4°C в течение ночи. Затем QC дополнительно очищали с помощью анионообменной хроматографии на колонке типа Mono Q6 (фирма BioRad), уравниваемой буфером для диализа. Содержащую QC фракцию вносили на колонку при скорости потока 4 мл/мин. Затем колонку промывали уравнивающим буфером, содержащим 100 мМ NaCl. Элюцию осуществляли с использованием двух градиентов с использованием уравнивающего буфера, содержащего 240 и 360 мМ NaCl, взятого в объеме, равном 30 или 5 объемам колонки, соответственно. Собирали фракции объемом 6 мл и чистоту анализировали с помощью ДСН-ПААГ. Фракции, содержащие гомогенную QC, объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации. Для длительного хранения (-20°C) добавляли глицерин до конечной концентрации 50%. Проводили количественную оценку белка методами Бредфорда или Гилла и Гиппеля (Bradford M.M., Anal. Biochem. 72, 1976, сс. 248-254; Gill S.C. и von Hippel P.H., Anal. Biochem. 182, 1989, сс. 319-326).

Экспрессия и очистка QC в *E. coli*.

Конструкцией, кодирующей QC, трансформировали клетки линии M15 (фирма Qiagen) и выращивали на планшетах в селективной агаровой LB-среде при 37°C. Для экспрессии белка при комнатной температуре использовали LB-среду, содержащую 1% глюкозы и 1% этанола. Когда значение оптической плотности (OD_{600}) культуры достигало примерно 0,8, экспрессию индуцировали в течение ночи с помощью 0,1 мМ ИПТГ (изопропилтиогалактозид). После одного цикла замораживания и оттаивания клетки лизировали при 4°C, добавляли 2,5 мг/мл лизоцима в 50 мМ фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 300 мМ NaCl и 2 мМ гистидин, в течение примерно 30 мин. Раствор осветляли путем центрифугирования при 37000xg, 4°C в течение 30 мин с последующей фильтрацией с использованием стеклянной fritты (отделение ДНК) и двух дополнительных стадий фильтрации с использованием целлюлозных фильтров для неочищенных и тонких осадков. Супернатант (примерно 500 мл) вносили на Ni^{2+} -колонку для аффинной хроматографии (1,6x20 см) со скоростью потока 1 мл/мин. Элюцию QC осуществляли с помощью 50 мМ фосфатного буфера, содержащего 150 мМ NaCl и 100 мМ гистидин. Содержащую QC фракцию концентрировали ультрафильтрацией.

Очистка QC из латекса папайи.

QC из латекса папайи получали, используя систему BioCAD 700E (фирма Perseptive Biosystems, Висбаден, Германия) с использованием модифицированной версии ранее описанного метода (Zerhouni S. и др., Biochim. Biophys. Acta. 138, 1989, сс. 275-290). 50 г латекса растворяли в воде и центрифугировали согласно описанному методу. Для инактивации протеаз применяли S-метилметантиосульфат и полученный неочищенный экстракт подвергали диализу. После диализа весь супернатант вносили на колонку (21x2,5 см внутренний диаметр (i.d.)) из SP-сефарозы, которую можно применять при высокой скорости потока (Fast Flow, FF), уравниваемую 100 мМ натрийацетатным буфером, pH 5,0 (скорость потока 3 мл/мин). Элюцию осуществляли в три стадии, повышая концентрацию натрийацетатного буфера, при скорости потока 2 мл/мин. На первой стадии использовали линейный градиент от 0,1 до 0,5М ацетатного буфера, взятого в объеме, равном 0,5 объема колонки. На второй стадии использовали линейное повышение концентрации от 0,5 до 0,68М в 4 объемах колонки. Во время последней стадии элюции использовали 0,85М буфер в 1 объеме колонки. Объединяли фракции (6 мл) с наиболее высокой ферментативной активностью. При ультрафильтрации осуществляли замену концентрации и буфера на 0,02М трис/HCl, pH 8,0 (фирма Amicon; мембрана с пределом пропускания молекулярной массы 10 кДа).

Добавляли сульфат аммония к концентрированному ферменту из папайи, полученному после стадии ионообменной хроматографии, до получения конечной концентрации 2М. Этот раствор вносили на Fast Flow-колонку (21x2,5 см i.d.), заполненную бутилсефарозой 4 (скорость потока 1,3 мл/мин), уравниваемую 2М сульфатом аммония, 0,02М трис/HCl, pH 8,0. Элюцию осуществляли в три стадии понижающимися концентрациями сульфата аммония. На первой стадии использовали линейный градиент от 2 до 0,6М сульфата аммония, 0,02М трис/HCl, pH 8,0 в объеме, равном 0,5 объема колонки, при скорости потока 1,3 мл/мин. На второй стадии использовали линейный градиент от 0,6 до 0М сульфата аммония, 0,02М трис/HCl, pH 8,0 в объеме, равном 5 объемам колонки, при скорости потока 1,5 мл/мин. Последнюю стадию элюции осуществляли, используя 0,02М трис/HCl, pH 8,0, в объеме, равном 2 объемам колонки, при скорости потока 1,5 мл/мин. Все содержащиеся QC-активность фракции объединяли и концентрировали ультрафильтрацией. Полученную гомогенную QC хранили при -70°C. Конечные концентрации белка определяли методом Бредфорда, осуществляли сравнение со стандартными кривыми, получен-

ными для бычьего сывороточного альбумина.

Пример 2. Анализы глутаминилциклазной активности.

Флуорометрические анализы.

Все измерения осуществляли с использованием ридера для биологических анализов (BioAssay Reader) типа HTS-7000Plus для микропланшетов (фирма Perkin Elmer) при 30°C. Активность QC оценивали флуорометрически с использованием в качестве субстрата H-Gln-βNA. Образцы содержали 0,2 мМ флуорогенный субстрат, 0,25 ед. пироглутамиламинопептидазы (фирма Unizyme, Хорсгольм, Дания) в 0,2М трис/HCl, pH 8,0, содержащем 20 мМ ЭДТК, и аликвоту соответствующим образом разбавленной QC в конечном объеме 250 мкл. Длины волны возбуждения/испускания составляли 320/410 нм. Предназначенные для анализа реакции инициировали, добавляя глутаминилциклазу. Активность QC определяли из стандартной кривой для β-нафтиламина в условиях анализа. За единицу принимали количество образцовавшего в результате катализа QC 1 мкМ в мин pGlu-βNA из H-Gln-βNA в указанных условиях.

Во втором флуорометрическом анализе активность QC определяли, используя в качестве субстрата H-Gln-AMC. Реакции осуществляли при 30°C с помощью ридера типа NOVOSTar для микропланшетов (фирма BMG labtechnologies). Образцы содержали различные концентрации флуорогенного субстрата, 0,1 ед. пироглутамиламинопептидазы (фирма Qiagen) в 0,05М трис/HCl, pH 8,0, содержащем 5 мМ ЭДТК, и аликвоту соответствующим образом разбавленной QC в конечном объеме 250 мкл. Длины волны возбуждения/испускания составляли 380/460 нм. Предназначенные для анализа реакции инициировали, добавляя глутаминилциклазу. Активность QC определяли из стандартной кривой для 7-амино-4-метилкумарина в условиях анализа. Результаты кинетических анализов обрабатывали с помощью программы GraFit.

Спектрофотометический анализ QC.

Этот новый анализ применяли для оценки кинетических параметров большинства субстратов QC. Активность QC анализировали спектрофотометрически с помощью непрерывного анализа, разработанного посредством адаптации ранее описанного дискретного анализа (Bateman R.C.J., J. Neurosci. Methods 30, 1989, сс. 23-28), основанного на использовании глутаматдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента. Образцы содержали соответствующий субстрат QC, 0,3 мМ НАД·Н, 14 мМ α-кетоглутаровую кислоту и 30 ед./мл глутаматдегидрогеназы в конечном объеме 250 мкл. Реакции инициировали, добавляя QC, и оценивали по снижению абсорбции при 340 нм в течение 8-15 мин. Типичные зависимости образования продукта от времени представлены на фиг. 1.

Начальные скорости оценивали и ферментативную активность определяли из стандартных кривых для аммиака в условиях анализа. Все образцы оценивали при 30°C с использованием ридера для микропланшетов либо типа SPECTRAFluor Plus, либо типа Sunrise (оба фирмы TECAN). Данные кинетических анализов обрабатывали с помощью программы GraFit.

Анализ ингибирования.

При анализе ингибирования состав образца соответствовал описанному выше, за исключением того, что в него добавляли предполагаемый ингибитор. Для быстрой оценки ингибирования QC использовали образцы, содержащие 4 мМ соответствующий ингибитор и субстрат в концентрации, соответствующей 1 K_M. Для более детального исследования ингибирования и определения значений K_i оценивали влияние ингибитора на вспомогательные ферменты. В каждом случае не было выявлено никакого влияния на какие-либо другие применяемые ферменты, что позволяет достоверно оценивать ингибирование QC. Константу ингибирования определяли путем аппроксимации набора характеризующих процесс кривых с помощью общего уравнения для конкурентного ингибирования с использованием программы GraFit.

Пример 3. Масс-спектрометрия типа MALDI-TOF.

Масс-спектрометрию на основе определения пролета с использованием опосредуемой матрицей лазерной десорбции/ионизация осуществляли с помощью системы Hewlett-Packard G2025 LD-TOF с линейным анализатором времени пролета. Прибор был снабжен лазером на азоте, работающим при 337 нм, потенциальным источником ускорения (5 кВ) и трубой для измерения пролета длиной 1,0 м. Детектор был установлен для работы в режиме с положительно заряженными ионами, и сигналы регистрировали и осуществляли их фильтрацию с помощью цифрового запоминающего осциллоскопа типа LeCroy 9350M, соединенного с персональным компьютером. Образцы (5 мкл) смешивали с равными объемами раствора матрицы. В качестве матрицы применяли раствор ДГАФ/ВКАЦ, полученный путем растворения 30 мг 2,6'-дигидроксиацетофенона (фирма Aldrich) и 44 мг вторичного кислого цитрата аммония (фирма Fluka) в 1 мл смеси ацетонитрил/0,1% ТФК в воде (1:1, об./об.). Небольшой объем (≈1 мкл) матричной аналитической смеси вносили в верхний конец зонда и сразу же испаряли в вакуумной камере (оборудование для анализа образцов типа Hewlett-Packard G2024A) для гарантии быстрой и гомогенной кристаллизации образца.

Для продолжительной оценки Glu¹-циклизации выведенные из Aβ пептиды инкубировали в 100 мкл 0,1М натрий-ацетатного буфера, pH 5,2 или 0,1М бис-трис-буфера, pH 6,5 при 30°C. Пептиды вносили в концентрации 0,5 мМ [Aβ3-11a] или 0,15 мМ [Aβ3-21a] и 0,2 ед. QC вносили в течение всех 24 ч. В случае Aβ3-21a образцы для анализа содержали 1% ДМСО. В различные моменты времени образцы удаляли из аналитической пробирки, пептиды экстрагировали с помощью ZipTips (фирма Millipore) согласно ре-

комендациям производителя, смешивали с раствором матрицы (1:1 об./об.) и после этого определяли масс-спектры. Отрицательный контроль либо не содержал QC совсем, либо содержал дезактивированный тепловой обработкой фермент. Для исследования ингибиторов состав образца соответствовал описанному выше, за исключением того, что в него вносили ингибитор (5 мМ бензимидазол или 2 мМ 1,10-фенантролин).

Пример 4. Зависимость от pH.

Зависимость от pH катализа человеческой QC и QC из папайи изучали в условиях скорости реакции первого порядка, что отражает воздействие концентрации протонов на константу специфичности k_{cat}/K_M . Для этой цели применяли парный ферментативный анализ, основанный на использовании пироглутамиламинопептидазы в качестве вспомогательного фермента и Gln-βNA в качестве субстрата. Известно, что пироглутамиламинопептидаза является активной и стабильной при pH 5,5-8,5 (Tsuru D. и др., J. Biochem. (Токио), 84, 1978, сс. 467-476). Следовательно, анализ позволяет оценивать катализ с помощью QC в этом диапазоне значений pH. Полученные профили скоростей аппроксимировали с помощью классических колоколообразных кривых, как проиллюстрировано на фиг. 2. Человеческая QC характеризуется зависимостью от pH в очень узком диапазоне с оптимумом примерно при pH 7,8-8,0. Скорости имеют тенденцию к снижению при более щелочных значениях pH. В противоположность этому, профиль скоростей, полученных для QC из папайи, свидетельствует об отсутствии снижения активности вплоть до pH 8,5 (фиг. 2, вставка). Однако оптимальным для проявления специфичности обоих ферментов является pH 8. При создании изобретения неожиданно было установлено, что анализ кривых свидетельствует об идентичных значениях pK_a в кислотном диапазоне значений pH $7,17 \pm 0,02$ и $7,15 \pm 0,02$ для человеческой QC и QC из папайи, соответственно.

Очевидно, что снижение активности человеческой QC при основных значениях pH, по-видимому, является результатом диссоциации группы, что характеризуется значением pK_a примерно 8,5. Для QC из папайи не были получены данные при основных значениях pH, которые могли бы позволить достоверно определить второе значение pK_a . Это подтверждается подгонкой данных к модели однократной диссоциации, дающей практически идентичное значение pK_a (pK_a $7,13 \pm 0,03$), по сравнению с подгонкой данных к модели двойной диссоциации. Это свидетельствует о том, что оба значения pK_a являются весьма различными.

Стабильность при различных значениях pH.

Стабильность глутаминилциклаз оценивали, осуществляя инкубацию ферментов растительного и животного происхождения при 30°C в течение 30 мин при различных значениях pH в диапазоне от 4 до 10. После этого активность QC определяли в стандартных условиях. Результаты представлены на фиг. 3.

QC из латекса папайи оказалась стабильной в изученном диапазоне значений pH без заметной тенденции к снижению стабильности в кислом или основном диапазоне. В противоположность этому, для человеческой QC сопоставимая стабильность обнаружена только при pH 7-8,5, что свидетельствует о выраженном снижении стабильности при значениях pH выше 8 и ниже 6. Таким образом, значения pH, близкие к 8, вероятно, являются оптимальными для активности и стабильности растительной и человеческой QC и приемлемыми значениями pH для сравнения субстратной специфичности различных QC.

Пример 5. Определение субстратной специфичности QC.

Спектрофотометрический анализ.

Осуществляли непрерывный спектрофотометрический анализ, описанный в примере 2. Согласно этому анализу об активности QC свидетельствует снижение абсорбции при 340 нм, вызванное высвобождением аммиака и последующим поглощением НАДН/ H^+ из-за образования глутамата из α-кетоглутаровой кислоты. Как видно из фиг. 1, были получены линейные графики и была выявлена линейная зависимость между измеренной активностью и концентрацией QC. Кроме того, кинетические параметры, полученные для H-Gln-Gln-OH с использованием непрерывного описанного выше анализа (табл. 1), хорошо согласовались с данными, полученными с использованием дискретного анализа ($K_M = 175 \pm 18$ мкМ, $k_{cat} = 21,3 \pm 0,6$ с⁻¹). Помимо этого, кинетические параметры для превращения субстратов H-Gln-Ala-OH, H-Gln-Glu-OH, H-Gln-Gln-OH, H-Gln-OtBu и H-Gln-NH₂ с помощью QC из папайи, представленные в табл. 1, хорошо коррелируют с данными, которые были получены с помощью прямого метода при pH 8,8 и 37°C (Gololobov M.Y. и др., Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 377, 1996, сс. 395-398). Таким образом, очевидно, что новый непрерывный анализ позволяет получать надежные результаты.

Ди-, трипептиды и дипептидные заместители.

При использовании описанного выше нового непрерывного анализа примерно 30 соединений были изучены в качестве потенциальных субстратов QC из С. парауа и человеческой QC. Результаты представлены в табл. 5. Путем сравнения специфичности установлено, что практически все короткие пептидные субстраты более эффективно превращаются под действием QC из папайи по сравнению с человеческим ферментом. Заслуживает внимания тот факт, что для обоих ферментов более эффективными являются субстраты с крупными гидрофобными остатками во втором положении, что обнаружено по специфичности в отношении H-Gln-Tyr-Ala-OH, H-Gln-Phe-Ala-NH₂ и H-Gln-Trp-Ala-NH₂ при сравнении с другими трипептидами или по реактивности хромотропных субстратов H-Gln-AMC, H-Gln-βNA и H-Gln-

Тур-ОН по сравнению с дипептидными субстратами. Для QC из папайи эти данные согласуются с ранее полученными результатами, свидетельствующими о том, что специфичность коррелирует с размером второго аминокислотного остатка (Gololobov M.Y. и др., Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 377, 1996, сс. 395-398). Единственное выраженное различие в специфичности QC растительного и животного происхождения обнаружено в случае H-Gln-OtBu. В то время, как этот сложный эфир превращается при использовании QC из папайи со специфичностью, характерной для дипептидных субстратов, его превращение при использовании человеческой QC происходит на порядок медленнее.

Олигопептиды.

Помимо нескольких дипептидов и трипептидов была изучена способность QC из папайи и человеческой QC превращать целый ряд олигопептидов (табл. 5). Заслуживает внимания тот факт, что общее различие в специфичности между человеческой и растительной QC для ряда тетрапептидов оказалось не столь заметным, как для дипептидных и трипептидных субстратов. Это свидетельствует о том, что аминокислоты в 3-м и 4-м положениях все еще оказывают влияние на кинетические характеристики, прежде всего, человеческой QC. Однако исключением являются пептиды, несущие остаток пролина в положении второй аминокислоты, для которых обнаружено заметное снижение значений k_{cat}/K_M в ряду тетрапептидов, имеющих строение H-Gln-X_{aa}-Tyr-Phe-NH₂ (табл. 5). Снижение специфичности более выражено для человеческой QC, и это приводит примерно к 8-кратным различиям в значении k_{cat}/K_M по сравнению с QC из папайи.

Небольшое снижение специфичности человеческой QC обнаружено также в случае превращения субстратов с положительно заряженным С-концевым аминокислотным остатком глутамина, что обнаружено по специфичности в отношении H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂, H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ и H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂ по сравнению с другими тетрапептидами. Очевидно, что пониженная специфичность, прежде всего, является следствием меньшего индекса превращения. Этот эффект не выявлен для растительного фермента.

Таблица 5

Кинетические параметры пептидных субстратов для человеческой QC и QC из папайи (н.р. - отсутствие реактивности; н.и. - отсутствие ингибирования; н.д. - не делали; * - для ингибирования субстрата)

Субстрат	Человеческая QC				QC из папайи			
	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	K_i^* (мМ)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	K_i^* (мМ)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)
H-Gln-OH	н.р.	н.р.	н.д.	н.р.	н.д.	н.д.	н.д.	0,23 ± 0,1
H-Gln-AMC	54 ± 2	5,3 ± 0,1	н.д.	98 ± 2	42 ± 1	39,4 ± 0,4	н.д.	938 ± 13
H-Gln-βNA	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	н.и.	5,4 ± 0,2	223 ± 9	49,4 ± 0,6	н.и.	222 ± 6
H-Gln-NH ₂	409 ± 40	12,8 ± 0,5	н.и.	31 ± 2	433 ± 13	44,8 ± 0,4	н.и.	103 ± 2
H-Gln-Gly-OH	247 ± 10	13,2 ± 0,2	н.и.	53 ± 1	641 ± 20	45,8 ± 0,4	н.и.	71 ± 2
H-Gln-Ala-OH	232 ± 5	57,2 ± 0,4	н.и.	247 ± 4	158 ± 8	69,8 ± 1,0	н.и.	442 ± 16
H-Gln-Gln-OH	148 ± 5	20,7 ± 0,2	н.и.	140 ± 2	44 ± 3	43,2 ± 0,7	н.и.	982 ± 51
H-Gln-Glu-OH	359 ± 10	24,7 ± 0,2	н.и.	58 ± 1	106 ± 5	50,3 ± 0,6	н.и.	475 ± 17
H-Gln-Val-OH	196 ± 5	17,2 ± 0,1	н.и.	88 ± 2	н.д.	н.д.	н.и.	н.д.
H-Gln-Tyr-OH	211 ± 5	94 ± 1	н.и.	446 ± 6	н.д.	н.д.	н.и.	н.д.
H-Gln-Glu-Tyr-NH ₂	79 ± 2	45,1 ± 0,4	н.и.	524 ± 8	103 ± 4	53,6 ± 0,7	н.и.	520 ± 13
H-Gln-Gly-Pro-OH	130 ± 5	25,3 ± 0,2	н.и.	195 ± 7	333 ± 15	41,7 ± 0,5	н.и.	125 ± 4
H-Gln-Tyr-Ala-OH	101 ± 4	125 ± 1	н.и.	930 ± 27	63 ± 3	104,0 ± 1,0	н.и.	1650 ± 63
H-Gln-Phe-Ala-NH ₂	69 ± 3	109 ± 1	н.и.	1811 ± 64	111 ± 5	132,1 ± 0,6	н.и.	1190 ± 48
H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	50 ± 2	47,0 ± 0,7	н.и.	940 ± 24	78 ± 5	151,8 ± 2,6	н.и.	1946 ± 91
H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	143 ± 4	33,5 ± 0,4	н.и.	234 ± 4	123 ± 10	49,2 ± 1,7	н.и.	400 ± 19
H-Gln-Asn-Gly-Ile-NH ₂	172 ± 5	56,6 ± 0,5	н.и.	329 ± 7	153 ± 9	51,4 ± 0,9	н.и.	336 ± 14
H-Gln-Ser-Tyr-Phe-NH ₂	55 ± 3	52,8 ± 0,8	н.и.	960 ± 38	135 ± 6	64,9 ± 1,0	н.и.	481 ± 14

H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH ₂	55 ± 2	29,6 ± 0,3	н.и.	538 ± 14	124 ± 6	48,9 ± 0,7	н.и.	394 ± 13
H-Gln-Pro-Tyr-Phe-NH ₂	1889 ± 152	31,7 ± 1,2	н.и.	17 ± 1	149 ± 14	18,8 ± 0,6	н.и.	126 ± 8
H-Gln-His-Tyr-Phe-NH ₂	68 ± 3	55,4 ± 0,7	н.и.	815 ± 26	92 ± 7	75,9 ± 1,4	н.и.	825 ± 48
H-Gln-Gln-Tyr-Phe-NH ₂	41 ± 2	41,4 ± 0,4	н.и.	1010 ± 40	45 ± 2	52,9 ± 0,7	н.и.	1176 ± 37
H-Gln-Glu-Tyr-Phe-NH ₂	47 ± 4	46 ± 1	н.и.	979 ± 62	100 ± 4	54,6 ± 0,6	н.и.	546 ± 16
H-Gln-Glu-Ala-Ala-NH ₂	77 ± 4	46 ± 1	н.и.	597 ± 18	102 ± 4	53,7 ± 0,6	н.и.	526 ± 15
H-Gln-Glu-Tyr-Ala-NH ₂	69 ± 2	42,1 ± 0,4	н.и.	610 ± 12	113 ± 5	44,7 ± 0,5	н.и.	396 ± 13
H-Gln-Glu-Ala-Phe-NH ₂	39 ± 3	39 ± 1	н.и.	1000 ± 51	81 ± 3	48,5 ± 0,45	н.и.	599 ± 17
H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	55 ± 2	45,8 ± 0,5	н.и.	833 ± 21	107 ± 6	58,5 ± 0,4	н.и.	547 ± 27
H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	54 ± 3	33,4 ± 0,5	н.и.	619 ± 25	118 ± 6	48,2 ± 0,8	н.и.	408 ± 14

Результаты, полученные с использованием тетрапептидов, позволяли сделать еще одно заключение. Как уже отмечалось, QC из папайи обладает высокой селективностью в отношении дипептидов. Однако для некоторых тетрапептидов при использовании человеческой QC были получены более высокие значения констант специфичности, что видно из графика, представленного на фиг. 4, для построения которого использовали некоторые данные из табл. 5, касающиеся ряда пептидов, которые содержат глутамат в положении второй аминокислоты. Кроме того, по мере того, как длина цепи возрастает от ди- к трипептидам, селективность человеческой QC повышается, в отличие от результатов, полученных с использованием QC из папайи. Кроме того, наиболее высокая специфичность человеческой QC обнаружена в отношении пептидов, несущих крупные гидрофобные остатки аминокислот в 3-м и 4-м положениях, что свидетельствует о гидрофобных взаимодействиях с ферментом. При сравнении кинетических параметров, характеризующих взаимодействие с соответствующими пептидами, изменения, вероятно, прежде всего, связаны с более низкими значениями K_M , установлено, что индексы превращения пептидов являются близкими. Таким образом, более высокая селективность человеческой QC в отношении пептидов с более длинной цепью, вероятно, является результатом более прочного связывания более гидрофобных субстратов с ферментом.

Обнаруженные различия между человеческой и растительной QC в отношении пептидов, содержащих гидрофобные аминокислоты в 3-м и 4-м положении, также становятся очевидными при сравнении констант специфичности ферментов в отношении H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ и H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ или H-Gln-Gln-OH и H-Gln-Gln-Tyr-Phe-OH.

Было установлено также, что человеческая QC обладает большей селективностью в отношении гомологичных субстратов, содержащих N-концевой Gln и увеличенное количество C-концевых остатков Ala (табл. 6). Во то время, как селективность человеческой QC повышается с увеличением длины субстрата, такая тенденция не обнаружена для QC из папайи. Поскольку человеческая QC обладает меньшей специфичностью в отношении пептидов, которые имеют в последовательности остаток Ser, можно предположить, что природа боковой цепи также является важной (табл. 6).

Таблица 6

Субстрат	Человеческая QC			QC из папайи		
	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мм ⁻¹ с ⁻¹)	K_M (мкМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мм ⁻¹ с ⁻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-NH ₂	79 ± 6	55,3 ± 1,6	700 ± 33	216 ± 6	78,5 ± 1,0	363 ± 5

Воздействие ионной силы на катализ.

Другой параметр, действие которого на субстратную специфичность изучено, представляет собой ионную силу. Для этой цели определяли кинетические параметры для циклизации нескольких субстратов

в присутствии 0,5M KCl и без соли (табл. 7). При создании изобретения неожиданно было установлено, что специфичность в отношении субстратов с незаряженным каркасом при добавлении соли не изменялась в значительной степени как в случае QC из латекса папайи, так и человеческой QC. Однако константы специфичности человеческой QC в отношении H-Gln-Ala-OH и H-Gln-Glu-OH снижались при добавлении KCl. Как видно из индивидуальных кинетических параметров, это было обусловлено увеличением значения K_M и только небольшим снижением значения k_{cat} . В случае QC из папайи не обнаружено воздействия ни на один из изученных параметров. Это явление, вероятно, не связано с самим отрицательно заряженным субстратом, так как для отрицательно заряженного пептида H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH₂ не обнаружено изменение этих параметров. Представляющее интерес действие соли дополнительно было выявлено для положительно заряженных субстратов H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ и H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂. Установлено, что положительное действие на катализ, как для растительной, так и для человеческой QC, прежде всего, обусловлено более низким значением K_M и несколько повышенным индексом превращения.

Таблица 7

Влияние ионной силы на катализ человеческой QC и QC из папайи

	Субстрат	0,05M трицин-NaOH, pH 8,0				0,05M трицин-NaOH, pH 8,0, 0,5M KCl			
		K_M (мМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	K_i (мМ)	K_M (мМ)	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat}/K_M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	K_i (мМ)
QC из папайи	H-Gln-NH ₂	0,434 ±0,015	43,4 ±0,4	100 ±3	н.и.	0,446 ±0,010	45,2 ±0,3	101 ±2	н.и.
	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	н.и.	0,143 ±0,005	68,1 ±0,6	480 ±12	н.и.
	H-Gln-Glu-OH	0,098 ±0,005	45,0 ±0,5	459 ±18	н.и.	0,094 ±0,003	44,4 ±0,3	472 ±12	н.и.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0,079 ±0,005	138 ±3	1747 ±73	н.и.	0,072 ±0,004	133 ±3	1847 ±61	н.и.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0,106 ±0,008	52,9 ±1,2	499 ±26	н.и.	0,065 ±0,005	48,4 ±1,0	745 ±42	н.и.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0,102 ±0,007	50 ±1	493 ±22	н.и.	0,053 ±0,002	58,1 ±0,7	1096 ±28	н.и.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0,109 ±0,005	52,4 ±0,7	481 ±16	н.и.	0,094 ±0,003	53,6 ±0,5	570 ±13	н.и.
Человеческая QC		0,05M трис-HCl, pH 8,0				0,05M трис-HCl, pH 8,0, 0,5M KCl			
	H-Gln-NH ₂	0,442 ±0,030	12,8 ±0,3	29 ±1	н.и.	0,401 ±0,014	12,2 ±0,1	30 ±1	н.и.
	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	н.и.	0,357 ±0,012	47,6 ±0,6	133 ±3	н.и.
	H-Gln-Glu-OH	0,373 ±0,015	21,4 ±0,3	57 ±2	н.и.	0,607 ±0,036	18,9 ±0,5	31 ±1	н.и.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0,054 ±0,003	50,8 ±0,6	941 ±41	н.и.	0,056 ±0,002	50,0 ±0,4	893 ±25	н.и.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0,166 ±0,013	31 ±1	187 ±9	н.и.	0,091 ±0,005	29,8 ±0,5	327 ±12	н.и.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0,051 ±0,003	29,4 ±0,5	577 ±24	н.и.	0,034 ±0,001	31,6 ±0,3	929 ±19	н.и.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0,060 ±0,002	46,6 ±0,5	777 ±18	н.и.	0,061 ±0,002	45,6 ±0,5	748 ±16	н.и.

Физиологические субстраты.

В проведенных ранее исследованиях уже доказано превращение [Gln¹]-TRH и [Gln¹]-GnRH с помощью QC с использованием бычьей QC и QC из гипофиза свиней (Busby W.H.J. и др., J. Biol. Chem. 262, 1987, сс. 8532-8536; Fischer W.H. и Spiess J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1987, сс. 3628-3632). Помимо этих уже изученных гормонов гипофиза были синтезированы три потенциальных физиологических субстрата человеческой QC и изучено их превращение, а именно [Gln¹]гастрин, [Gln¹]нейротензин и [Gln¹]FPP. Кинетические параметры, характеризующие их превращение, представлены в табл. 1. Представляет интерес тот факт, что превращение глутаминильных пептидов в соответствующие пироглутаминильные пептиды характеризуется увеличением значения констант специфичности в зависимости от размера, т.е. первым в этом ряду стоит наиболее крупный пептид прогастрин, состоящий из 17 аминокислот, за ним следуют пронеиротензин, про-GnRH, про-TRH и про-FPP. Эти результаты соответствуют

данным, полученным при использовании синтетических пептидов.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что превращение растительным ферментом более длинных субстратов также является высоко селективным, что частично противоречит данным, касающимся более коротких олигопептидов. Возможно, существуют вторичные взаимодействия, обуславливающие связывание субстрата и фермента, которые удалены от активного сайта.

Пептиды, содержащие модифицированные аминокислоты.

С целью дальнейшего изучения специфичности и селективности QC синтезировали пептиды, содержащие либо модифицированный N-концевой глутаминильный остаток, либо модифицированную аминокислоту во втором положении. Превращение этих пептидов оценивали количественно с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии (см. также пример 3). Циклизация глутаминильного остатка или его аналога, соответственно обуславливает различие в массе субстрата и продукта катализа. В случае, когда происходит выделение 1 моля аммиака в свободном состоянии на 1 моль субстрата, превращение также можно анализировать количественно с помощью спектрофотометрического анализа.

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂.

Превращение этого разветвленного на N-конце пептида, который содержит два глутаминильных остатка на N-конце, связанных с лизильным остатком через пептидную и частично изопептидную связь, с помощью человеческой QC (фиг. 5) и QC из папайи (данные не приведены), по-видимому, происходит одинаковым образом. Оба глутаминильных остатка превращаются в пироглутаминовую кислоту без какого-либо заметного предпочтения в отношении конкретного остатка, что следует из данных о соответствующем превращении субстрата (фиг. 5). Таким образом, селективность различных QC в отношении по-разному связанных глутаминильных остатков не имеет существенных различий.

H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂.

Метилированный глутаминильный остаток превращается в пироглутаминильный остаток только с помощью QC из папайи (фиг. 6). Кроме того, не обнаружено ингибирование человеческой QC пептидом, что свидетельствует о том, что метилированный остаток не распознается человеческой QC.

H-Glu(OMe)-βNA и H-Glu-βNA.

Ни одно из этих соединений не подвергалось каталитическому превращению с помощью QC из папайи или человеческой QC. Эти флуорогенные субстраты анализировали флуорометрически, используя пироглутамиламинопептидазу в качестве вспомогательного фермента. Однако у O-метилированного глутаматного остатка обнаружено выраженное отсутствие стабильности как в трис-, так и в трициновом буфере, что свидетельствует о наличии у них тенденции к циклизации, катализируемой не ферментативным путем. Кроме того, активность обеих QC в отношении H-Gln-AMC в качестве субстрата не ингибировалась более длинными пептидами H-Glu(OMe)-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂ или H-Glu-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂, эти данные свидетельствуют о том, что глутаминовая кислота или ее производные не распознаются обеими формами QC. Кроме того, результаты свидетельствуют о том, что не только отрицательный заряд остатка глутаминовой кислоты является причиной отталкивания пептида от активного сайта.

H-Gln-Цикло(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe).

Превращение субстрата H-Gln-цикло(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe), который содержит внутримолекулярную частичную изопептидную связь, анализировали количественно, при этом установлено, что значения K_M составляют 240±14 мкМ и 133±5 мкМ для человеческой QC и QC из папайи, соответственно. Установлено, что вследствие более высокого индекса превращения с помощью QC из папайи (49,4±0,6 с⁻¹) по сравнению с человеческой QC (22,8±0,6 с⁻¹) для растительного фермента значение k_{cat}/K_M составляет 372±9 мМ⁻¹ мин⁻¹, что примерно в 4 раза выше, чем для человеческой QC. Таким образом, константа специфичности в случае QC из папайи только немного ниже, чем для субстратов, имеющих меньший размер, таких как H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-NH₂. Однако установлено, что значение k_{cat}/K_M для человеческой QC составляет 95±3 мМ⁻¹с⁻¹, что примерно на 1 порядок ниже по сравнению со значениями, полученными для субстратов близкого размера (табл. 5).

H-βГомоGln-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂.

N-концевой β-гомоглутаминильный остаток превращали в 5-членное лактамное кольцо посредством катализа с использованием человеческой QC и QC из папайи, соответственно. Сопровождающее этот процесс выделение в свободном состоянии аммиака анализировали спектрофотометрически и с помощью описанного выше MALDI-TOF-анализа. Не обнаружено выделение в свободном состоянии аммиака, если QC отсутствовала или ее подвергали кипячению, что свидетельствует о специфичности катализа циклизации. Интересным представляется тот факт, что QC из C. рарауа (K_M=3,1±0,3 мМ, k_{cat}=4,0±0,4 с⁻¹) и человеческая QC (K_M=2,5±0,2 мМ, k_{cat}=3,5±0,1 с⁻¹) катализируют превращение этого пептида с практически идентичными значениями k_{cat}/K_M 1,4±0,1 и 1,3±0,1 мМ⁻¹с⁻¹, соответственно. Таким образом, циклизация β-гомоглутаминового остатка катализируется с примерно в 1000 раз меньшей эффективностью по сравнению с катализом пептидов такого же размера, которые содержат глутаминильный остаток на N-конце. Это свидетельствует о том, что наличие α-углерода субстрата является для распознавания субстрата формами QC важным, но не основным фактором. Основным требованием к субстрату является наличие γ-амидной группы и непротонированной N-концевой аминокислотной группы на расстоянии и под углом,

необходимыми для циклизации, это требование удовлетворяется наличием N-концевых глутаминильных и β-гомоглутаминильных остатков.

Пример 6. Синтез субстратов QC.

Олигопептиды.

Пептиды синтезировали полуавтоматически в количестве порядка 0,5 мМ с помощью пептидного синтезатора (Labortec SP650, Бахем, Швейцария) согласно описанному ранее методу (Schilling S. и др., *Biochemistry* 41, 2002, сс. 10849-10857). Более длинные пептиды синтезировали в количестве порядка 25 мкМ с помощью автоматического пептидного синтезатора типа Symphony (фирма Rainin Instrument Co.) согласно описанному методу (Manhart S. и др., *Biochemistry* 42, 2003, сс. 3081-3088). Для всех пептидных сочетаний применяли основанные на использовании Fmoc модифицированные протоколы твердофазного пептидного синтеза, предусматривающие применение тетрафторбората 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (ТБТУ, фирма Novabiochem)/основания (диизопропилэтиламина или N-метилформолина; фирма Merck) или в случае затрудненного сочетания применение N-оксида гексафторфосфата N-[(диметиламино)-1Н-1,2,3,4-триазоло[4,5-*b*]пиридин-1-илметил]-N-метилметанаммония (4,5) (ГАТУ, фирма Applied Biosystems)/диизопропилэтиламина в качестве активирующих реагентов. После отщепления от смолы с помощью содержащей трифторуксусную кислоту (ТФК, фирма Merck) смеси неочищенные пептиды очищали с помощью препаративной ЖХВР с использованием не содержащих кислоту растворителей для того, чтобы исключить дальнейшую циклизацию N-концевого глутамина. Препаративную ЖХВР осуществляли с использованием линейного градиента ацетонитрила (фирма Merck) в воде (5-40% или 65% ацетонитрила в течение 40 мин) на колонке типа 250-21 Luna RP18 (фирма Phenomenex). Для подтверждения чистоты и идентификации пептидов использовали аналитическую ЖХВР и ESI-МС.

Glu(NH-NH₂)-Ser-Pro-Thr-Ala-NH₂.

Линейный пептид-предшественник (Fmoc-Glu-Ser-Pro-Thr-Ala-NH₂) синтезировали согласно стандартным методам, основанным на применении Fmoc (Schilling S. и др., *Biochemistry* 41, 2002, сс. 10849-10857) на амидной MBHA-смоле Ринка (фирма Novabiochem). После отщепления защищенного с помощью Fmoc пептида от смолы пептид осаждали с помощью диэтилового эфира (фирма Merck), фильтровали и сушили. Смолу HMBA-AM (1,16 мМ/г, фирма Novabiochem) применяли для сочетания кислотной γ-карбоксильной группы глутаминовой кислоты пептида-предшественника (3 экв.) в дихлорметане (ДХМ, фирма Merck). В качестве агентов для сочетания применяли дициклогексилкарбодиимид (ДЦК, фирма Serva) (4 экв.) и диметиламинопиридин (ДМАП, фирма Aldrich) (0,1 экв.). Через 12 ч смолу фильтровали, промывали ДХМ и реакцию повторяли. После удаления N-концевой Fmoc-группы с помощью 20% пиперидина в ДМФ (3х5 мин) несущую пептид смолу обрабатывали 5% раствором гидразина (20 мл/г) в течение 1,5 ч. Смолу фильтровали и промывали диметилформамидом (ДМФ, фирма Roth, Германия) и ТФК. После упаривания неочищенный пептид осаждали простым эфиром, выход 76%.

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂.

Линейный пептид синтезировали с помощью стандартной процедуры, основанной на использовании Fmoc/tBu, на амидной MBHA-смоле Ринка (Schilling S. и др., *Biochemistry* 41, 2002, сс. 10849-10857), при этом для сочетания применяли предпоследнюю аминокислоту Fmoc-Lys(Fmoc)-ОН. 4 экв. Fmoc-Gln(Trt)-ОН подвергали сочетанию после удаления двух аминокислотных групп лизина с помощью 20% пиперидина (фирма Merck) в ДМФ. Выход после стандартного процесса расщепления составлял 95%.

H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂.

Fmoc-Gln(NMe)-ОН синтезировали, начиная процесс с Fmoc-Glu-OtBu на смоле Fmoc-MI-AM (фирма Novabiochem). После добавления ДХМ для набухания смолу (0,5 г) промывали ДМФ и удаляли защитные группы с помощью 20% раствора пиперидина в ДМФ. Смолу вносили в 5 мл ДМФ и последовательно добавляли 5 экв. Fmoc-Glu-OtBu, 5 экв. ГАТУ и 10 экв. ДИПЭА и встряхивали в течение 6 ч. После фильтрации и промывки продукт отщепляли в условиях стандартного расщепления с помощью ТФК. Пептид H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ синтезировали с помощью известного метода (Schilling S. и др., *Biochemistry* 41, 2002, сс. 10849-10857). Осуществляли сочетание Fmoc-Gln(NMe)-ОН с ГАТУ/ДИПЭА в течение ночи. После стандартного процесса расщепления выход неочищенного пептида составлял 78%.

H-Glu(OMe)-β-нафтиламид, H-Gln-Val-ОН, H-Gln-Tyr-ОН.

Защищенные с помощью Boc дипептиды синтезировали стандартным методом, основанным на применении смешанного ангидрида с использованием изобутилхлоркарбоната (фирма Merck). С-концевые сложные метиловые эфиры Boc-Gln-Tyr-OMe и Boc-Gln-Val-OMe омыляли с помощью 1Н. NaOH в диоксане. У защищенных с помощью Boc пептидов удаляли защитную группу, обрабатывая раствором HCl/диоксан в течение 10 мин. После упаривания остаток кристаллизовали с помощью нескольких растворителей с получением твердого соединения, выход 60-70%.

H-Gln-цикло(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe).

Линейный предшественник Boc-Gln(Trt)-Lys-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Phe-ОН синтезировали на чувствительной к действию кислот 2-хлортритильной смоле. Сочетание осуществляли с помощью стандартного протокола, основанного на применении Fmoc/tBu, с использованием Fmoc-Lys(Mtt)-ОН. После расщепления с помощью 3% раствора ТФК в ДХМ (10 раз по 5 мин) раствор нейтрализовали 10% раствором

пиридина (фирма Merck) в метаноле (MeOH; фирма Merck), трижды промывали ДХМ и MeOH, упаривали до 5% от исходного объема и неочищенный пептид осаждали с помощью охлажденной на льду воды. После этого неочищенный пептид подвергали циклизации, используя активацию смесью ДЦК/Н-гидроксibenзотриазол (ГОБТ, фирма Aldrich). Неочищенный пептид растворяли в безводном дихлорметане (0,2 ммоль/50 мл), добавляли 0,2 ммоль N-метилморфолина и 0,4 ммоль 1-гидроксibenзотриазола. Этот раствор добавляли по каплям к раствору, содержащему 0,4 ммоль дициклогексилкарбодиимида в 250 мл дихлорметана, при 0°C. Реакцию прекращали путем перемешивания в течение ночи при комнатной температуре. После фильтрации N,N'-дициклогексилмочевины растворитель удаляли выпариванием. Остаток растворяли в этилацетате и промывали несколько раз 1н. HCl, насыщенным раствором NaHCO₃ и водой. Раствор сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и упаривали досуха в вакууме.

Пример 7. Характеристики эффе́кторов QC.

Имидазольные производные.

Имидазольные и бензимидазольные производные, имеющие заместители в различных положениях 5-членного кольца, тестировали в качестве ингибиторов QC (табл. 3). Порядок нумерации относится к имидазольному кольцу. Применяемые методы описаны в примере 2.

C-4(5)- и C-4,5-производные.

Установлено, что соединения, имеющие замены в любом из структурно эквивалентных положений 4 или 5 имидазольного кольца или в обоих положениях, обладали пониженной способностью к ингибированию человеческой QC. При этом существует одно исключение, поскольку N-ω-ацетилированный гистамин является одним из наиболее эффективных ингибиторов. Небольшие заместители в этих положениях оказывали незначительное воздействие на связывание, о чем свидетельствуют близкие значения константы ингибирования для 5-гидроксиметил-4-метилимидазола при сравнении с имидазолом. Более крупные и имеющие больший объем группы, присоединенные к этим сайтам, снижают или устраняют связывание соединения ферментом. Для некоторых других изученных заместителей известно, что они проявляют отрицательное индукционное или мезомерное действие, что может снижать электронную плотность в имидазольном кольце, это тоже приводит к ухудшению связывания, соответственно, значений констант связывания. Различия в значениях K_i L-гистидина и гистидинамида также свидетельствуют о некотором воздействии заряда на связывание. Данные об электростатическом отталкивании заряженных субстратов были получены ранее при оценке субстратной специфичности, т.е. глутаминамид эффективно превращался в продукты с помощью человеческой QC, но никакой реактивности не обнаружено при использовании свободного глутамина в качестве субстрата.

C-2-производные.

Все изученные производные ингибировали QC слабее, чем имидазол. Любая замена, превышающая по размеру протон, мешала соответствующему связыванию с QC. В случае 2-метилбензимидазола только из-за введения метильной группы значение константы ингибирования снижалось примерно на один порядок. Очень близкая взаимосвязь обнаружена при сравнении значений K_i для бензимидазола и 2-аминобензимидазола. Кроме того, эти результаты свидетельствуют о том, что это воздействие не связано с электронными изменениями.

N-1-производные.

Из изученных в качестве ингибиторов человеческой QC имидазольных производных у большинства соединений, обладающих повышенными значениями K_i по сравнению с имидазолом, обнаружены изменения на одном атоме азота. К этим соединениям относится также один из наиболее эффективных ингибиторов QC 1-бензилимидазол. Важным представляется тот факт, что лишь незначительные изменения этой структуры приводят к потере ингибирующей активности, это можно обнаружить при сравнении 1-бензоилимидазола и фенилимидазола, последний из которых не проявлял активности в экспериментальных условиях. В этом случае также выявленные изменения, вероятно, связаны не только со сниженной электронной плотностью имидазольного кольца из-за отрицательного мезомерного действия фенильной группы, поскольку у более объемной триметилсилильной группы, проявляющей положительное индукционное действие, обнаружена также пониженная способность к связыванию по сравнению с другими остатками. Важным представляется тот факт, что одним из наименее эффективных соединений в этой группе является 1-аминопропилимидазол. Низкая эффективность этого соединения обусловлена наличием основной аминогруппы, поскольку у соединений с близким стерическим строением 1-метилимидазола и 1-винилимидазола выявлена повышенная способность к связыванию с активным сайтом. Таким образом, положительно заряженная аминогруппа ответственна за более низкое значение K_i, этот результат подтверждается при сравнении значений K_i N-ω-ацетилированного гистамина (табл. 3) и гистамина (табл. 4).

Роль 3,4- и 3,5-derivатизации.

Установлено, что имидазольные производные, которые имеют заместителей в положениях 4(5) или в обоих положениях, обладают ограниченной эффективностью в отношении связывания с ферментом. Роль конкретных замен выявляли путем сравнения констант ингибирования L-гистамина и двух промежуточных продуктов биологического расщепления гистамина, 3-метил-4-гистамина и 3-метил-5-гистамина

(табл. 4). Для L-гистамина установлено, что значение K_i примерно на порядок ниже, чем для ацетилированного аналога. Метилирование атома азота приводит к значительному повышению эффективности в случае 3-метил-4-гистамина. Однако метилирование, приводящее к получению 3-метил-5-гистамина, приводит к полной потере ингибирующей активности. Таким образом, выявленный эффект, вероятно, прежде всего, связан со стерическим препятствием связыванию из-за дериватизации атома углерода, примыкающего к основному азоту. Вероятно, основной азот играет основную роль в связывании с ферментом.

Пример 8. Образование $A\beta$ 3-40/42-производных.

Исследования проводили с использованием двух коротких N-концевых пептидных последовательностей $A\beta$ 3-40/42, таких как $[Gln^3]A\beta$ 1-11 (последовательность: DAQFRHDSGYE) и $[Gln^3]A\beta$ 3-11, содержащая глутамин вместо глутаминовой кислоты в 3-м положении. Расщепление с помощью DP IV и циклизацию N-концевого остатка глутамина с помощью QC этих двух пептидов оценивали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Опыты проводили с использованием очищенной DP IV (свиная почка) или неочищенного гомогената свиного гипофиза в качестве источника QC, а также для обоих ферментов в опытах по оценке последовательного катализа.

Результаты.

1. Образование $[Gln^3]A\beta$ 3-11a из $[Gln^3]A\beta$ 1-11a, катализируемое DP IV, и его предупреждение с помощью ингибитора DP IV Val-пирролидида (Val-Пург).

DP IV или подобная DP IV активность приводила к расщеплению $[Gln^3]A\beta$ 1-11a с образованием $[Gln^3]A\beta$ 3-11a (фиг. 7). Остаток в 3-м положении не затрагивался при этом расщеплении и поэтому становился более пригодным для модификации другими ферментами, т.е. QC. Как и ожидалось, катализ можно было полностью подавлять с помощью Val-Пург (фиг. 8).

2. Образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a из $[Gln^3]A\beta$ 3-11a посредством катализа QC в гомогенатах гипофиза и предупреждение его с помощью 1,10-фенантролина.

Глутаминилциклаза, присутствующая в гомогенате свиного гипофиза, катализирует превращение $[Gln^3]A\beta$ 3-11a в $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a (фиг. 9). Образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a ингибировалось при добавлении 1,10-фенантролина (фиг. 10).

3. Последовательный катализ DP IV и QC, приводящий к образованию $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a, и его предупреждение с помощью Val-Пург и 1,10-фенантролина.

Образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a из $[Gln^3]A\beta$ 1-11a происходило после последовательного катализа с помощью DP IV и QC при оценке в неочищенном гомогенате свиного гипофиза с добавлением DP IV из свиной почки (фиг. 11). Образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a не происходило, когда добавляли ингибитор QC 1,10-фенантролин (фиг. 12) или ингибитор DP IV Val-Пург (фиг. 13). При аминопептидазном расщеплении и последующей циклизации остатка глутамина происходит образование небольших количеств $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a, о чем свидетельствует образование $[Gln^3]A\beta$ 2-11a.

4. Образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a в неочищенном гомогенате гипофиза в результате катализа аминопептидазой(ами).

Из-за образования $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a, не зависящего от DP IV-катализа, изучали расщепление $[Gln^3]A\beta$ 1-11a в неочищенном гомогенате гипофиза без добавления DP IV (фиг. 14). Как и ожидалось из данных, представленных в разделе 4, было обнаружено образование $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a. Эти данные свидетельствуют о том, что расщепление $[Gln^3]A\beta$ 1-11a может являться также результатом катализа аминопептидазой(ами), что приводит к образованию $[pGlu^3]A\beta$ 3-11a. Таким образом, результаты, свидетельствующие о том, что в этой ткани образование пироглутамила является конечной точкой расщепления N-концевых пептидов, подтверждают также роль QC в формировании бляшек.

Пример 9. Превращение $[Gln^3]A\beta$ 3-11a; 3-21a и 3-40 с помощью рекомбинантной человеческой QC.

Все изученные выведенные из $[Gln^3]A\beta$ пептиды эффективно превращались с помощью человеческой QC в соответствующие пироглутамильные формы (табл. 8). Из-за плохой растворимости $[Gln^3]A\beta$ 3-21a и $[Gln^3]A\beta$ 3-40 в водном растворе их изучение проводили в присутствии 1% ДМСО. Однако более высокая растворимость $[Gln^3]A\beta$ 3-11a позволила проводить кинетический анализ катализируемого QC превращения в присутствии ДМСО и без него (табл. 8). Взятые в совокупности, результаты изучения $A\beta$ -пептидов, состоящих из 8, 18 и 37 аминокислот, в качестве субстратов QC (см. табл. 8) подтвердили данные о том, что активность человеческой QC повышается с увеличением длины ее субстратов. Таким образом, на основе данных о значении констант специфичности можно заключить, что Gln^1 -гастрин, Gln^1 -нейротензин, Gln^1 -GnRH являются одними из лучших субстратов QC. Аналогично этому установлено, что для $[Gln^3]A\beta$ 3-40 и глюкагона, которые являются наиболее крупными из изученных субстратов QC, обнаружены высокие значения констант скорости реакции второго порядка ($449 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $526 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, соответственно) даже в присутствии 1% ДМСО (табл. 8).

Важным представляется тот факт, что кинетические параметры, характеризующие превращение изученных амилоидных пептидов, не изменялись существенно с увеличением размера, что позволяет предположить не очень существенную роль C-концевой части $A\beta$ в QC-катализе. Таким образом, из-за

лучшей растворимости и простоты использования в экспериментах дополнительные изучения, касающиеся N-концевого аминопептидазного процессинга этих пептидов, проводили с применением фрагментов Аβ меньшего размера, таких как [Gln³]Аβ1-11a, [Gln³]Аβ3-11a и Аβ3-11a.

Таблица 8

Кинетические параметры, характеризующие превращение N-концевых содержащих Gln пептидов с помощью рекомбинантной человеческой QC в буферном растворе, содержащем 1% ДМСО

Пептид	K _M (мкМ)	k _{cat} (с ⁻¹)	k _{cat} /K _M (мМ ⁻¹ с ⁻¹)
[Gln ³]Аβ3-11a	87 ± 3 [#]	55 ± 1 [#]	632 ± 10 [#]
[Gln ³]Аβ3-11a	155 ± 4	41,4 ± 0,4	267 ± 4
[Gln ³]Аβ3-21a	162 ± 12	62 ± 3	383 ± 10
[Gln ³]Аβ3-40	89 ± 10	40 ± 2	449 ± 28
глюкагон(3-29)	19 ± 1	10,0 ± 0,2	526 ± 17

[#]Определение проводили в отсутствие ДМСО.

Пример 10. Превращение Аβ3-11a и Аβ3-21a с помощью рекомбинантной человеческой QC.

Инкубация Аβ3-11a и Аβ3-21a в присутствии QC позволила установить, что, в отличие от данных, приведенных в ранее опубликованных работах, содержащие глутамат пептиды также могут служить в качестве субстратов QC (фиг. 15В и Г). Катализируемое QC образование [pGlu³]Аβ3-11a и [pGlu³]Аβ3-21a изучали при pH 5,2 и 6,5, соответственно. Если в раствор добавляли ингибитор QC бензимидазол до начала добавления QC, то превращение субстрата, приводящее к образованию [pGlu³]Аβ3-11a или [pGlu³]Аβ3-21a, подавлялось (фиг. 15Д и Е). Если QC кипятили перед внесением, то образование pGlu-пептидов было незначительным (фиг. 15А и Б).

Пример 11. Зависимость от pH катализируемой QC из папайи циклизации Gln-βNA и Glu-βNA.

Превращение QC из папайи Glu-βNA при концентрации вплоть до 2 мМ (что ограничено растворимостью субстрата) удовлетворяет уравнению скорости ферментативной реакции Михаэлиса-Ментена (фиг. 16). Изучение зависимости превращения от концентрации субстрата для катализируемого QC превращения Glu-βNA, проведенное при pH 6,1-8,5, позволило установить, что для этого содержащего Glu субстрата оба кинетических параметра, т.е. K_M и k_{cat}, изменялись в зависимости от pH (фиг. 16). Этот результат противоречит данным, описанным ранее для катализируемой QC циклизации глутамин, согласно которым в данном диапазоне значений pH происходит изменения только значений K_M (Gololobov M.Y., Song I., Wang W. и Bateman R.C., Arch. Biochem. Biophys. 309, 1994, сс. 300-307).

Поэтому было проведено изучение влияния концентрации протонов при Glu-и Gln-циклизации, зависимости от pH-циклизации Glu-βNA и Gln-βNA в условиях скорости реакции первого порядка (т.е. при использовании концентраций субстрата существенно более низких, чем значения K_M) (фиг. 17). Для циклизации глутамин pH-оптимум соответствовал pH 8,0, в отличие от циклизации глутаминовой кислоты, для которой pH-оптимум находился при pH 6,0. Поскольку константы специфичности в соответствующих pH-оптимумах различались примерно в 80000 раз, соотношение активности QC и ЕС при значении pH, близком к pH 6,0, составляло примерно 8000.

Изучение неферментативного образования pGlu из Gln-βNA при pH 6,0 осуществляли в течение 4 недель, и при этом было установлено, что значение константы скорости реакции первого порядка равно 1,2x10⁻⁷с⁻¹. Однако за этот же промежуток времени не обнаружено никакого образования pGlu-βNA из Glu-βNA, что позволяет оценить, что константа скорости, ограничивающая это превращение, составляет порядка 1,0x10⁻⁹с⁻¹.

Пример 12. Процессы инактивации/реактивации фермента.

Аликвоту человеческой QC (0,1-0,5 мг, 1 мг/мл) инактивировали в течение ночи путем диализа в противотоке 3000-кратного избытка 5 мМ 1,10-фенантролина или 5 мМ дипиколоиновой кислоты в 0,05М бис-трис/НСl-буфере, pH 6,8. Затем инактивирующий агент тщательно удаляли путем диализа (3 цикла, 2000-кратный избыток) образцов в противотоке 0,05М бис-трис/НСl-буфера, pH 6,8, содержащего 1 мМ ЭДТК. Эксперименты по реактивации осуществляли при комнатной температуре в течение 15 мин, используя ионы Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Ni⁺⁺, Ca⁺⁺, K⁺⁺ и Co⁺⁺ в концентрациях 1,0, 0,5, 0,25 мМ в 0,025М бис-трис-буфере, pH 6,8, содержащем 0,5 мМ ЭДТК. Анализ активности QC проводили в 0,05М трис/НСl-буфере, pH 8,0, содержащем 2 мМ ЭДТК, для исключения быстрой реактивации следовыми количествами ионов металлов, присутствующих в буферных растворах.

Ингибирование свиной QC 1,10-фенантролином уже было описано ранее (Busby W.H.J. и др., J. Biol. Chem. 262, 1987, сс. 8532-8536, Bateman R.C.J. и др., Biochemistry 40, 2001). Однако тот факт, что ЭДТК оказывает активирующее действие на QC-катализ, позволяет предположить, что ингибирование фенантролином обусловлено образованием хелатных комплексов с металлами (Busby W.H.J. и др., J. Biol. Chem. 262, 1987, сс. 8532-8536, Bateman R.C.J. и др., Biochemistry 40, 2001). Помимо ингибирования 1,10-фенантролином катализируемая человеческой QC циклизация субстрата снижалась в присутствии дипиколоиновой кислоты и 8-гидроксихинолина, других ингибиторов металлоферментов. Эти хелаторы

конкурентно и в зависимости от времени ингибировали QC, т.е. было обнаружено конкурентное ингибирование активности уже в начале реакции и активность продолжала снижаться при пролонгированной инкубации с соединениями (фиг. 18, 19). Важным представляется тот факт, что ЭДТК не обладает заметным ингибированием, вне зависимости от продолжительности инкубации или любых иных условий.

Человеческая QC практически полностью инактивировалась после продолжительного диализа в противотоке 5 мМ 1,10-фенантролина или 5 мМ дипиколоиновой кислоты. После повторного диализа в течение ночи в противотоке не содержащих хелатор буферных растворов активность QC частично реактивировалась вплоть до 50-60%. Однако при диализе в противотоке буферов, содержащих 1 мМ ЭДТК, не происходило никакой реактивации.

Практически полного восстановления активности QC после инактивации либо дипиколоиновой кислотой, либо 1,10-фенантролином достигали путем инкубации белка в течение 10 мин с 0,5 мМ ZnSO_4 в присутствии 0,5 мМ ЭДТК (фиг. 20). Частичное восстановление активности QC было получено также с использованием для реактивации ионов Co^{++} и Mn^{++} . Даже в присутствии 0,25 мМ Zn^{++} могла проходить реактивация вплоть до 25% от исходной активности. Никакой реактивации не происходило при использовании ионов Ni^{++} , Ca^{++} или K^{++} . Аналогично этому инкубация полностью активной QC с этими ионами не оказывала никакого воздействия на ферментативную активность.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение эффекторов глутаминилциклазы (QC) для приготовления лекарственного средства, предназначенного для:

в) лечения болезней у млекопитающих, которые можно лечить путем модуляции QC-активности *in vivo*, и/или

г) модуляции физиологических процессов, основанных на действии рGlu-содержащих пептидов, обусловленной модуляцией QC-активности.

2. Применение по п.1 для изменения превращения N-концевых остатков глутаминовой кислоты или глутамина в остатки пироглутаминовой кислоты по меньшей мере в одном субстрате QC, который выбран из ряда, включающего $\text{A}\beta_{3-40/42}$, $[\text{Gln}^3]\text{A}\beta_{3-40/42}$, $[\text{Glu}^{11}]\text{A}\beta_{11-40/42}$, $[\text{Gln}^{11}]\text{A}\beta_{11-40/42}$, $[\text{Gln}^1]\text{растрины}$ (17 и 34), $[\text{Gln}^1]\text{нейротензин}$, $[\text{Gln}^1]\text{FPP}$, $[\text{Gln}^1]\text{TRH}$, $[\text{Gln}^1]\text{GnRH}$, $[\text{Gln}^1]\text{CCL 2}$, $[\text{Gln}^1]\text{CCL 7}$, $[\text{Gln}^1]\text{CCL 8}$, $[\text{Gln}^1]\text{CCL 16}$, $[\text{Gln}^1]\text{CCL 18}$, $[\text{Gln}^1]\text{ELA}$, $[\text{Gln}^1]\text{фракталкин}$, $[\text{Gln}^1]\text{орексин A}$, $[\text{Gln}^3]\text{глюкагон 3-29}$ и $[\text{Gln}^5]\text{вещество P5-11}$.

3. Применение по п.1 для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

4. Применение по п.1 для регуляции и/или контроля мужской фертильности.

5. Применение по п.1 для лечения заболевания, выбранного из ряда, включающего язвенную болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественный метастаз, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нарушенную связанную с гомеостазом регуляцию энергетического метаболизма, нарушенную функцию вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенную регуляцию общей воды организма.

6. Применение по п.1 для стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферации слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острой секреции кислоты и дифференцировки, продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток.

7. Применение по п.1 для подавления пролиферации миелоидных клеток-предшественников.

8. Применение по п.1 для лечения заболевания, выбранного из болезни Гентингтона и болезни Кеннеди.

9. Применение по одному из предыдущих пунктов, где эффектор QC вводят в сочетании с ингибитором DP IV или DP IV-подобными ферментами и/или ингибитором аминопептидазы.

10. Применение по п.9, где блокируют активность подобного DP IV фермента, приводящую к образованию N-изоAsp-Ala-OH.

11. Применение по п.9 или 10, где DP IV-подобный фермент представляет собой DP II.

12. Фармацевтическая композиция для парентерального, энтерального или орального введения, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере один эффектор QC необязательно в сочетании с общепринятыми носителями и/или эксципиентами.

13. Фармацевтическая композиция для парентерального, энтерального или орального введения, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере один эффектор QC в сочетании по меньшей мере с одним ингибитором DP IV или DP IV-подобными ферментами и/или по меньшей мере с одним ингибитором аминопептидазы необязательно в сочетании с общепринятыми носителями и/или эксципиентами.

14. Применение фармацевтических композиций по п.12 или 13 для модуляции *in vivo* ферментативной активности QC и/или DP IV и DP IV-подобных ферментов и/или аминопептидаз.

15. Применение по п.14, где блокируют активность DP IV-подобного фермента, приводящую к образованию Н-изоAsp-Ala-OH.

16. Применение по п.14 или 15, где DP IV-подобный фермент представляет собой DP II.

17. Применение по одному из пп.14-16 для изменения превращения N-концевых остатков глутаминовой кислоты или глутамина в пироглутамильные (5-оксопролильные) остатки по меньшей мере в одном субстрате QC, который выбран из ряда, включающего Aβ3-40/42, [Gln³]Aβ3-40/42, [Glu¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹]гастрины (17 и 34), [Gln¹]нейротензин, [Gln¹]FPP, [Gln¹¹]TRH, [Gln¹]GnRH, [Gln¹]CCL 2, [Gln¹]CCL 7, [Gln¹]CCL 8, [Gln¹]CCL 16, [Gln¹]CCL 18, [Gln¹]ELA, [Gln¹]фракталкин, [Gln¹]орексин А.

18. Применение по одному из пп.14-16 для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

19. Применение по одному из пп.14-16 для модуляции мужской фертильности путем введения эф-фекторов QC.

20. Применение по одному из пп.14-16 для лечения заболевания, выбранного из ряда, включающего язвенную болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественный метастаз, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гумо-ральные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейко-цитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нарушенную связанную с гомеостазом регуляцию энергетического метаболизма, нарушенную функцию вегетативной нервной системы, нару-шенный гормональный баланс и нарушенную регуляцию общей воды организма.

21. Применение по одному из пп.14-16 для стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферации слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острой секреции кислоты и дифференцировки, продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретир-ующих гистамин энтерохромаффиноцитоподобных клеток.

22. Применение по одному из пп.14-16 для подавления пролиферации миелоидных клеток-предшественников.

23. Способ скрининга для идентификации и отбора эф-фекторов QC, предусматривающий следующие стадии:

а) контактирование соединения с QC млекопитающего в условиях, которые позволяют осуществ-лять их связывание;

б) добавление субстрата QC млекопитающего;

в) оценка превращения субстрата или необязательное определение остаточной активности QC мле-копитающего и

г) количественная оценка изменения в превращении субстрата и/или ферментативной активности QC млекопитающего для идентификации модифицирующего активность QC эф-фектора.

24. Способ скрининга для идентификации и отбора эф-фекторов, которые непосредственно или опосредовано взаимодействуют с ионом металла, связанным с активным сайтом QC млекопитающего, пре-дусматривающий следующие стадии:

а) контактирование соединения с QC млекопитающего в условиях, которые позволяют осуществ-лять их связывание;

б) добавление субстрата QC млекопитающего;

в) оценка превращения субстрата или необязательное определение остаточной активности QC мле-копитающего и

г) количественная оценка изменения в превращении субстрата и/или ферментативной активности млекопитающего QC для идентификации модифицирующего активность QC эф-фектора.

25. Эф-фекторы QC млекопитающего, идентифицированные с помощью способов скрининга по п.23 или 24.

26. Способ лечения заболеваний у млекопитающих, которые можно лечить:

а) путем модуляции активности QC in vivo и/или

б) путем модуляции физиологических процессов, основанных на действии pGlu-содержащих пеп-тидов, обусловленном модуляцией QC-активности,

который заключается в том, что млекопитающим вводят терапевтически эф-фективное количество по меньшей мере одного эф-фектора глутаминилициклазы (QC) для модуляции активности QC в отноше-нии содержащих Gln или Glu пептидов.

27. Способ по п.26, в котором модуляция активности QC приводит к изменению превращения N-концевых остатков глутаминовой кислоты или глутамина в остатки пироглутаминовой кислоты по мень-шей мере в одном субстрате QC, который выбран из ряда, включающего Aβ3-40/42, [Gln³]Aβ3-40/42, [Glu¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹]гастрины (17 и 34), [Gln¹]нейротензин, [Gln¹]FPP, [Gln¹]TRH, [Gln¹]GnRH, [Gln¹]CCL 2, [Gln¹]CCL 7, [Gln¹]CCL 8, [Gln¹]CCL 16, [Gln¹]CCL 18, [Gln¹]ELA, [Gln¹]фрак-талкин, [Gln¹]орексин А, [Gln³]глюкагон 3-29 и [Gln⁵]вещество P5-11.

28. Способ по п.26 для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

29. Способ по п.26, в котором модуляция активности QC включает регуляцию и/или контроль мужской фертильности.

30. Способ по п.26, в котором заболевание выбрано из ряда, включающего язвенную болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественный метастаз, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нарушенную связанную с гомеостазом регуляцию энергетического метаболизма, нарушенную функцию вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенную регуляцию общей воды организма.

31. Способ по п.26, в котором лечение приводит к стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферации слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острой секреции кислоты и дифференцировки, продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток.

32. Способ по п.26, в котором лечение приводит к подавлению пролиферации миелоидных клеток-предшественников.

33. Способ по одному из пп.26-32, в котором эффектор QC вводят в сочетании с ингибитором DP IV или DP IV-подобными ферментами и/или ингибитором аминопептидазы.

34. Способ по п.33, в котором блокируют активность DP IV-подобного фермента, приводящую к образованию N-изоAsp-Ala-OH.

35. Способ лечения по п.34, в котором DP IV-подобный фермент представляет собой DP II.

36. Способ лечения болезней у млекопитающих, которые можно лечить:

а) путем модуляции активности QC *in vivo* и/или

б) путем модуляции физиологических процессов, основанных на действии pGlu-содержащих пептидов, обусловленном модуляцией активности QC, и/или активности DP IV и DP IV-подобных ферментов, и/или активности аминопептидазы *in vivo*,

который заключается в том, что млекопитающим вводят фармацевтические композиции по п.12 или 13.

37. Способ по п.36 изменения превращения N-концевых остатков глутаминовой кислоты или глутамина в пироглутамильные (5-оксипролильные) остатки по меньшей мере в одном субстрате QC, который выбран из ряда, включающего Aβ3-40/42, [Gln³]Aβ3-40/42, [Glu¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹]гастрины (17 и 34), [Gln¹]нейротензин, [Gln¹]FPP, [Gln¹]TRH, [Gln¹]GnRH, [Gln¹]CCL 2, [Gln¹]CCL 7, [Gln¹]CCL 8, [Gln¹]CCL 16, [Gln¹]CCL 18, [Gln¹]ELA, [Gln¹]фракталкин, [Gln¹]орексин A.

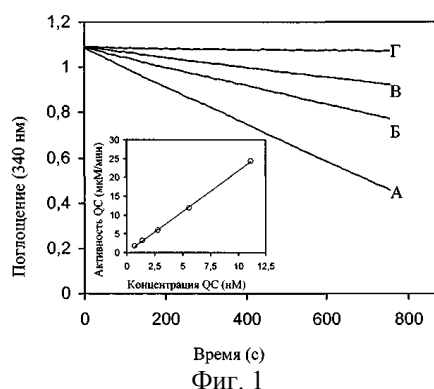
38. Способ по п.36 для лечения болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

39. Способ по п.36 для модуляции мужской фертильности.

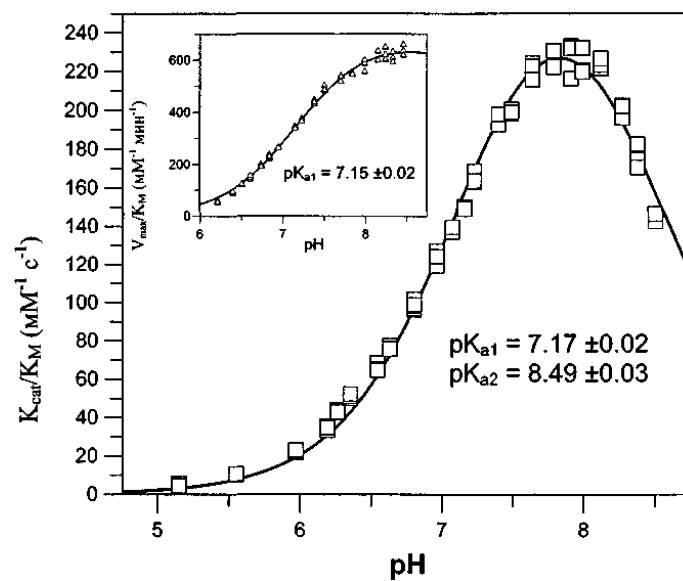
40. Способ по п.36 для лечения заболевания, выбранного из ряда, включающего язвенную болезнь и рак желудка, связанный или не связанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественный метастаз, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушение сна, нарушенную связанную с гомеостазом регуляцию энергетического метаболизма, нарушенную функцию вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенную регуляцию общей воды организма.

41. Способ по п.36 для стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, предпочтительно пролиферации слизистых клеток желудка, эпителиальных клеток, острой секреции кислоты и дифференцировки, продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноподобных клеток.

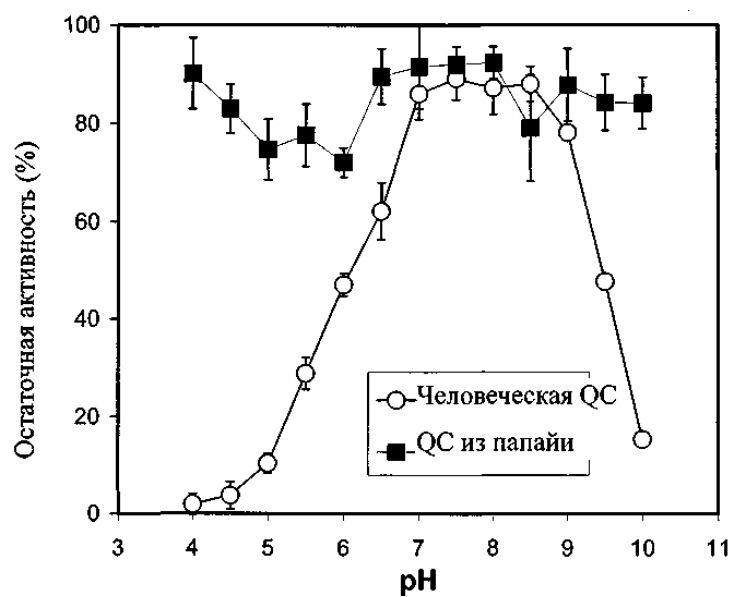
42. Способ по п.36 для подавления пролиферации миелоидных клеток-предшественников.



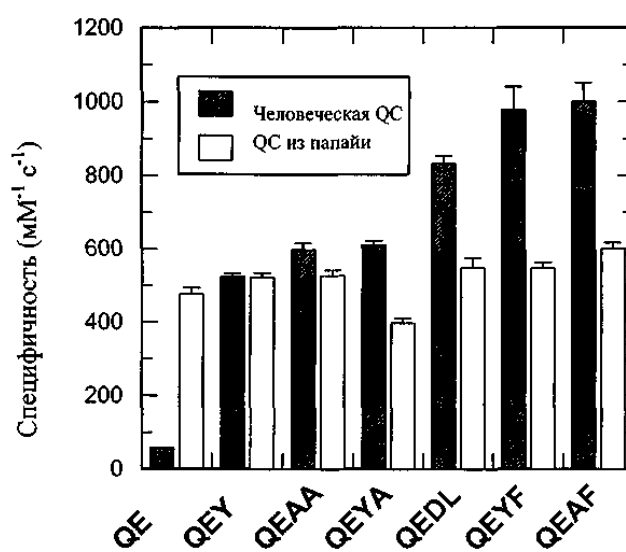
Фиг. 1



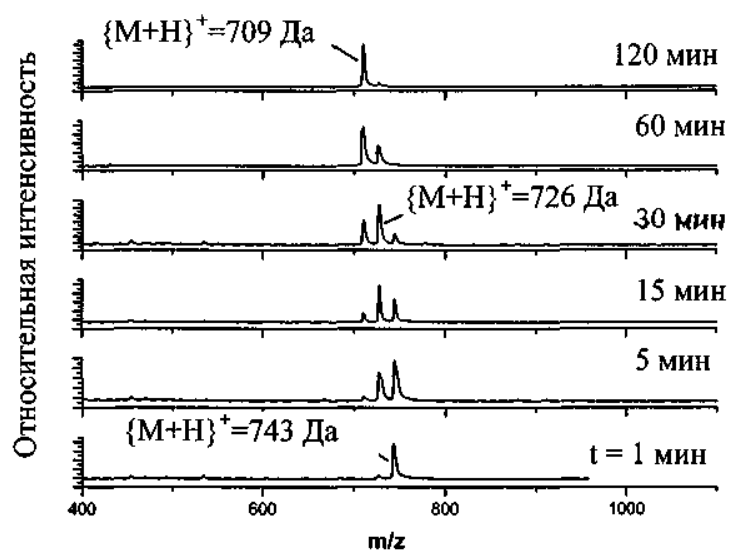
Фиг. 2



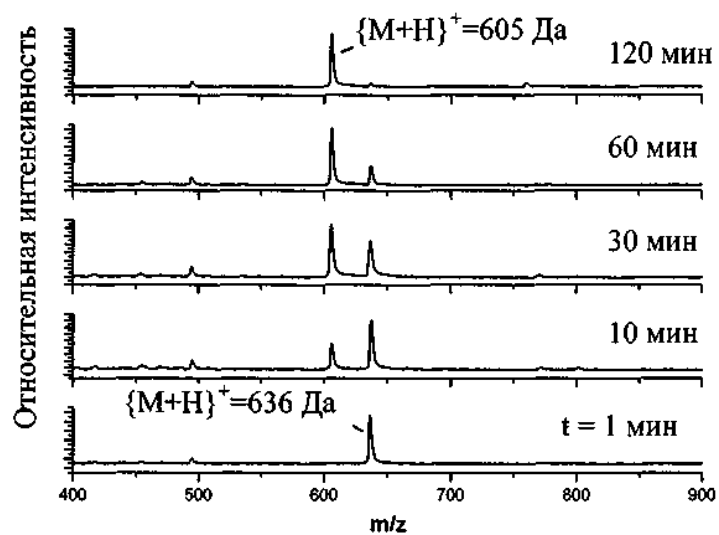
Фиг. 3



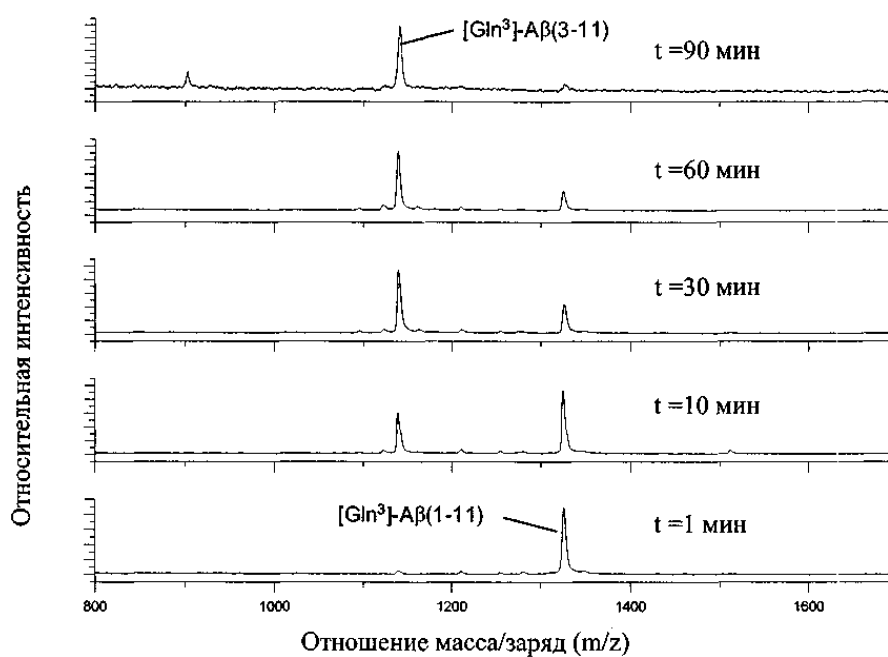
Фиг. 4



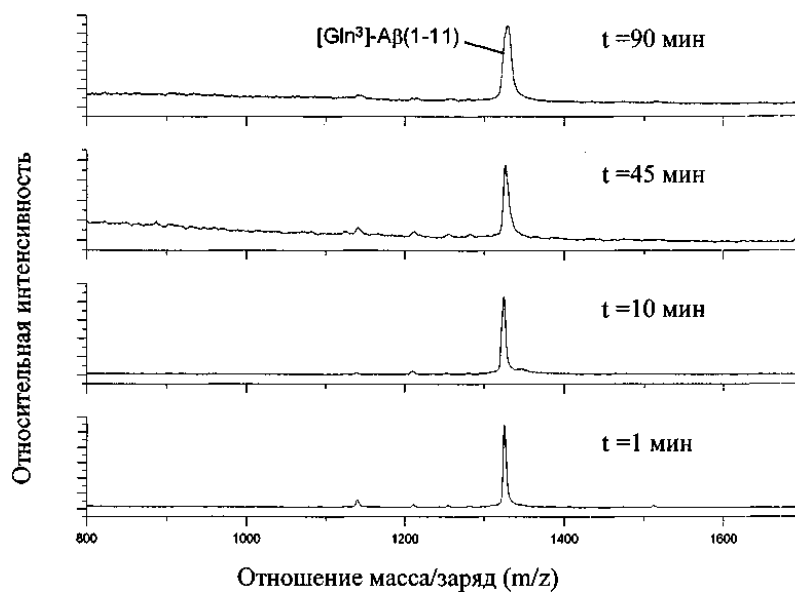
Фиг. 5



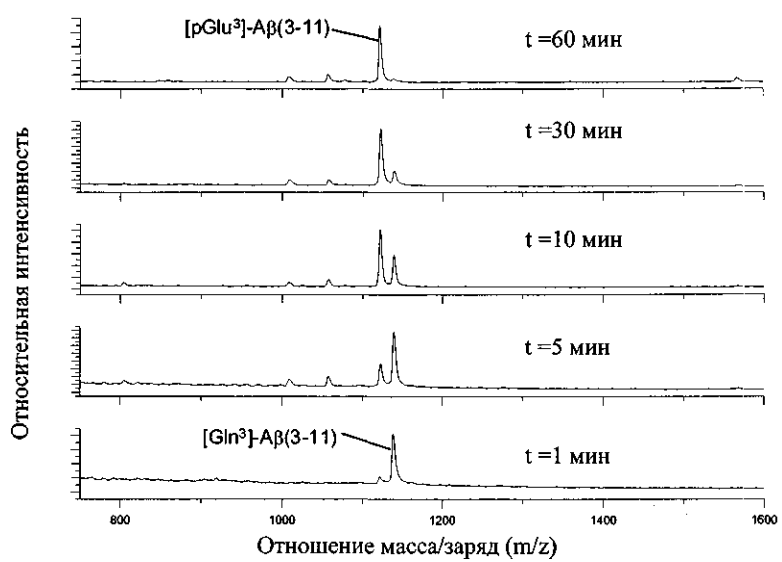
Фиг. 6



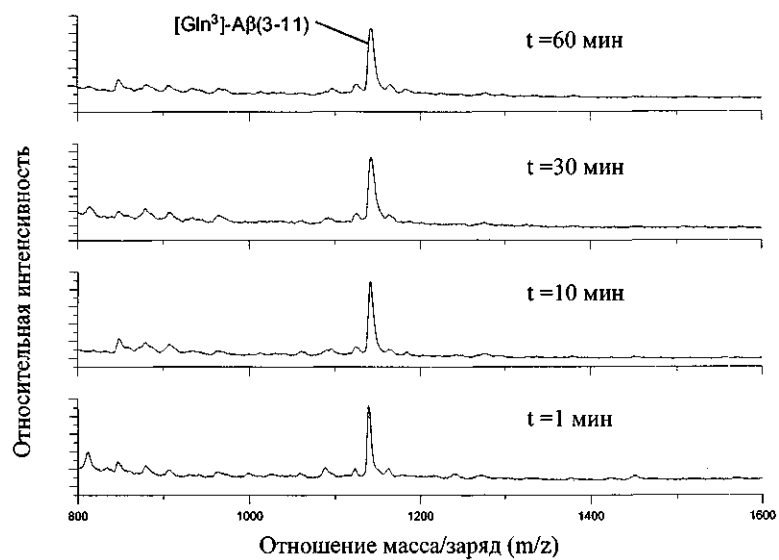
Фиг. 7



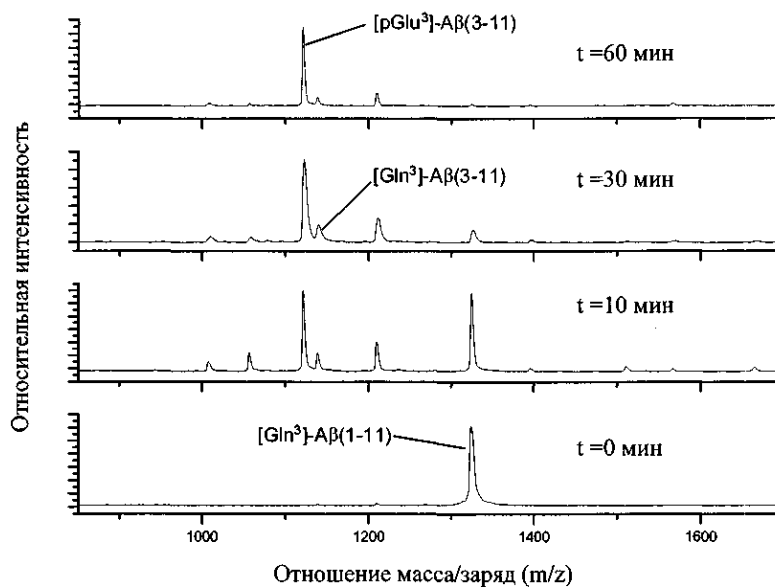
Фиг. 8



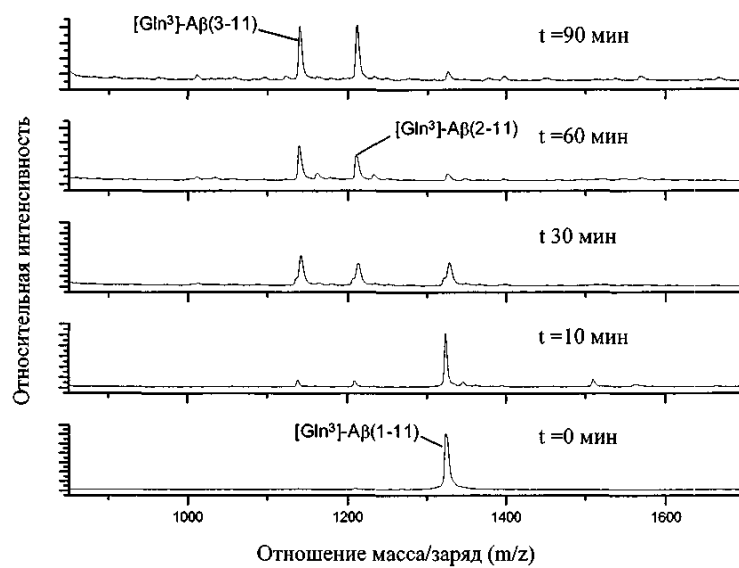
Фиг. 9



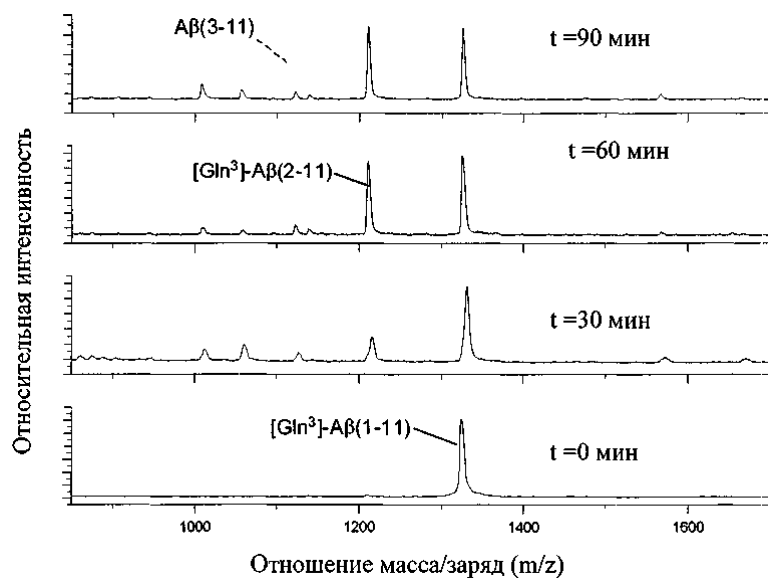
Фиг. 10



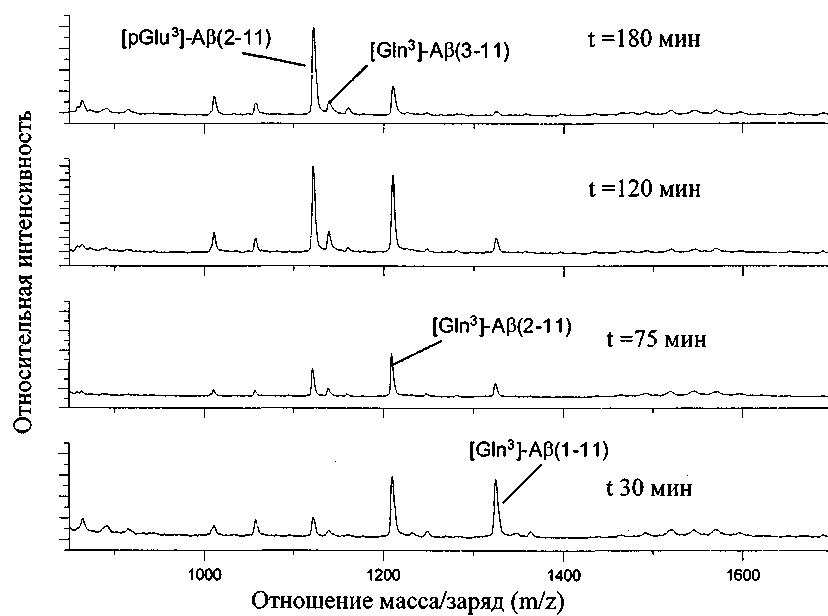
Фиг. 11



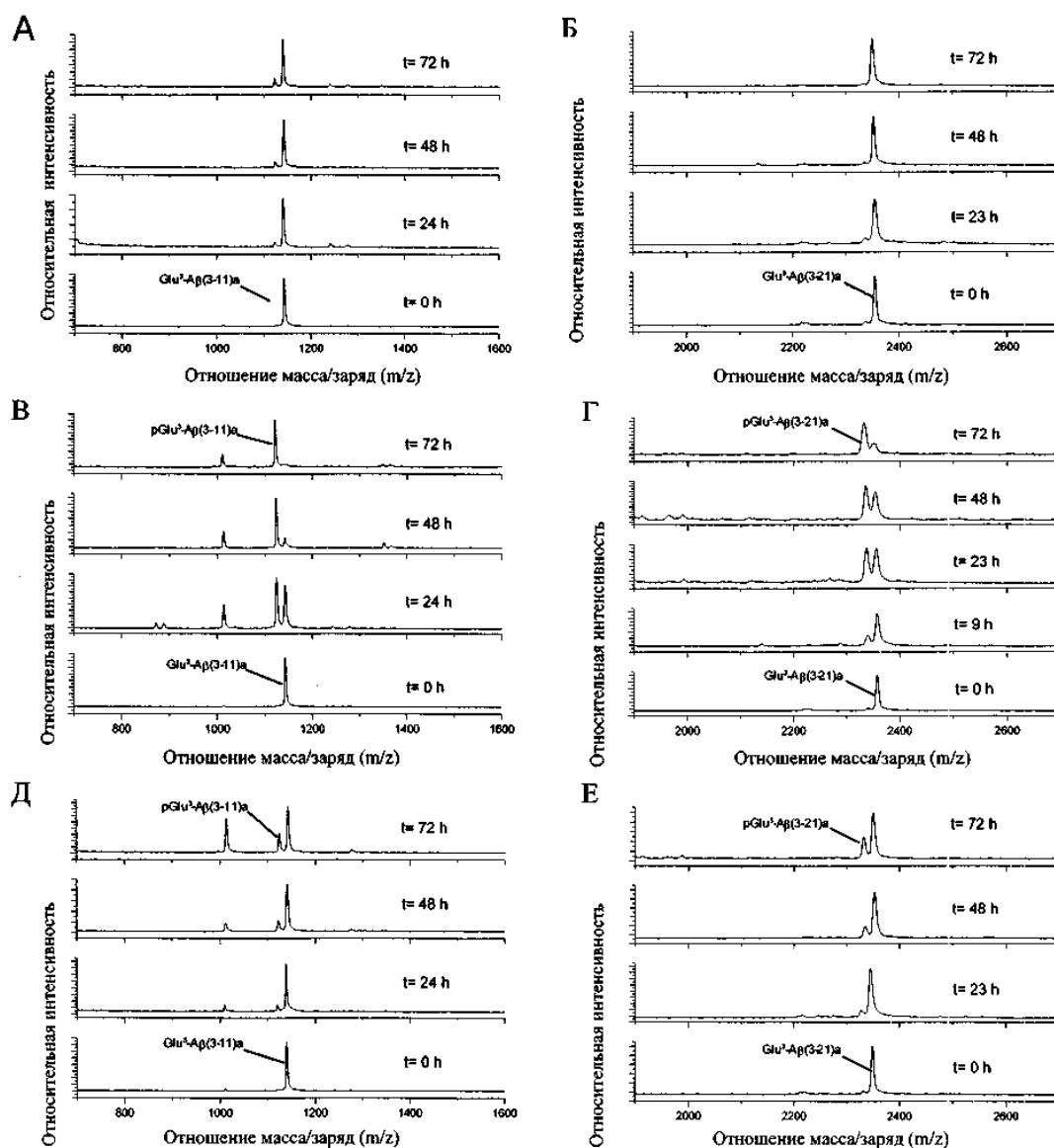
Фиг. 12



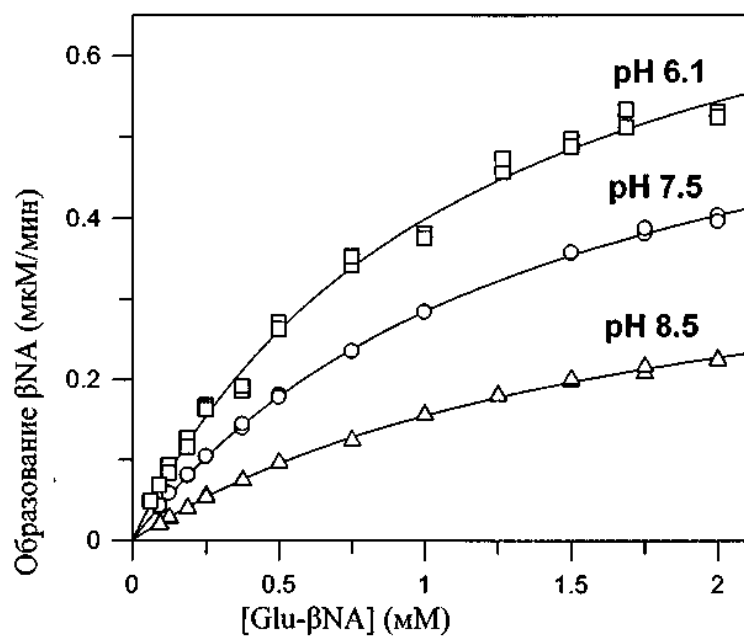
Фиг. 13



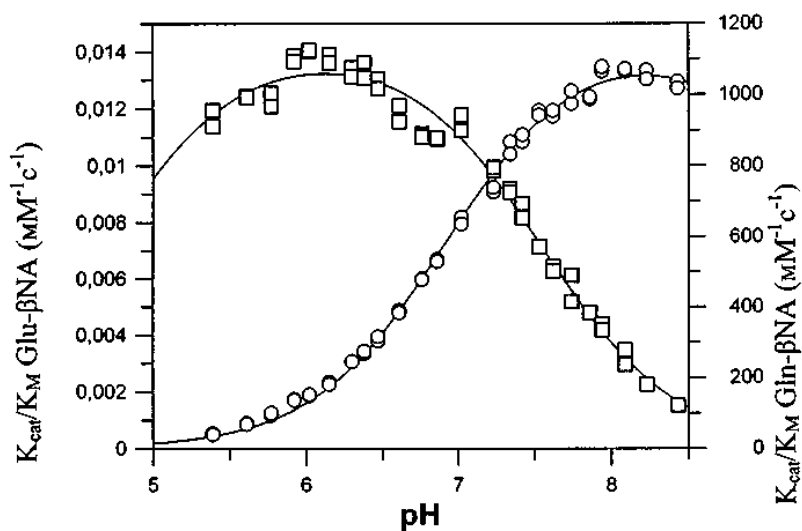
Фиг. 14



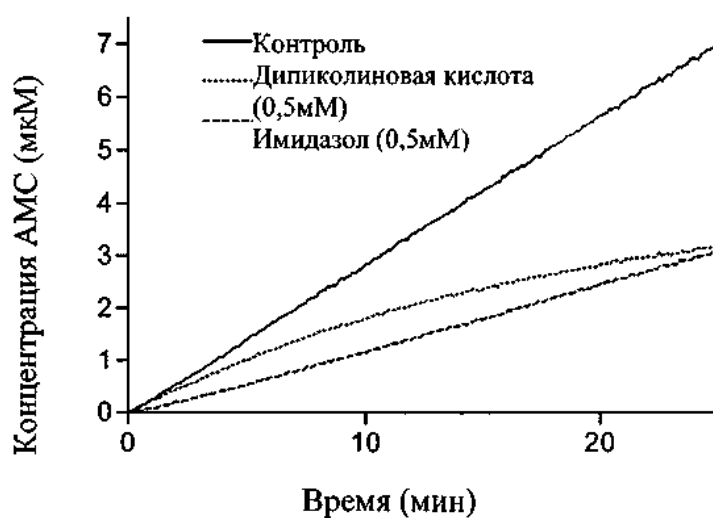
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

Substance	QR-activity (%)
CaCl ₂	~2
CoCl ₂	~10
MnCl ₂	~3
ZnSO ₄	~90
NiSO ₄	~2
KCl	~1
H ₂ O	~1
Контроль + ЭДТК	100
Контроль - ЭДТК	~95

Фиг. 20

```

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

hQC      SISEMWQNLDQLPLLIERYPGSPGSYAARQHIMQRIQRLOADWVLEIDTFLSQTPYGYRSF
SGAP     TIAAN--NGGN----RAHGRPGYKASVDYVKAKLD--AAGYTTTLQOFTSGGATGYNLI
hgCP II  LLEKM--GGSAP---PDSSWRGSLKVYPNVGPGFTGNFSTQKVMMHISTNEVTRIYNVI
              :      . .                . . . :      :      . . . * . :

hQC      SNIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWNRRVFGATDSAVPCAMMLELAR---ALDKK
SGAP     ANWPG-GDP--NKVLMAGAHLLDS--VSSG-----AGINDNGSGAAVLETAL---AVSRA
hgCP II  GTLRGAVEP--DRYVILGGHRRDS-----W----VFGGIDPQSGAAVVEIVRSFGTLKKE
              . . . : * . : : . * * *                * * . * : * . : : :

hQC      LLSLKTVSDSKPDLSLQLIFFDGEAFPLHWSFQDSLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQ
SGAP     GY--Q-----PDKHLRFAWWGAEEGLLIGS--KFY-----VNNLPSADR--SK
hgCP II  GW--R-----PRRTILFASWDAEEFGLLGS--TEW-----AEENSRLQ
              :      * : : : . . * * *                :      :      * : :

hQC      LHGMDDLVLVLDLIGAPNPTFPNFF--FNSARWFERLQAIHEHLH---ELGLLKDHSLEGR
SGAP     LAG---YLNFDMIGSPNPGYFVYDDDFVIEKTFKNYFAGLNVPT---EIETEGDGRSDHA
hgCP II  ERG-VAYINADSSIEGNYTLRVDCT-PLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKS
              *      : *      *      *      . . .      :      *      : .

hQC      Y---FQNYSY----G-G-----VIQDD-HIPFLRRGVP-VLHLIPSPFPEVWHTMDDNEE
SGAP     P---FKNVGVP--VG-G-----LFTGAGYTKSAAQAQK-WGGTAGQAFDRCYHSSCDLSL
hgCP II  PSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEtnKFSGYP-LYHSVYETYE
              * . .      * *      . :      :      :      : : * : . . .

hQC      NLDESTID-N-LNKILQVVFVLEYLHL---
SGAP     NINDTALDRNSDAAAHAIWTLSSGTGEPP
hgCP II  -LVEKFYD--PMFKYHLTVAOVRGGMVFEL

```

ФИГ. 21