

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>

A61K 31/4745 (2006.01)  
A61K 31/4178 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0009902  
(43) 공개일자 2006년02월01일

(21) 출원번호 10-2005-7021071

(22) 출원일자 2005년11월04일

번역문 제출일자 2005년11월04일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/004778

(87) 국제공개번호 WO 2004/098625

국제출원일자 2004년05월05일

국제공개일자 2004년11월18일

(30) 우선권주장 60/468,014 2003년05월05일 미국(US)  
60/468,043 2003년05월05일 미국(US)  
60/512,038 2003년10월15일 미국(US)

(71) 출원인 프로비오드룩 아게  
독일 테-06120 할레 바인베르그백 22

(72) 발명자 데무트, 한스-올리히  
독일, 06114 할레/잘레, 헤겔슈트라쎄 14  
호프만, 토르스텐  
독일, 06114 할레/잘레, 쾨르너슈트라쎄 8  
니스트로이, 앙드레, 제이.  
독일, 06193 제네비츠, 텔만플라츠 1  
슐링, 슈테판  
독일, 06128 할레/잘레, 로이퍼백 4  
하이저, 올리히  
독일, 06108 할레/잘레, 프란츠-슈베르트-슈트라쎄 5

(74) 대리인 손민  
허은순

심사청구 : 없음

(54) 글루타미닐 및 글루타메이트 사이클라제의 이펙터의 용도

요약

본 발명은 포유동물의 글루타미닐 사이클라제 (QC, EC 2.3.2.5)의 신규한 생리학적 기질, 신규한 QC 이펙터, 상기 이펙터를 스크리닝하는 방법, 상기 이펙터의 용도, 및 QC-활성의 조절로 치료될 수 있는 질환의 치료를 위한 상기 이펙터를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 바람직하게는 상기 조성물은 QC- 및 DP IV-활성의 조절로 치료될 수 있는 질환의 치료 또는 완화를 위해 추가로 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제를 포함한다.

명세서

## 기술분야

본 발명은 암모니아의 유리 하에서 N-말단 글루타민 잔기를 피로글루탐산 (5-옥소-프롤린, pGlu\*)으로 분자내 고리화하는 작용, 및 물의 유리 하에서 N-말단 글루탐이트 잔기를 피로글루탐산으로 분자내 고리화하는 작용을 촉매하는 글루타미닐 사이클라제 (QC, EC 2.3. 2.5)에 관한 것이다.

본 발명은 포유동물 QC를 금속효소로서 동정하고, 포유동물에서 QC의 신규한 생리학적 기질을 제공하며, QC-활성의 조절에 의해 처치될 수 있는 상태를 치료하는, QC의 이펙터 및 QC의 이펙터를 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 또한, 금속 상호작용이 QC 억제제의 발생에 유용한 접근법임을 밝힌다.

바람직한 일 양태에서, 본 발명은 QC-및/또는 DP IV-활성의 조절에 의해 처치될 수 있는 상태의 치료 또는 완화에, QC 활성의 이펙터를 DP IV 또는 DP IV-유사 효소들의 처해체와 조합하여 사용하는 것을 제공한다.

QC 활성 이펙터를 확인하고 선택하는 스크리닝 방법을 또한 제공한다.

## 배경기술

글루타미닐 사이클라제 (QC, EC 2.3. 2.5)는 암모니아를 배출하면서, N-말단 글루타민 잔기를 피로글루탐산 (pGlu\*)으로 분자내 고리화하는 작용을 촉매한다. QC는 Messer에 의해 1963년에 처음으로 열대 식물 카리카 파파야(*Carica papaya*)로부터 분리되었다 (Messer, M. 1963 Nature 4874, 1299). 24 년 후, 상응하는 효소 활성이 동물 뇌하수체에서 발견되었다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536; Fischer, W. H. 및 Spiess, J. 1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84, 3628-3632). 포유동물 QC의 경우, QC에 의해 Gln을 pGlu로 전환하는 것은 TRH 및 GnRH의 전구체에 대하여 나타내어 질 수 있다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536; Fischer, W. H. 및 Spiess, J. 1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84, 3628-3632). 또한, QC의 초기 위치 측정 실험에서는 펩타이드 호르몬 합성에서 추정되는 기능을 개선하는 이외에도, 소의 뇌하수체에서 촉매작용 추정 생성물과 공존하는 것으로 나타났다 (Bockers, T. M. 등. 1995 J Neuroendocrinol 7, 445-453). 한편, 식물성 QC의 생리적 기능은 덜 명확하다. C. papaya에서 유래한 효소의 경우, 병원성 미생물에 대한 식물 방어 기작에서의 역할이 제시되어 있다 (El Moussaoui, A. 등. 2001 Cell Mol Life Sci 58, 556-570). 다른 식물들로부터 추정되는 QC들은 서열 비교로 최근 확인되었다 (Dahl, S. W. 등. 2000 Protein Expr Purif 20, 27-36). 하지만 이러한 효소들의 생리적 작용은 여전히 불명확하다.

식물 및 동물로부터 알려진 QC들은 기질의 N-말단 위치에 있는 L-글루타민에 대한 정확한 특이성을 나타내고 그것들의 역학적 특성은 미카엘리스-멘텐 (Michaelis-Menten)식을 따르는 것으로 밝혀졌다(Pohl, T. 등. 1991 Proc Natl Acad Sci U S A 88, 10059-10063; Consalvo, A. P. 등. 1988 Anal Biochem 175, 131-138 ; Gololobov, M. Y. 등. 1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377, 395-398). C. 파파야에서 유래한 QC들과 포유동물에서 유래한 높은 보존성 QC의 일차 구조를 비교하였으나 어떠한 서열 상동성도 보이지 않은 것으로 나타났다(Dahl, S. W. 등. 2000 Protein Expr Purif 20,27-36). 식물 QC들은 신규한 효소 군에 속하는 것으로 나타나는 반면 (Dahl, S. W. 등. 2000 Protein Expr Purif 20, 27-36), 포유동물 QC들은 박테리아성 아미노펩티다제와 확실한 서열 상동성을 가지는 것으로 나타났고 (Bateman, R. C. 등. 2001 Biochemistry 40,11246-11250), 이는 식물과 동물에서 출처된 QC들은 상이한 진화 기원을 가진다는 결론에 도달한다.

EP 02 011 349.4은 곤충 글루타미닐 사이클라제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 개시하고 있다. 또한, 상기 특허출원은 이 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 곤충 QC를 포함하는 분리된 폴리펩타이드 및 숙주세포는 글루타미닐 사이클라제 활성을 감소시키는 제제를 스크리닝하는 방법에 유용하다. 그러한 제제들은 살충제로서 유효한 것으로 설명되어 있다.

알츠하이머병(AD)은 이영양성 뉴런, 반응성 정상세포 및 소 신경 교세포(microglia)과 밀접하게 연관되어 있는 세포외 아밀로이드성 플라크가 비정상적으로 축적되는 것을 특징으로 한다 (Terry, R. D. 및 Katzman, R. 1983 Ann Neurol 14, 497-506; Glenner, G. G. 및 Wong, C. W. 1984 Biochem Biophys Res Comm 120, 885-890; Intagaki, S. 등. 1989 J Neuroimmunol 24, 173-182; Funato, H. 등. 1998 Am J Pathol 152, 983-992; Selkoe, D. J. 2001 Physiol Rev 81, 741-766). 아밀로이드-β(Aβ) 펩타이드는 노인성 플라크의 일차적인 성분이고, 유전적 연구에 의해 지원되는 가설인 AD의 병인 및 진행에 직접적으로 연관되어 있는 것으로 여겨지고 있다(Glenner, G. G. 및 Wong, C. W. 1984 Biochem Biophys Res Comm 120, 885-890; Borchelt, D. R. 등. 1996 Neuron 17, 1005-1013; Lemere, C. A. 등. 1996 Nat Med 2, 1146-1150; Mann, D. M. 및 Iwatsubo, T. 1996 Neurodegeneration 5, 115-120; Citron, M. 등. 1997 Nat

Med 3,67-72 ; Selkoe, D. J. 2001 Physiol Rev 81, 741-766). A $\beta$ 는  $\beta$ -아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 단백질 분해과정에서 생성되며 (Kang, J. 등. 1987 Nature 325, 733-736; Selkoe, D. J. 1998 Trends Cell Biol 8, 447-453), 이는 후속적으로 A $\beta$ 의 N-말단에서  $\beta$ -세크레타제에 의해 그리고 C-말단에서  $\gamma$ -세크레타제에 의해 순차적으로 절단된다 (Haass, C. 및 Selkoe, D. J. 1993 Cell 75,1039-1042 ; Simons, M. 등. 1996 J Neurosci 16 899-908). N-말단에서 L-Asp로 시작하는 주된 A $\beta$  펩타이드 (A $\beta$ 1-42/40)외에, N-말단에서 절제된(truncated) 많은 이종적 형태가 노인성 플라크에서 발생한다. 이렇게 짧아진 펩타이드들은 시험관 내에서 신경독성이며 그리고 전장(full-length) 이소폼(isoform)들보다 더 신속하게 응집하는 것으로 보고되고 있다 (Pike, C. J. 등. 1995 J Biol Chem 270 23895-23898). N-절제된 펩타이드들은 초기 개시되는 가족성 AD (FAD) 대상자에서 과생산되고 (Saido, T. C. 등. 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. 등. 2000 Nature 405,531-532), 또 다운 증후군 (DS) 뇌에서 초기에 나타나고 나이가 들에 따라 증가되는 것 (Russo, C. 등. 1997 FEBS Lett 409,411-416, Russo, C. 등. 2001 Neurobiol Dis 8, 173-180; Tekirian, T. L. 등. 1998 J Neuropathol Exp Neurol 57, 76-94) 보고된다. 마지막으로, 이것들의 양은 병의 진행 정도를 반영한다 (Russo, C. 등. 1997 FEBS Lett 409, 411-416). 추가 후변역 과정은 위치 1과 7의 아스파테이트를 이성화하거나 또는 라세미화하여, 그리고 잔기 3과 11에서의 글루타메이트를 고리화함으로써 N-말단을 더욱 변경할 수 있다. 위치 3에서의 피로글루타메이트-함유 이소폼([pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-40/42)들은 노인성 플라크에서 N-절제된 종의 주된 형태-전체 A $\beta$  양의 약 50%-를 나타내며 (Mori, H. 등. 1992 J Biol Chem 267, 17082-17086, Saido, T. C. 등. 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. 등. 1997 FEBS Lett 409, 411-416 ; Tekirian, T. L. 등. 1998 J Neuropathol Exp Neurol 57, 76-94; Geddes, J. W. 등. 1999 Neurobiol Aging 20,75-79 ; Harigaya, Y. 등. 2000 Biochem Biophys Res Commun 276,422-427), 이들은 또한 예비(pre)-아밀로이드 병변에 존재한다 (Lalowski, M. 등. 1996 J Biol Chem 271, 33623-33631). A $\beta$ N3 (pE) 펩타이드의 축적은 응집하는 것을 향상시키고 대부분의 아미노-펩타이드에 저항성을 부여하는 구조적 변경 때문인 것으로 보인다 (Saido, T. C. 등. 1995 Neuron 14, 457-466; Tekirian, T. L. 등. 1999 J Neurochem 73,1584-1589). 이러한 증거는 AD 발병에 있어서 A $\beta$ N3(pE) 펩타이드의 중심적 역할에 대한 실마리를 제공해준다. 그러나, 이들의 신경독성 및 응집 특성에 대하여 알려진 것이 상대적으로 없다 (He, W. 및 Barrow, C. J. 1999 Biochemistry 38, 10871-10877; Tekirian, T. L. 등. 1999 J Neurochem 73, 1584-1589). 더욱이, 비록 활성화된 신경교 세포가 노인성 플라크와 단연 연관되어 있고 그리고 아밀로이드 침적물 축적에 활동적으로 기여할 것이라고 해도, 신경교 세포에 대한 이러한 이소폼들의 작용 및 이러한 펩타이드에 대한 신경교 세포 반응들은 완전히 알려져 있지 않다. 최근의 연구에서, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-40, [pGlu<sup>3</sup>] A $\beta$ 3-42 및 [pGlu<sup>3</sup>] A $\beta$ 3-40 펩타이드의 독성, 응집특성 및 이화작용을 신경 및 신경교 세포 배양물에서 조사하였고, 피로글루타메이트 변형은 A $\beta$ -펩타이드의 유독 특성을 더 악화시키며, 또한 배양된 정상세포에 의한 분해를 저해시킨다는 것이 밝혀졌다. Shirotnani 등은 신드비스(Sindbis) 바이러스에 의해 감염된 일차 원추형 뉴런에서 시험관 내에서 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$  펩타이드를 발생시켰다. 그들은 아미노산 치환 및 삭제에 의해 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 에 대해서 잠재적인 전구체를 암호화하고 있는 아밀로이드 전구체 단백질 상보성 DNA들을 구성하였다. 야생 전구체에서 글루타메이트 대신에 N-말단 글루타민 잔기로 시작하는 하나의 인공 전구체에 대하여, 피로글루타메이트로의 자연적 전환 또는 글루타미닐 사이클라제에 의한 효소성 전환이 제시되었다. [pGlu<sup>3</sup>] A $\beta$ 의 야생 전구체에서 위치 3에 있는 N-말단 글루타메이트의 고리화 기작은 생체 내에서는 결정되지 않았다 (Shirotnani, K., Tsubuki, S., Lee, H. J., Maruyama, K., 및 Saido, T. C. (2002) Neurosci Lett 327, 25-28).

디펩티딜 펩티다제 IV (DP IV)는 신장, 간 및 장을 포함하는 인체 내의 여러 조직에서 발견되는 포스트(post)-프로린 (더 약한 정도로는, 포스트-알라닌, 포스트-세린 또는 포스트-글리신) 절단 세린 프로테아제이고, 및 펩타이드 사슬로부터 N-말단 디펩타이드를 절단한다. 최근에, DP IV가 뉴로펩타이드 대사, T-세포 활성화, 상피 조직으로의 암세포 고착, 및 임파성 세포로의 HIV 진입에서 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다(참조 WO 02/34242, WO 02/34243, WO 03/002595 및 WO 03/002596).

DP IV 억제제는 내당능 장애(impaird glucose tolerance) 및 당뇨치료에 효과적일 수 있다고 알려져 있다 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 99/61431, Pederson, R. A. 등. 1998, Diabetes 47,1253-1258 및 Pauly, R. P. 등. 1999 Metabolism 48, 385-389). 특허, WO 99/61431에는 아미노산 잔기와, 티아졸리딘 또는 피롤리딘 기와 이들의 염, 특히 L-트레오-이소루이실 티아졸리딘, L-알로-이소루이실 티아졸리딘, L-트레오-이소루이실 피롤리딘, L-알로-이소루이실 티아졸리딘, L-알로-이소루이실 피롤리딘, 및 이의 염을 포함하는 DP IV 억제제를 개시하고 있다.

저분자량 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제의 다른 예들은 테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복사마이드 유도체, N-치환 2-시아노피롤리딘 및 -피롤리딘류, N-(N'-치환 글리실)-2-시아노피롤리딘류, N-(치환 글리실)-티아졸리딘류, N-(치환 글리실)-4-시아노티아졸리딘류, 아미노-아실-보로노-프롤릴-억제제류, 시클로프로필-융합 피롤리딘류 및 이중원자고리 화합물과 같은 제제들이다. 디펩티딜 펩티다제 IV의 억제제들은 US 6,380, 398, US 6,011, 155; US 6,107, 317; US 6,110, 949; US 6,124, 305; US 6,172, 081; WO 95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 198 34

591, WO 97/40832, DE 196 16 486 C 2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501, WO 99/46272, WO 99/38501, WO 01/68603, WO 01/40180, WO 01/81337, WO 01/81304, WO 01/55105, WO 02/02560 및 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 및 WO 03/024965에 설명되어 있고, 이들의 교시는 특히 이러한 억제제들, 이들의 정의, 용도 및 생산에 관한 내용 전체적으로, 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

## 발명의 요약

본 발명은 포유동물에서의 QC의 신규한 생리적 기질들,  $A\beta$ -40/42,  $[Gln^3]A\beta$ 3-40/42,  $[Glu^{11}]A\beta$ 11-40/42,  $[Gln^{11}]A\beta$ 11-40/42,  $[Gln^1]$ 가스트린(Gastrin),  $[Gln^1]$ 뉴로텐신(Neurotensin),  $[Gln^1]$ FPP,  $[Gln^1]$ CCL 2,  $[Gln^1]$ CCL 7,  $[Gln^1]$ CCL 8,  $[Gln^1]$ CCL 16,  $[Gln^1]$ CCL 18,  $[Gln^1]$ 프랙탈킨(Fractalkine),  $[Gln^1]$ 오렉신(Orexin) A,  $[Gln^3]$ 글루카곤(glucagon)3-29 및  $[Gln^5]$ 서브스탄스(substance) P5-11, 및 QC 활성을 조절함으로써 치료될 수 있는 상태의 치료에 적용되는, QC 이펙터의 용도와 QC 이펙터를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

사람 QC는 금속-의존성 트랜스퍼라제라는 것이 저해 연구를 통해 밝혀졌다. QC 아포효소는 아연이온에 의해 가장 효과적으로 재활성화 될 수 있었고, 아연-의존성 아미노펩티다제의 금속-결합 모티프(motif)가 또한 사람 QC에 존재한다. 활성-부위 결합된 금속과 상호작용하는 화합물이 강력한 억제제이다.

의외로, 재조합 사람 QC는 물론 뇌 추출물로부터 얻은 QC-활성체 둘다 N-말단 글루타미닐은 물론 글루타메이트 고리화를 촉매한다. 가장 놀라운 발견은 사이클라제-촉매된  $Glu^1$ -전환이 pH 6.0 근처에서 유리한 반면 pGlu-유도체로의  $Gln^1$ -전환은 pH 8.0 근처에서 최적으로 일어난다는 것이다. pGlu- $A\beta$ -관련된 펩타이드의 형성은 재조합 사람 QC 및 돼지 뇌하수체 추출물로부터 얻은 QC-활성체의 저해작용에 의해 억제될 수 있기 때문에, 상기 효소 QC는 알츠하이머병의 치료를 위한 약물 개발의 목표물이다.

QC 활성의 이펙터를 포유동물에게 투여함으로써, 알츠하이머병, 다운 증후군, 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 또는 무관한 케양 질환 및 위암, 병원성 정신질환, 정신분열증, 불임증, 신생물형성, 염증성 숙주 반응, 암, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로부터 선택되는 질환을 예방 또는 완화 또는 치료할 수 있다.

또한, QC 활성의 이펙터를 포유동물에게 투여함으로써, 위장관계 세포 증식, 바람직하게는 위점막 세포, 상피 세포의 증식, 급성 산 분비의 증식을 자극할 수 있고, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬 친화성(enterochromaffin-like) 세포의 분화를 자극할 수 있다.

더욱이, QC 활성의 이펙터를 포유동물에게 투여함으로써, 골수성 모세포(myeloid progenitor cell)의 증식을 억제하는 것이 가능하다.

또한, QC 억제제를 투여하여 남성 생식력을 억제하는 결과를 낼 수 있다.

바람직한 양태에서, 본 발명은 QC 활성의 이펙터를 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제와 함께 사용하여, QC- 및/또는 DPf IV-활성의 조절로 치료될 수 있는 상태를 치료 또는 완화시키는 용도를 제공한다.

본 발명은 QC의 적어도 하나의 이펙터, 임의로 통상적인 담체 및/또는 부형제와 조합하여 포함하는; 또는 QC의 적어도 하나의 이펙터를 적어도 하나의 DP IV-억제제와 조합하여, 임의로 통상의 담체 및/또는 부형제와 함께 포함하는 비경구, 장관 또는 경구 투여용 약학 조성물을 제공한다.

QC의 이펙터들을 확인하고 및 선택하는 스크리닝 방법을 또한 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

본 발명의 이러한 및 다른 관점을 하기 도면을 참조함으로써 더욱 잘 이해될 것이다:

도 1은 340 nm에서 흡광도 감소를 측정함으로써, 사람 QC에 의해 촉매된, H-Gln-Ala-OH의 고리화에 대한 진행 곡선을 나타낸다. 샘플들은 0.3 mM NADH/H<sup>+</sup>, 14 mM α-케토글루타르산, 30 U/ml 글루탐 탈수소효소 및 1 mM H-Gln-Ala-OH를 포함하였다. 곡선 A-D에 있어서, 다양한 농도의 QC가 적용되었다: A, 10 mU/ml, B, 5 mU/ml, C, 2.5 mU/ml. 곡선 D의 경우, QC를 적용하지 않았다. QC 농도 및 관측된 활성(삽입도) 사이에 선형적 연관성이 관찰되었다.

도 2는 Gln-βNA를 기질로 사용하여 1차 속도 하에서 측정시, 사람 및 파파야(삽입도) QC의 pH 의존성을 나타낸다. 사람 QC의 경우, 엘리스 및 모리슨에 따른 일정한 이온 강도를 제공하는, 25 mM MES, 25 mM 아세트 산 및 50 mM 트리스(Ellis, K. J. 및 Morrison, J. F. 1982 Methods Enzymol. 87,405-426)로 구성되는 완충 시스템을 사용하였다. 트리스의 약한 억제 효과로 인해, 파파야 QC는 50 mM 몹스(Mops) 완충액을 사용하여 조사되었다. NaCl을 첨가하여, 이온강도를 0.05M로 조절하였다. 속도 그래프는 분리기에 기초한 모델에 맞추므로써 평가되었다. 파파야 QC의 경우, 상기 데이터를 단일 분리 모델에 맞추므로써 7.13 ± 0.03의 pK<sub>a</sub>를 획득하였다.

도 3은 파파야 라텍스에서 유래한 QC 및 사람 QC의 안정성에 대한 pH의 효과를 나타낸다. 효소 저장 용액을 다양한 pH 값의 0.1 M 완충액 (pH 4 내지 7 소듐 사이트레이트, pH 7 내지 10 소듐 포스페이트)에 20 배로 희석시켰다. 효소 용액을 30 °C에서 30분간 처리하고 후속적으로 효소활성을 표준 방법에 따라 분석하였다.

도 4는 두 번째 아미노산 위치에서 글루타메이트를 포함하는 일단의 기질에 대한 특이성 상수 k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>를 비교한 도면이다. 디펩타이드 내지 테트라펩타이드에서 사람 QC의 특이성 증가가 나타나는 반면, 파파야 QC의 경우 아무 변화가 관측되지 않았다. 여기서 주어진 데이터는 표 3에 제시된 변수를 재도시한 것이다.

도 5는 사람 QC에 의해 촉매되어진, H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>로부터의 pGlu-Lys(pGlu)-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> 형성을 나타낸다. 기질 전환은 암모니아의 배출로 인하여 m/z 비율에서의 시간-의존적 변화로 관찰하였다. 샘플 조성물은 0.5 mM 기질, 38 nM QC를 포함한 40 mM Tris/HCl, pH 7.7 였다. 지시된 시간에서, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다. 파파야 QC의 경우 매우 유사한 의존성이 관측되었다.

도 6은 파파야 QC에 의해 촉매된, H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH<sub>2</sub>로부터의 pGlu-Phe-Lys-Ala-Glu-NH<sub>2</sub>의 생성을 나타낸다. 기질 전환은 메틸아민의 배출로 인해 m/z 비율에서의 시간 의존적 변화로 관찰하였다. 샘플 조성물은 0.5 mM 기질, 0.65 vM 파파야 QC를 함유한 40 mM Tris/HCl, pH 7.7 였다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다. 샘플 내에는 파파야 QC 없이 또는 사람 QC를 최대 1.5 μM까지 기질에 적용하기 까지는(미도시) 어떠한 기질 전환도 관찰되지 않았다.

도 7은 DP IV에 의해 촉매된, [Gln<sup>3</sup>]Aβ1-11로부터 [Gln<sup>3</sup>]-Aβ3-11의 생성을 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 8은 DP IV-억제제 Val-피롤리다이드 (Val-Pyrr)에 의한 [Gln<sup>3</sup>]Aβ1-11의 절단의 방지를 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 9는 QC에 의해 촉매된, [Gln<sup>3</sup>]Aβ3-11로부터 [pGlu<sup>3</sup>]Aβ3-11 생성을 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 10은 QC-억제제 1,10-페난트롤린에 의한 [Gln<sup>3</sup>]Aβ3-11로부터의 [pGlu<sup>3</sup>] Aβ3-11 생성 저해를 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 11은 DP IV 및 QC의 연속적 촉매작용 후 [Gln<sup>3</sup>]Aβ1-11로부터 [pGlu<sup>3</sup>]Aβ3-11의 생성을 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 12는 촉매적으로 활성인 DP IV 및 QC의 존재 하에서 QC-억제제 1,10-페난트롤린에 의한  $[Gln^3]A\beta 1-11$ 로부터  $[pGlu^3]A\beta 3-11$ 의 생성 억제를 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 13은 촉매적으로 활성인 DP IV 및 QC의 존재 하에서 DP IV-억제제 Val-Pyrr에 의한  $[Gln^3]A\beta 1-11$ 로부터  $[pGlu^3]A\beta 3-11$ 의 생성 감소를 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 14는 돼지 뇌하수체 분쇄물에 존재하는 아미노펩티다제(들) 및 QC에 의한 연속적인 촉매작용 후  $[Gln^3]A\beta 1-11$ 로부터  $[pGlu^3]A\beta$ -펩타이드3-11의 생성을 나타낸다. 지시된 시간에, 샘플을 분석 튜브로부터 제거하고, 매트릭스 용액과 혼합하고 (1:1 v/v) 및 질량 스펙트럼을 기록하였다.

도 15A와 도 15B는 사용 전에 10분간 가열한 재조합 사람 QC와 함께 항온처리한  $A\beta 3-11a$  및  $A\beta 3-21a$ 의 질량 스펙트럼을 나타낸다. 도 15C와 도 15D는 활성 사람 QC 존재 하에서  $A\beta 3-11a$  및  $A\beta 3-21a$ 의 질량 스펙트럼으로, 각각  $[pGlu^3]A\beta 3-11a$  및  $[pGlu^3]A\beta 3-21a$ 가 생성된 것을 나타낸다. 도 15E와 도 15F는 활성 QC 및 5 mM 벤즈이미다졸의 존재 하에서  $A\beta 3-11a$  및  $A\beta 3-21a$ 의 질량 스펙트럼으로,  $[pGlu^3]$  생성이 억제된 것을 나타낸다.

도 16은 기질농도에 대하여 플로팅된, 파파야 QC-촉매 하의 Glu- $\beta$ NA-전환의 반응속도를 나타낸다. 개시 속도는 0.1 M 피로인산염 완충액, pH 6.1(사각형), 0.1 M 인산염 완충액, pH 7.5 (원) 및 0.1 M 보레이트 완충액, pH 8.5 (삼각형)에서 측정되었다. 동적(운동) 변수는 하기와 같다:  $K_M = 1.13 \pm 0.07$  mM,  $k_{cat} = 1.13 \pm 0.04$  min<sup>-1</sup> (pH 6.1);  $K_M = 1.45 \pm 0.03$  mM,  $k_{cat} = 0.92 \pm 0.01$  min<sup>-1</sup> (pH 7.5);  $K_M = 1.76 \pm 0.06$  mM,  $k_{cat} = 0.56 \pm 0.01$  min<sup>-1</sup> (pH 8.5).

도 17은 일차 차수 속도 법칙 조건( $S \ll K_M$ )에서 결정된, Glu- $\beta$ NA(원) 및 Glu- $\beta$ NA(사각)의 전환시 pH-의존성을 나타낸다. 기질 농도는 각각 0.01 mM 및 0.25 mM 이었다. 상기에서 0.05 M 아세트산, 0.05 M 피로인산 및 0.05 M 트리신으로 구성된 삼 성분 완충액 시스템을 적용하였다. 모든 완충액은 이온 강도의 차이를 피하기 위해, NaCl을 첨가하여 동일한 전도성으로 조정하였다. 데이터는 두 개의 분리기에 대해 설정된 식에 맞추었고  $pK_a$  값이 Glu- $\beta$ NA에 대해서는  $6.91 \pm 0.02$  및  $9.5 \pm 0.1$  및 Glu- $\beta$ NA에 대해서는  $4.6 \pm 0.1$  및  $7.55 \pm 0.02$ 임을 밝혔다. 적정에 의해 측정되었을 때, 각 기질 아미노기의  $pK_a$  값은  $6.97 \pm 0.01$  (Glu- $\beta$ NA) 및  $7.57 \pm 0.05$  (Glu- $\beta$ NA)이었다. 모든 측정치는 30 °C에서 결정되었다.

도 18은 이미다졸, 디피콜린산의 존재 하 및 저해성 화합물의 부재 하에서, 사람 QC로 촉매된, H-Glu-AMC의 고리화의 진행 곡선을 나타낸다. 디피콜린산의 존재 하에서 곡선의 하이퍼볼릭 모양은 QC의 활성 부위로부터 금속 이온이 제거되었음을 나타낸다.

도 19는 이중고리 킬레이터 1,10-페난트롤린에 의한 QC의 시간-의존성 불활성화를 나타낸다. 기질 부재(연속선) 하에서 QC-효소를 억제제로 처리한 후, 억제제로 미리 처리되지 않은(점선) 샘플에 비해 감소된 효소활성이 관측되고, 이는 QC의 활성 부위로부터 금속이온이 제거된 것을 나타낸다.

도 20은 사람 QC를 일가- 및 이가 금속 이온으로 재활성화한 것을 나타낸다. QC는 2 mM 디피콜린산을 포함하는 50 mM Bis-Tris, pH 6.8을 첨가함으로써 불활성화되었다. 이어서, 이 효소를 1.0 mM EDTA를 포함하는 50 mM Bis-Tris, pH 6.8에 대해 투석하였다. 효소의 재활성화는, 완충액 용액에 존재하는 미량의 금속 이온에 의한 불특정적 재활성화를 피하기 위해, 0.5 mM EDTA 존재 하에서 불활성화된 효소 샘플을 0.5 mM 농도의 금속이온으로 처리하여 달성되었다. 불활성화되지 않았으나 불활성화된 효소(+ EDTA)로서 EDTA 용액에 대해 투석된 효소 샘플과 EDTA 첨가없이 (-EDTA) 완충 용액에 대해서 투석된 효소 샘플을 대조구로 하였다.

도 21은 사람 QC (hQC) 및 금속 펩티다제 Clan MH의 다른 M28 족 구성원의 서열을 배치한 것을 나타낸다. 다중의 서열 배치를 ch.EMBNet.org에 있는 ClustalW를 설정값으로 사용하여 수행하였다. 아연-이온 결합(ligating) 잔기의 보존이 사람 QC (hQC; GenBank X71125), 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 유래의 Zn-의존성 아미노펩티

다제 (SGAP; Swiss-Prot P80561), 및 사람 글루타메이트 카르복시펩티다제 II (hGCP II; Swiss-Prot Q04609)의 N-아세틸화-알파-연결된 산성 디펩티다제 (NAALADase I) 도메인 (잔기 274-587)에서 나타났다. 금속 결합에 연관된 아미노산들은 굵게 인쇄하여 밑줄로 표시하였다. 사람 QC의 경우, 이러한 잔기들은 펩티다제에 대한 추정 대응물이다.

**펩타이드 서열**

본 발명에서 언급되고 사용된 펩타이드들은 하기 서열을 가진다:

**Aβ1-42:**

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

**Aβ1-40:**

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

**Aβ3-42:**

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

**Aβ3-40:**

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

**Aβ1-11a:**

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH<sub>2</sub>

**Aβ3-11a:**

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH<sub>2</sub>

**Aβ1-21a:**

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>

**Aβ3-21a:**

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>

**Gln<sup>3</sup>-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

**Gln<sup>3</sup>-Aβ3-21a:**

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>

**Gln<sup>3</sup>-Aβ1-11a:**

Asp-Ala-Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH<sub>2</sub>

**Gln<sup>3</sup>-Aβ3-11a:**

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH<sub>2</sub>

**발명의 상세한 설명**

본 발명은

- a) 생체 내에서 QC 활성의 조절에 의해 치료될 수 있는 포유동물 질환의 치료; 및/또는
- b) QC 활성의 조절에 의해 유발되는 pGlu-함유 펩타이드의 작용에 기초한, 생리적 과정의 조절용으로 글루타미닐 사이클라제(QC)의 이펙터를 제공한다.

더욱이, 본 발명은 동물에서 글루타미닐 사이클라제 (QC, EC 2.3. 2.5) 및/또는 QC-유사 효소를 저해하는 화합물, 및 QC 활성과 관련된 병인적 상태를 치료하는데 적용되는 QC 활성 억제제의 용도를 제공한다.

본 발명은 또한 알츠하이머병 및 다운 증후군의 새로운 치료 방법을 제공한다. 알츠하이머병 및 다운 증후군의 뇌에 침적된 아밀로이드 β-펩타이드의 N-말단은 피로글루탐산을 보유하고 있다. pGlu 생성은 이러한 질환들의 발병 및 진행에 중요한 요긴인데 이는 변형된 아밀로이드 β-펩타이드가 β-아밀로이드 응집 및 독성으로의 경향을 더욱 강하게 나타내면서, 그러한 질병의 개시 및 진행을 악화시키는 것으로 보이기 때문이다 (Russo, C. 등. 2002 J Neurochem 82, 1480-1489).

반대로, 야생 Aβ-펩타이드 (3-40/42)에서는, 글루탐산이 N-말단 아미노산으로서 존재한다. Glu가 pGlu로 효소 전환되는 것이 없는 것으로 현재까지 알려져 있다. 더욱이, Glu-펩타이드가 pGlu-펩타이드로 자연적으로 고리화되는 것은 아직 관찰되지 않았다. 그러므로, 본 발명의 한 관점은 알츠하이머병 및 다운 증후군에서의 QC 역할을 결정하는 것이다. 이러한 관점은 위치 3에서 글루탐산 대신에 아미노산 글루타민을 포함하는 Aβ3-11 및 Aβ1-11의 합성, QC, DP IV와 DP IV-유사 효소 및 아미노펩티다제에 대한 이러한 변형된 아밀로이드 β-펩타이드의 기질 특성 결정, 및 아밀로이드 β-유도 펩타이드 1-11와 3-11의 N-말단 글루타미닐 잔기로부터 pGlu가 형성되는 것을 예방하는 데 적용되는 QC 억제제의 용도에 의해 특징된다. 이 결과를 실시예 8에 나타내었다. 적용된 방법은 실시예 3에 설명되어 있다.

현재까지, 상기 질병의 진행에 QC가 연루되고 있다는 것을 나타내는 아무런 단서가 없었는데, 이것은 글루탐산이 Aβ (3-40/42, 또는 11-40/42)에서의 N-말단 아미노산이기 때문이다. 그러나, QC는 펩타이드의 N-말단에서 pGlu를 형성할 수 있는 유일하게 알려진 효소이다. 본 발명 다른 관점은 하기 연구 결과물 및 발견물에 관한 것이다:

- a) 부반응에서, QC는 글루탐산을 피로글루탐산으로 고리화시키는데 낮은 속도로 촉매한다,
- b) APP의 글루탐산 또는 이의 후속적으로 형성된 아밀로이드-β-펩타이드는 미지의 효소 활성화에 의해 번역후 과정으로 글루타민으로 전환되고 및 두 번째 단계에서, QC는 아밀로이드 β-펩타이드 N-말단의 프로세싱 이후 피로글루탐산으로 글루타민의 고리화를 촉매한다,
- c) 글루탐산은 화학 촉매 작용 또는 자체 촉매작용에 의해 번역후 과정적으로 글루타민으로 전환되고, 후속적으로 β-펩타이드 N-말단의 처리과정 후 글루탐산으로의 글루타민 고리화 작용을 촉매한다,
- d) 아밀로이드 β-단백질을 암호화하고 있는 APP 유전자에는 위치 3에서 Glu 대신 Gln을 나타내게 하는 돌연변이체들이 있다. N-말단의 번역 및 프로세싱 후, QC는 글루타민이 피로글루탐산으로 고리화되는 것을 촉매한다,
- e) 글루타민은, 미지의 효소 활성화의 기능장애로 인해, APP의 신생되는 펩타이드 사슬로 포함되고, 및 후속적으로, QC는 아밀로이드 β-펩타이드 N-말단의 프로세싱 후 N-말단의 글루타민이 피로글루탐산으로 고리화되는 것을 촉매한다.

QC는 상기한 다섯 가지 경우에서 결정적 단계, 즉 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드의 응집에 유리한 피로글루탐산에 연루된다. 즉, QC를 저해함으로써 고리화가 일어나는 기작에 관계없이, 알츠하이머병 및 다운 증후군의 개시와 진행을 야기시키는, 플라크-생성  $A\beta_{3-40/41/43}$  또는  $A\beta_{11-40/41/43}$ 의 침전을 방지할 수 있다.

글루타메이트는 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드의 위치 3,11 및 22에서 발견된다. 이들 중, 위치 22에서 글루탐산(E)의 글루타민(Q)으로의 변이는 (아밀로이드 전구체 단백질 APP 693, Swissprot P05067에 상응하는) 소위 네덜란드형 대뇌동맥성 아밀로이드증 변이 (Dutch type cerebroarterial amyloidosis mutation)로 설명되고 있다.

위치 3,11 및/또는 22에서 피로글루탐산 잔기를 가지는  $\beta$ -아밀로이드 펩타이드는  $A\beta_{1-40/42/43}$ 보다 더 세포독성이고 소수성이라고 알려져 있다 (Saido T. C. 2000 Medical Hypotheses 54 (3): 427-429).

다중의 N-말단 변이체는  $\beta$ -세크레타제 효소인  $\beta$ -부위 아밀로이드 전구체 단백질-절단 효소 (BACE)에 의해 상이한 부위에서 (Huse J. T. 등. 2002 J. Biol. Chem. 277 (18): 16278-16284), 및/또는 아미노펩티다제 처리과정(processing)에 의해 발생될 수 있다. 모든 경우, 고리화 과정은 전술한 바와 같이, a) 내지 e)에 따라서 고리화가 발생할 수 있다.

지금까지, 미지의 글루타밀 사이클라제 (EC)에 의해 경로 a)에 상응하게  $Glu^1$ -펩타이드가 pGlu-펩타이드로 효소 전환되는 것을 지지하는 실험적 증거는 없다 (Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S., 및 Sweedler, J. V. (1999) J Neurochem 72, 676-681; Hosoda R. 등. (1998) J Neuropathol Exp Neurol. 57,1089-1095). 현재까지, N-말단에서 양성자화되고, 온건한 알칼리성 pH-조건 하에서 음하전된  $Glu^1\gamma$ -카르복실레이트 부분체를 보유하는  $Glu^1$ -펩타이드를 고리화할 수 있는, 그러한 효소 활성화는 확인되지 않았다.

$Gln^1$ -기질에 대한 QC-활성은 pH 7.0 미만에서 급격히 감소된다. 한편,  $Glu^1$ -전환은 산성 반응 조건에서 일어나는 것으로 보인다 (Iwatsubo, T., Saido, T. C., Mann, D. M., Lee, V. M., 및 Trojanowski, J. Q. (1996) Am J Pathol 149,1823-1830 ; Russo, C., Saido, T. C., DeBusk, L. M., Tabaton, M., Gambetti, P., 및 Teller, J. K. (1977) FEBS Lett 409,411-416 ; Russo, C., Salis, S., Dolcini, V., Venezia, V., Song, X. H., Teller, J. K., 및 Schettini, G. (2001) Neurobiol Dis 8,173- 180; Tekirian, T. L., Saido, T. C., Markesbery, W. R., Russell, M. J., Wekstein, D. R., Patel, E., 및 Geddes, J. W. (1998) J Neuropathol Exp Neurol. 57,76-94 ; Russo, C., Violai, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., DArrigo, C., Patrone, E., Carlo, P., 및 Schettini, G. (2002) J Neurochem 82,1480-1489 ; Hosoda, R., Saido, T. C., Otvos, L., Jr., Arai, T., Mann, D. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 및 Iwatsubo, T. (1998) J Neuropathol Exp Neurol. 57,1089- 1095; Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S., 및 Sweedler, J. V. (1999) J Neurochem 72, 676-681).

본 발명에 따라서, QC가 약한 산성 조건 하에서 아밀로이드- $\beta$  유도성 펩타이드를 인식하고 변경할 수 있는지를 조사하였다. 그러므로, 상기 효소의 잠재적인 기질로서 펩타이드 [ $Gln^3$ ]  $A\beta_{1-11a}$ ,  $A\beta_{3-11a}$ , [ $Gln^3$ ]  $A\beta_{3-11a}$ ,  $A\beta_{3-21a}$ , [ $Gln^3$ ]  $A\beta_{3-21a}$  및 [ $Gln^3$ ]  $A\beta_{3-40}$ 를 합성하였고 조사하였다. 이러한 서열들은 번역후 Glu-아미드화로 인하여 일어날 수 있는, 자연적으로 N-말단 및 C-말단에서 절제된(truncated) [ $Glu^3$ ]  $A\beta$  펩타이드 및 [ $Gln^3$ ]  $A\beta$  펩타이드를 모사하기 위해 선택되었다.

본 발명에 있어서, 과과야 및 사람 QC는 글루타미닐 및 글루타밀 고리화를 둘 다 촉매하는 것으로 나타났다. 명백히, QC의 일차적 생리적 기능은 호르몬 분비 과정 전 또는 중에 글루타민 고리화과정에 의해 내분비 세포에서 호르몬 성숙을 완성하는 것이다. 그러한 분비 소체(vesicle)들은 산성 pH라고 알려져 있다. 따라서, 5.0 내지 7.0의 pH 범위에서 상기 효소의 부차 활성화는 그것의 새롭게 발견되는, Glu- $A\beta$  펩타이드를 또한 변형하는 글루타밀 사이클라제 활성일 수 있다. 그러나,  $Gln$ -전환에 비해 Glu-고리화가 훨씬 더 늦게 일어나기 때문에, 글루타밀 고리화가 유의한 생리적 역할을 수행하는지는 의문이 있다. 그러나, 퇴행성 신경질환에서는, 글루타밀 고리화가 관련성이 있다.

이러한 효소 반응의 pH-의존성을 조사하여 본 발명자들은 양성자화되지 않은 N-말단이  $Gln^1$ -펩타이드의 고리화에 필수적이고, 따라서 그 기질의 pKa-값이 QC-촉매작용에 대한 pKa-값과 동일하다는 것을 발견하였다(참조 도 17). 그러므로, QC는 아미드화에 의해 친전자적으로 활성화된  $\gamma$ -카르보닐 탄소 상의 비양성자화된  $\alpha$ -아미노 부분의 분자내 친핵성 공격을 안정화시킨다 (반응식 1).

N-말단 글루타민 함유 펩타이드 상에 존재하는 일가 하전에 비해, Glu-함유 펩타이드내의 N-말단 Glu-잔기는 중성 pH 주위에서 주로 이가가 지배적으로 하전되어 있다. 글루타메이트는  $\gamma$ -카르복실 및  $\alpha$ -아미노 부분체에 각각, 약 4.2 및 7.5의 pKa-값을 나타낸다. 즉, 중성 pH 및 그 이상에서, 비록  $\alpha$ -아미노 질소가 부분적으로 또는 전체적으로 양성자화되지 않고 친핵성이라 할지라도,  $\gamma$ -카르복실기는 비양성자화되어 있고 따라서 친전자성 카르보닐 활성을 나타낸다. 그러므로, 분자내 고리화는 불가능하다.

그러나, 약 5.2 내지 6.5의 pH 범위에서, 상기 두 개의 관능기는, 그들 각각의 pKa-값 사이에서, 전체 N-말단 Glu-함유 펩타이드의 약 1 내지 10% ( $-\text{NH}_2$ ) 또는 10 내지 1% ( $-\text{COOH}$ )의 농도로, 비이온화된 형태로 둘다 존재한다. 그 결과, 온건한 pH-범위에 걸쳐, N-말단 Glu-펩타이드들은 양쪽 기를 하전되지 않게 가지고 있으며, 그러므로 QC가 pGlu-펩타이드로 분자내 고리화되는 중간체를 안정화시킬 수 있다는 것이 가능하다. 즉,  $\gamma$ -카르복실기가 양성자화되어 있다면, 카르보닐 탄소는 비양성자화된  $\alpha$ -아미노기에 의한 친핵성 공격을 허용할 만큼 충분히 친전자성이 된다. 이러한 pH에서, 수산화 이온은 이탈기(leaving group)로서 작용한다 (반응식 3). 이러한 가정은 Glu- $\beta$ NA의 QC 촉매적 전환에 대하여 얻은 pH-의 존성 데이터에 의해 입증된다 (참조 실시예 11). QC에 의한 Glu- $\beta$ NA의 글루타민 전환과 반대로, 촉매 작용에서의 최적 pH는 pH 6.0 근처의 산성 영역, 즉, 양성자화된  $\gamma$ -카르복실기 및 비양성자화된  $\alpha$ -아미노기를 보유하고 있는 기질 분자들이 동시에 많은 pH-범위로 이동된다. 더욱이, 역학적으로 결정된  $7.55 \pm 0.02$ 의 pKa 값은 적정에 의해 결정된 Glu- $\beta$ NA의  $\alpha$ -아미노기의 ( $7.57 \pm 0.05$ ) 것과 정확하게 일치한다.

생리학적으로, pH 6.0에서 QC-촉매된 글루타메이트 고리화의 이차 차수 속도 상수 (또는 특이성 상수,  $K_{\text{cat}}/K_M$ )는 글루타민 고리화에 대한 것보다 8,000배 더 느린 범위에 있을 수 있다 (도 17). 그러나, 양쪽 기질 모델 Glu- $\beta$ NA 및 Gln- $\beta$ NA의 비효소성 전환은 무시될 수 있고, 본 발명에서 관측된, 무시될 수 있는 pGlu-펩타이드 생성과 일치한다. 따라서, QC에 의한 pGlu-생성에 대하여, 효소성 대 비효소성 속도 상수의 비로부터 적어도  $10^8$ 의 촉진계수가 얻어질 수 있다(효소 촉매 작용에 대한 이차 지수 속도 상수와 각각의 비효소성 고리화 일차 속도 상수와 비교하면, 촉매성 숙달 인자 (catalytic proficiency factor)는 Gln- 및 Glu-전환, 각각에 대하여,  $10^9$ - $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이다). 이러한 데이터로부터 얻은 결론은 생체 내에서 pGlu-생성을 유발하는 효소 경로만이 생각될 수 있을 뿐이라는 것이다.

QC는 뇌에 매우 많고, (Gln-) TRH-유사 펩타이드의 30  $\mu\text{M}$ 의 성숙과정에 대해 최근 발견된  $0.9 \text{ min}^{-1}$ 의 높은 전환속도를 고려할 때 (Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Ouyang, X., Kim, H. S., Wu, W. M., Zharikova, A., 및 Bodor, N. (1999) J Med Chem 42,4563-4571), 유사한 반응 조건이 제시된다면 적절한 글루타메이트-기질에 대해서 약 100 시간의 고리화 반감기를 예상할 수 있다. 더욱이, 분비 경로로 뇌 QC/EC이 격리되고 국소된다면, 실제적인 생체 내에서의 효소와 기질 농도, 및 반응 조건은 온전한 세포에서 효소성 고리화 작용에 대해 더더욱 유리하게 될 것이다. 그리고, 만일 N-말단 Glu가 Gln으로 변형된다면, pGlu-형성이 QC에 의해 더 빠르게 매개될 것으로 예상된다. 시험관에서, 양쪽 반응은 QC/EC-활성의 억제제를 적용함으로써 억제되었다 (도 9,10 및 15).

요약하면, 본 발명은 뇌에 많은 사람 QC가 알츠하이머병에서 발견되는 플라크 침적물의 50% 이상을 구성하는 Glu-A $\beta$ 와 Gln-A $\beta$  전구체로부터, 아밀로이드 발생성 pGlu-A $\beta$  펩타이드를 생성하는데 유력한 촉매임을 나타낸다. 이러한 발견은 QC/EC를 노인성 플라크 형성에 역할체로서 확인하며 따라서, 알츠하이머병의 치료에 신규한 약물 타겟으로서 확인한다.

본 발명의 두 번째 양태에서, 아밀로이드 유도된 펩타이드들은 디펩티딜 펩티다제 IV (DP IV) 또는 DP IV-유사 효소들, 바람직하게는 디펩티딜 펩티다제 11 (DPII)의 기질임이 발견된다. DP IV, DP II 또는 다른 DP IV-유사 효소들은 글루타민을 N-말단 아미노산 잔기로 가지는 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드 (3-11)를 생성하면서, 변형된 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드 (1-11)의 N-말단으로부터 디펩타이드를 방출한다. 이 결과들을 실시예 8에 예시하였다.

문헌에 설명된 바와 같이, DP II, DPIV 또는 다른 DP IV-유사 효소에 의한 절단전에, 아스파르트 산 (아밀로이드  $\beta$ -펩타이드의 잔기) 및 알라닌 (아밀로이드  $\beta$ -펩타이드의 잔기 2) 사이의 펩타이드 결합은 이성화되고, 이소아스파틸 잔기를 형성한다 (Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) BBRC 237, 188-191; Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. 및 Shirasawa, T. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 381,225-234). 이러한 이소아스파틸 잔기는 아밀로이드  $\beta$ -펩타이드를 아미노펩티다제 분해에 대해내성있게 하며, 결론적으로 코어 플라크들은 많은 양의 isoAsp<sup>1</sup>-아밀로이드  $\beta$ -펩타이드를 포함하게 되고, 이것은 N-말단에서의 전환 감소를 말한다.

그러나, 본 발명에서 처음으로, N-말단 디펩타이드 H-isoAsp<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>-OH가 디펩티딜 펩티다제에 의해, 특히 산성 조건하에서 방출될 수 있다는 것이 밝혀진다. 더욱이, 이성화는 또한  $\beta$ -세크리타제에 의한 절단에 앞서서 일어나며 단백질분해

처리작용을 가속화시켜, isoAsp<sup>1</sup>-아밀로이드 β-펩타이드들의 N-말단 이소아스파틸 결합이 방출되어지는데 이르게 되고, 이는 후속적으로 DP II, DPIV 또는 DP IV-유사 효소들에 의해 전환된다 (Momand, J. 및 Clarke, S. (1987) Biochemistry 26, 7798- 7805; Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) BBRC 237, 188-191). 따라서, 이소아스파틸 형성을 저해하는 것은 β-세크리타제에 의한 절단을 감소시키는데 이르고, 그 다음 아밀로이드 β-펩타이드들의 형성을 감소하게 되게 한다. 또한, DP II, DPIV 또는 DP IV-유사 효소의 저해로 인한 isoAsp<sup>1</sup>-아밀로이드 β-펩타이드 전환을 차단하게 되면 [Glu<sup>3</sup>]Aβ를 [pGlu<sup>3</sup>]Aβ로 QC/EC-축매 형성시키는 것을 방지할 수 있을 것이다.

본 발명의 세 번째 양태에서, DP IV-활성의 억제제 및 QC의 억제제들의 조합을 알츠하이머병 및 다운 증후군 치료에 사용할 수 있다.

DP IV 및/또는 DP IV-유사 효소 및 QC의 조합된 효과는 하기에 설명된다:

- a) DP IV 및/또는 DP IV-유사 효소들은 Aβ<sub>1-40/42</sub>를 절단하고, H-Asp-Ala-OH를 함유한 디펩타이드 및 Aβ-40/42가 방출된다,
- b) 부반응에서, QC는 글루탐산을 피로글루탐산으로 매우 낮은 속도로 고리화시키는데 촉매한다.
- c) 글루탐산은 N-말단에서 번역후 과정으로 미지의 효소 활성화에 의해 글루타민으로 전환되고, 이어서 QC는 아밀로이드 β-펩타이드 N-말단의 프로세싱 후, 글루타민을 피로글루탐산으로 고리화하는 것을 촉매한다.
- d) 글루탐산은 화학적 축매작용 또는 자가 축매작용에 의해 번역 후 과정으로 글루타민으로 전환되고, 두 번째 단계에서, QC는 아밀로이드 β-펩타이드 N-말단 프로세싱후 글루타민을 피로글루탐산으로 고리화하는 것을 촉매한다.
- e) 아밀로이드 단백질들 암호화하고 있는 APP 유전자에는, Aβ의 위치 3에서 Glu 대신 Gln을 나타내게 하는, 돌연변이체들이 있다. N-말단의 번역 및 프로세싱 후, QC는 글루타민이 피로글루탐산으로 고리화되는 것을 촉매한다.
- f) 글루타민은, 미지의 효소 활성화의 기능장애로 인해, APP의 신생되는 펩타이드 사슬로 포함되고, 및 후속적으로, QC는 아밀로이드 β-펩타이드 N-말단의 프로세싱 후 N-말단의 글루타민이 피로글루탐산으로 고리화되는 것을 촉매한다.

QC-활성에 N-말단 Gln을 노출시키는 것은 또한 상이한 펩티다제 활성화에 의해 개시된다. 아미노펩티다제는 Aβ<sub>1-40/41/43</sub>의 N-말단으로부터 순차적으로 Asp 및 Ala를 제거하고, 따라서 고리화하기 쉬운 아미노산 3을 벗긴다. DP I, DP II, DP IV, DP 8, DP 9 및 DP 10와 같은 디펩티딜 펩티다제들은 한번에 디펩타이드 Asp-Ala를 제거한다. 따라서, 아미노펩티다제- 또는 디펩티딜펩티다제-활성을 저해함으로써 Aβ<sub>3-40/41/43</sub> 형성을 유효하게 예방한다.

DP IV 및/또는 DP IV-유사 효소의 억제제 및 QC의 활성 저하 이펙터의 조합 효과는 하기 방식으로 설명된다:

- a) DP IV 및/또는 DP IV-유사 효소의 억제제는 Aβ<sub>1-40/42</sub>이 Aβ<sub>3-40/42</sub>로 전환되는 것을 저해한다.
- b) 이에 의해, 글루탐산의 N-말단 노출은 방지되고, 효소적이건 화학적 축매작용에 의한건, 후속적으로 피로글루탐산 형성으로 이끄는, 글루타민으로의 전환이 없게 되는 것이 가능하다.
- c) QC의 억제제들은 또한, 임의의 잔류된 변형 Aβ<sub>3-40/42</sub> 분자 및 APP 유전자의 돌연변이에 의해 형성되는 그러한 변형된 Aβ<sub>3-40/42</sub> 분자로부터 피로글루탐산이 형성되는 것을 방지한다.

본 발명 내에서, DP IV 또는 DP IV-유사 효소 및 QC의 유사한 조합된 작용은 글루카곤, CC 케모카인 및 서브스탄스 P와 같은 펩타이드 호르몬류에 대해 증명되었다.

글루카곤은 체장 섬 알파 세포로부터 분비되는 29-아미노산 폴리펩타이드로서 간의 글리코젠 분해반응 및 포도당 신생반응(gluconeogenesis)을 자극함으로써 양호한 혈당(euglycemia)을 유지하는 작용을 한다. 그 중요성에도 불구하고, 체내에서 글루카곤 소거를 담당하는 기작에 대해 논란이 있다. Pospisilik 등은 분자 생성물을 동정하는 섬세한 질량 분광분석 기술을 사용하여 글루카곤의 효소 기작을 조사하였다. 글루카곤을 정제된 돼지 디펩티딜 펩티다제 IV (DP IV)와 같이 항온처리하면 글루카곤 3-29 및 글루카곤 5-29이 연속적으로 생성되었다. 사람 혈청에서, 글루카곤3-29으로 분해후 글루

카곤이 빠르게 N-말단 고리화되고, 더 이상의 DP IV-매개 가수분해가 방지되었다. 정제된 DP IV 또는 정상적인 래트 혈청으로 항온처리후 글루카곤을 생체시험한 결과 고혈당성 활성이 현저히 손실되었고, 반면, DP IV-결핍 래트 혈청에서 유사하게 항온처리하면 글루카곤 생체활성의 어떠한 손실도 나타나지 않았다. 질량 분광분석 및 생시험으로 측정된 결과 특이성 DP IV 억제제인, 이소루이실 티아졸리딘에 의해 분해가 차단되었다. 이러한 결과는 DP IV가 글루카곤의 분해 및 불활성화에 일차적으로 연루되는 효소라는 것을 밝힌다. 이러한 발견은 사람 혈장의 글루카곤 농도를 결정하는 데 중요한 의미를 내포하고 있다 (Pospisilik 등., Regul Pept 2001 Jan 12; 96 (3): 133-41).

사람 단핵구 화학주성(Chemotactic) 단백질 (MCP)-2는 자극된 골육종 세포로부터 MCP-1 및 MCP-3과 같이 생성된 케모카인으로서 분리되었다. Von Coillie 등. (Van Collie, E. 등. 1998 Biochemistry 37, 12672-12680)은 사람 고환 cDNA 라이브러리로부터 5'-말단이 연장 MCP-2 cDNA를 클론하였다. 이것은 76 잔기 MCP-2 단백질을 암호화하고 있으나, 보고된 골수-유도 MCP-2 cDNA 서열과는 코돈 46에서, Gln 대신에 Lys를 가지고 있는 것이 달랐다. 단일 뉴클레오타이드 다형성증 (SNP)에 의해 야기된 이러한 MCP-2Lys46 변이체를 MCP-2Gln46과 생물학적으로 비교하였다. 코딩 부위를 박테리아 발현 벡터 pHEN1에 삽입하고, Escherichia coli를 형질전환한 후에 세포막과 세포벽 사이의 공간 (periplasm)에서 두 가지 MCP-2 단백질 변이체를 회수하였다. 에드만 분해한 결과, NH<sub>2</sub> 말단에서 pGlu 대신 Gln 잔기가 발견되었다. rMCP-2Gln46과 rMCP-2Lys46, 및 상기 NH<sub>2</sub>-말단 환형 상응체를 단핵구성 세포상에서 갈슘 유통 및 화학주성 분석으로 시험하였다. rMCP-2Gln46 및 rMCP-2Lys46 이소폼 사이에는 생물학적 활성의 유의한 차이가 없었다. 그러나, 양쪽 MCP-2 변이체에 대하여, NH<sub>2</sub>-말단 피로글루타메이트는 화학주성에 필수적인 것으로 나타났지만 갈슘 이동에는 그렇지 않았다. 세린 프로테아제 CD26/디펩티딜 펩티다제 IV (CD26/DPP IV)에 의해 rMCP-2Lys46의 NH<sub>2</sub>-말단을 절제하면 NH<sub>2</sub>-말단 Gln-Pro 디펩타이드가 나오나, 아미노-말단 pGlu를 가진 합성 MCP-2는 영향을 받지 않고 남아있었다. CD26/DPP IV-절단 rMCP-2Lys46 (3-76)는 거의 완벽하게 화학주성 및 신호 분석 둘 다에서 불활성으로 나타났다. 이러한 관찰은 MCP-2에서 NH<sub>2</sub>-말단 pGlu가 화학주성 활성에 필수적이라는 것을 알려주지만 그러나 또한 그것은 CD26/DPP IV에 대한 분해에 대해서 단백질을 보호한다는 것을 나타낸다 (van Collie, E. 등. Biochemistry 1998 37,12672-80).

본 발명 내에서, 글루카곤3-29 (Pospisilik 등., 2001) 및 MCP-2 이소폼 (van Coillie 등., 1998)에서 결정된 N-말단 피로글루타메이트 잔기의 형성은 QC에 의해 촉매된다는 것이 LC/MS-분석으로 밝혀졌다.

또한, 서브스탄스 P로부터 두 개의 이 펩타이드 Lys-Pro 및 Arg-Pro를 N-말단 DP IV 촉매작용으로 제거된 후, 잔류된 [Gln<sup>5</sup>]서브스탄스 P5-11는 QC에 의해 [pGlu<sup>5</sup>]서브스탄스P5-11로 전환된다는 것이 LC/MS-조사로 밝혀졌다.

DP IV 억제제들이 WO 99/61431에는 DP IV 억제제들이 개시되어 있다. 특히, 아미노산 잔기와 티아졸리딘 또는 피롤리딘 기, 및 이의 염, 특히 L-트레오-이소루이실 티아졸리딘, L-알로-이소루이실 티아졸리딘, L-트레오-이소루이실 피롤리딘, L-알로-이소루이실 티아졸리딘, L-알로-이소루이실 피롤리딘, 및 이의 염을 포함하는 DP IV 억제제들이 개시되어 있다.

저분자량 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제의 예는 테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복시아미드 유도체류, N-치환 2-시아노피롤리딘류와 -피롤리딘류, N-(N'-치환 글리실)-2-시아노피롤리딘류, N-(치환 글리실)-티아졸리딘류, N-(치환 글리실)-4-시아노티아졸리딘류, 아미노-아실-보로노-프롤릴-억제체류, 시클로프로필-융합 피롤리딘류 및 이중고리 화합물과 같은 제제이다. 디펩티딜 펩티다제 IV의 억제제들이 US 6,380, 398, US 6,011, 155; US 6,107, 317; US 6, 110,949; US 6,124, 305; US 6,172, 081; WO 95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 198 34 591, WO 97/40832, DE 196 16 486 C 2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501, WO 99/46272, WO 99/38501, WO 01/68603, WO 01/40180, WO 01/81337, WO 01/81304, WO 01/55105, WO 02/02560 및 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 및 WO 03/024965에 기재되어 있고, 이들의 교시는 전체적으로 특히 이러한 억제제들, 이들의 정의, 용도 및 이들의 생산에 관하여는 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

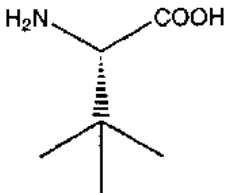
QC의 이펙터와 조합하여 사용하기 바람직한 것은 DPIV 억제제들로서, 예를 들어 Hughes 등. 1999 Biochemistry 38 11597-11603에 의해 개시된 NVP-DPP728A (1-[[[2-[[{5-시아노피롤리딘-2-일}아미노]에틸]아미노]아세틸]-2-시아노-(S)-피롤리딘) (Novartis), Hughes 등. 2002 미국 당뇨병 협회의 회합(Meeting of the American Diabetes Association 2002), Abstract no. 272 (Novartis)에서 밝혀진, LAF-237 (1-[[[3-하이드록시-아다만트-1-일 아미노]-아세틸]-피롤리딘-2 (S)-카르보닐트릴); Yamada 등. 1998 Bioorg Med Chem Lett 8,1537-1540에 개시된 TSL-225

(트립토판-1, 2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산), Asworth 등. 1996 Bioorg Med Chem Lett 6., 1163-1166 및 2745- 2748에 개시된 2-시아노피롤리다이드류 및 4-시아노피롤리다이드류, Sudre 등. 2002 Diabetes 51, 1461-1469 (Ferring)에 개시된 FE-999011, 및 WO 01/34594 (Guilford)에 개시된 화합물이고, 상기 참조문헌에 설정된 투약범위를 사용한다.

QC의 이펙터들과 조합하여 사용하기 더 바람직한 DP IV 억제제들은 아미노산이, 예를 들어, 루이신, 발린, 글루타민, 글루탐산, 프롤린, 이소루이신, 아스파라진 및 아스파르트산과 같은 천연 아미노산으로부터 선택된 디펩타이드 화합물이다. 본 발명에 따라 사용되는 디펩타이드-유사 화합물들은 10 μM의 (디펩타이드 화합물의) 농도에서, 혈장 디펩티딜 펩티다제 IV 또는 DPIV-유사 효소의 활성을 적어도 10%, 특히 적어도 40% 감소시킨다. 빈번하게, 적어도 60 % 또는 적어도 70 %의 활성 감소 또한 생체 내에서 요청된다. 바람직한 화합물은 또한 활성을 최대 20 % 또는 30 % 감소시키는 것이다.

바람직한 디펩타이드 화합물은 N-발릴 프로릴, O-벤조일 하이드록실아민, 알라닐 피롤리딘, 이소루이실 티아졸리딘 유사 L-알로-이소루이실 티아졸리딘, L-트레오-이소루이실 피롤리딘 및 이의 염류, 특히 푸마르 염류, 및 L-알로-이소루이실 피롤리딘 및 이의 염류이다. 특히 바람직한 화합물은 글루타미닐 피롤리딘 및 글루타미닐 티아졸리딘, H-Asn-피롤리딘, H-Asn-티아졸리딘, H-Asp-피롤리딘, H-Asp-티아졸리딘, H-Asp(NHOH)-피롤리딘, H-Asp(NHOH)-티아졸리딘, H-Glu-피롤리딘, H-Glu-티아졸리딘, H-Glu(NHOH)-피롤리딘, H-Glu(NHOH)-티아졸리딘, H-His-피롤리딘, H-His-티아졸리딘, H-Pro-피롤리딘, H-Pro-티아졸리딘, H-Ile-아지디딘, H-Ile-피롤리딘, H-L-알로-Ile-티아졸리딘, H-Val-피롤리딘 및 H-Val-티아졸리딘, 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 이러한 화합물들은 WO 99/61431 및 EP 1 304 327에 설명되어 있다.

본 발명은 QC 이펙터를 디펩티딜 펩티다제 IV 촉매작용의 경쟁적 조절에 유용한 기질-유사 펩타이드 화합물과 조합하여 사용하는 용도를 제공한다. 바람직한 펩타이드 화합물은 2-아미노 옥타노 산-Pro-Ile, Abu-Pro-Ile, Aib-Pro-Ile, Aze-Pro-Ile, Cha-pro-Ile, Ile-Hyp-Ile, Ile-Pro-al/o-Ile, Ile-Pro-t-butyl-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, t-부틸-Gly-Pro-D-Val, t-부틸-Gly-Pro-Gly, t-부틸-Gly-Pro-Ile, t-부틸-Gly-Pro-Ile-아미드, t-부틸-Gly-Pro-t-부틸-Gly, t-부틸-Gly-Pro-Val, Thr-Pro-Ile, Tic-Pro-Ile, Trp-Pro-Ile, Tyr (P)-Pro-Ile, Tyr-Pro-알로-Ile, Val-Pro-알로-Ile, Val-Pro-t-부틸-Gly, Val-Pro-Val 및 이의 약학적 허용염이고, 여기서 t-부틸-Gly는 하기 화학식으로 정의되고,



및 Ser(Bzl)과 Ser(P)는 벤질-세린 및 포스포릴-세린으로 각각 정의된다. Tyr(P)는 포스포릴-타이로신으로 정의된다. 이러한 화합물들은 WO 03/002593에 개시되어 있다.

QC의 이펙터와 조합하여 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 더욱 바람직한 DP IV-억제제들은 펩티딜케톤류, 즉

2-메틸카르보닐-1-N-[(L)-알라닐-(L)-발리닐]-(2S)-피롤리딘 하이드로브로마이드, 2-메틸카르보닐-1-N-[(L)-발리닐-(L)-프롤릴-(L)-발리닐]-(2S)-피롤리딘 하이드로브로마이드,

2-[(아세틸-옥시-메틸)카르보닐]-1-N-[(L)-알라닐-(L)-발리닐]-(2S)-피롤리딘 하이드로브로마이드,

2-[벤조일-옥시-메틸)카르보닐]-1-N-[(L)-알라닐-(L)-발리닐]-(2S)-피롤리딘 하이드로브로마이드,

2-[(2,6-디클로로벤질)티오메틸)카르보닐]-1-N-[(L)-알라닐-(L)-발리닐]-(2S)- 피롤리딘,

2-[벤조일-옥시-메틸)카르보닐]-1-N-[글리실-(L)-발리닐]-(2S)-피롤리딘 하이드로브로마이드,

2-[[[1,3]-티아졸에티아졸-2-일]카르보닐]-1-N-[(L)-알라닐]-[(L)-발리닐]-[(2S)-피롤리딘 트리플루오르아세테이트],

2-[(벤조티아조에티아졸-2-일)카르보닐]-1-N-[N-[(L)-알라닐]-[(L)-발리닐]-[(2S)-피롤리딘 트리플루오르아세테이트],

2-[(벤조티아조에티아졸-2-일)카르보닐]-1-N-[(L)-알라닐]-글리실]-[(2S)-피롤리딘 트리플루오르아세테이트],

2-[(피리딘-2-일)카르보닐]-1-N-[N-[(L)-알라닐]-[(L)-발리닐]-[(2S)-피롤리딘 트리플루오르아세테이트]

및 이의 다른 약제학적 허용염이다. 이러한 화합물들은 WO 03/033524에 개시되어 있다.

또한, 본 발명에 따라서, 치환된 아미노케톤류가 QC의 이펙터와 조합하여 사용될 수 있다. 바람직한 치환된 아미노케톤류는

1-시클로펜틸-3-메틸-1-옥소-2-펜타나미늄 클로라이드,

1-시클로펜틸-3-메틸-1-옥소-2-부타나미늄 클로라이드,

1-시클로펜틸-3,3-디메틸-1-옥소-2-부타나미늄 클로라이드,

1-시클로헥실-3,3-디메틸-1-옥소-2-부타나미늄 클로라이드,

3-(시클로펜틸카르보닐)-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀리늄 클로라이드,

N-(2-시클로펜틸-2-옥소에틸)시클로헥사나미늄 클로라이드 및 이의 다른 약제학적 허용염이다.

프롤린-특이성 프로테아제들의 희귀군 중에서, DP IV는 원래 폴리펩타이드 사슬의 아미노-말단에서 두 번째 잔기로서 프롤린에 특이성이 있는 유일한 막-결합 효소로 생각되었다. 그러나, 다른 분자들, DP IV와 구조적으로 유사하지 않지만 상응하는 효소활성을 지니는 것들조차 확인되었다. 지금까지 확인되었던, DP IV-유사 효소들은 예를 들어, 섬유아세포 활성화 단백질 α, 디펩티딜 펩티다제 IV β, 디펩티딜 아미노펩티다제-유사 단백질, N-아세틸화 α-연결 산성 디펩티다제, 휴지성(quiescent) 세포 프롤린 디펩티다제, 디펩티딜 펩티다제 11, 아트락틴(attractin) 및 디펩티딜 펩티다제 IV 관련 단백질(DPP 8), DPL1 (DPX, DP6), DPL2 및 DPP 9로서, Sedo & Malik (Sedo 및 Malik 2001, Biochim Biophys Acta, 36506,1-10) 및 Abbott 및 Gorrell (Abbott, C. A. 및 Gorrell, M. D. 2002 In : Langner & Ansorge (ed.), Ectopeptidases. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 171-195)의 리뷰 논문에 실려있는 것들이다. 최근에, 디펩티딜 펩티다제 10 (DPP 10)의 클로닝과 특성화가 발표되었다 (Qi, S. Y. 등., Biochemical Journal Immediate Publication. Published on 28 Mar 2003 as manuscript BJ20021914).

이펙터는, 여기서 사용되는 용어와 같이, 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 효소에 결합하여 이들의 활성을 증가시키는 분자로 정의된다. 특정 효소들은 이들의 촉매적 활성에 영향을 주는 소 분자용 결합 부위를 가지고 있다; 자극 분자는 활성체로 지칭된다. 효소들은 하나 이상의 활성체 또는 억제체를 인지하는 다중의 부위를 가질 수 있다. 효소들은 다양한 분자의 농도를 인지하고 그 정보를 사용하여 그들 자신의 활성을 변경할 수 있다.

이펙터는 효소가 활성 및 비활성 형태를 띌 수 있기 때문에 효소 활성을 조절할 수 있다: 활성체는 양성적 이펙터이고, 억제체는 음성적 이펙터이다. 이펙터는 효소의 활성 부위에서 작용할 뿐 아니라, 규제 부위 또는 알로스테릭(allosteric) 부위에 작용하며, 이 용어는 상기 규제 부위가 촉매작용 부위와 떨어진 곳에 있는 효소의 요소임을 강조하고 및 촉매작용 부위에서 이러한 형태의 규제가 기질과 억제제 간의 경쟁과는 구별되는 것으로 사용되었다 (Darnell, J., Lodish, H. 및 Baltimore, D. 1990, Molecular Cell Biology 2<sup>nd</sup> Edition, Scientific American Books, New York, 63 면). 본 발명의 펩타이드에서, 각 아미노산 잔기는 아미노산의 일반명에 상응하게, 일문자 기호 또는 세문자 기호로 하기 목록과 같이 나타낸다:

아미노산	일문자 기호	세문자 기호
------	--------	--------

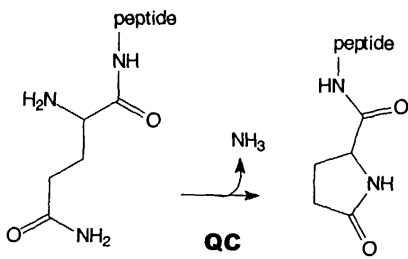
알라닌	A	Ala
아르기닌	R	Arg
아스파라긴	N	Asn
아스파르트산	D	Asp
시스테인	C	Cys
글루타민	Q	Gln
글루탐산	E	Glu
글리신	G	Gly
히스티딘	H	His
이소류이신	I	Ile
류이신	L	Leu
리신	K	Lys
메티오닌	M	Met
페닐알라닌	F	Phe
프롤린	P	Pro
세린	S	Ser
트레오닌	T	Thr
트립토판	W	Trp
타이로신	Y	Tyr
발린	V	Val

본 발명에 있어서, 용어 "QC"는 글루탐아미널 사이클라제 (QC) 및 QC-유사 효소들을 포함한다. QC 및 QC-유사 효소들은 동일하거나 또는 유사한 효소 활성, 더 정의되기는 QC 활성을 가진다. 이와 관련하여, QC-유사 효소들은 기본적으로 QC와 분자 구조가 다르다.

본 발명에 있어서, 용어 "QC 활성"은 N-말단 글루타민 잔기를 피로글루탐산 (pGlu\*)으로, 또는 N-말단 L-호모글루타민 또는 L-β-호모글루타민을 환형 피로-호모글루타민 유도체로 암모니아 방출 하에 분자 내 고리화하는 것으로 정의된다 (참조: 반응식 1 및 2).

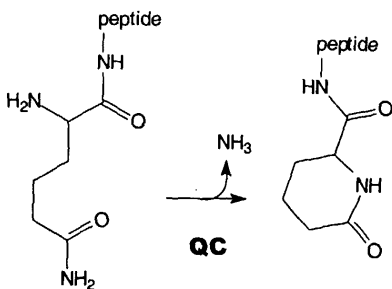
반응식 1

QC에 의한 글루타민의 고리화



반응식 2

QC에 의한 L-호모글루타민의 고리화



용어 "EC"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, QC, 및 글루타메이트 사이클라제 (EC)로서의 QC-유사 효소의 부차 활성, 더 정의되기는 EC 활성을 포함한다.

용어 "EC 활성"은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, QC에 의한 N-말단 글루타메이트 잔기의 피로글루탐산 (pGlu\*)으로의 분자내 고리화로 정의된다(참조: 반응식 3).

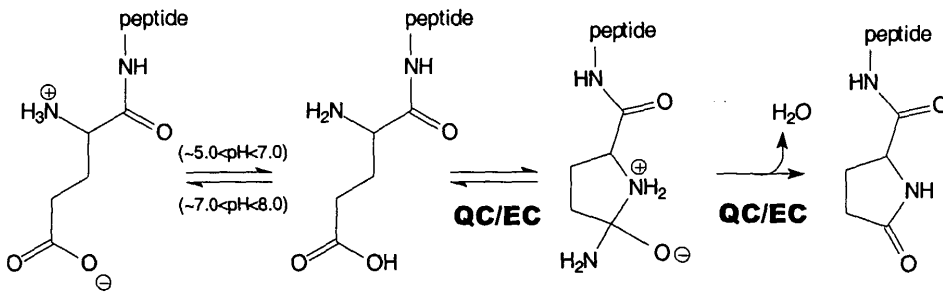
용어 "금속-의존성 효소"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 효소의 촉매 기능을 수행하기 위하여, 결합된 금속이온을 요하고 및/또는 촉매적으로 활성 구조를 형성하기 위해, 결합된 금속 이온을 요하는 효소로 정의된다.

효소와 결합하고 그들의 활성을 증가 또는 감소시키는 분자를 "이펙터"로 칭한다. 이펙터는 효소가 활성 및 비활성 형태를 띌 수 있기 때문에 효소 활성을 조절할 수 있다: 활성체는 양성적 이펙터이고; 억제체는 음성적 이펙터이다. 이펙터는 효소의 규제 부위 또는 알로스테릭("다른 하나의 형태"라는 그리스어에서 유래) 부위에 결합하며, 이 용어는 상기 규제 부위가 촉매작용 부위와 떨어진 곳에 있는 효소의 요소임을 강조하고 및 촉매작용 부위에서 이러한 형태의 규제가 기질과 억제제 간의 경쟁과는 구별되는 것으로 사용되었다.

본 발명의 개별 양태에 따라, 활성제 또는 억제제가 바람직하다.

**반응식 3**

**QC (EC)에 의해 비하전된 글루타미닐 펩타이드의 N-말단 고리화**



본 발명의 다른 관점은 QC의 신규한 생리학적 기질을 확인하는 것이다. 이들은 실시예 5에서 설명되는 바와 같이, 포유동물 펩타이드를 사용하여 고리화 실험을 실시하여 확인되었다. 먼저, 사람 QC 및 파파야 QC를 실시예 1에서 설명된 바와 같이, 분리하였다. 적용된 방법은 실시예 2에 설명되어 있고, 및 사용된 펩타이드 합성은 실시예 6에 설명되어 있다. 연구 결과를 표 1에 나타내었다.

**[표 1]**

**글루타미닐 사이클라제의 신규한 생리적 기질 (\*, MALDI-TOF 실험으로 정량)**

기질	사람 QC			파파야 QC		
	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )
[Gln <sup>1</sup> ]-가스트린	31 ± 1	54 ± 0.6	1745.2 ± 36.9	34 ± 2	25.8 ± 0.5	759 ± 30
[Gln <sup>1</sup> ]-뉴로텐신	37 ± 1	48.8 ± 0.4	1318.9 ± 24.8	40 ± 3	357.7 ± 0.9	893 ± 44
[Gln <sup>1</sup> ]-FPP	87 ± 2	69.6 ± 0.3	800.0 ± 14.9	232 ± 9	32.5 ± 0.4	140 ± 4
[Gln <sup>1</sup> ]-TRH	90 ± 4	82.8 ± 1.2	920.0 ± 27.6	n. d.	n. d.	n. d.
[Gln <sup>1</sup> ]-GnRH	53 ± 3	69.2 ± 1.1	1305.7 ± 53.2	169 ± 9	82.5 ± 1.9	488.2 ± 14.8
[Gln <sup>3</sup> ]-글루카곤 (3-29)			*			*
[Gln <sup>3</sup> ]-서브스탄스 P (5-11)			*			*

모든 분석은 실시예 4에서 나타난 사람 또는 식물 QC의 최적 활성과 안정성 범위에서 실시되었다.

N-말단 글루타민 잔기를 가지고 따라서 및 QC 효소에 대한 기질이 되는 생물학적 활성 펩타이드의 아미노산 서열이 표 2에 기재되어 있다:

**[표 2]**  
**N-말단 글루타민 잔기를 가지는 생리적 활성 펩타이드의 아미노산 서열**

펩타이드	아미노산 서열	기능
가스트린 17 Swiss-Prot:P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF(아마이드)	가스트린은 위점막을 자극하여 염산을 생성 준비하고 판크레아스를 자극하여 그것의 소화효소를 준비하게 한다. 또한 위와 장에서 평활근 수축을 자극하고 혈액 순환 및 물 분비를 증가시킨다.
뉴로텐신	QLYENKPRRP YIL	뉴로텐신은 지방 대사 조절에서 내분비 또는 방분비(paracrine) 역할을 한다. 평활근의 수축을 야기한다
FPP	QEP 아마이드	타이로트로핀 방출 호르몬 (TRH)과 관계있는 트리펩타이드는 정액에서 발견된다. 최근 FPP가 시험관내 및 생체내에서 정자 생식능력을 조절하는데 중요한 역할을 한다는 증거가 있다
TRH	QHP 아마이드	TRH는 뇌하수체 전엽 선에서 TSH의 생합성 조절자로서 및 중추 및 말초 신경계의 신경전달자/신경조절자로서 작용한다
GnRH Swiss-Prot : P01 148	QHWSYGL RP(G) 아마이드	고나도트로핀(gonadotropin)의 분비를 자극; 황체형성 호르몬 및 여포자극호르몬 둘 다의 분비를 자극한다.
CCL16 (유도성의 작은 사이토카인 A16) Swiss-Prot:015467	QPKVPEW VNTPSTCCLK YYEKVLPRRL VVGYRKALNC HLPALIFVTK RNREVCNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLSQ	임파구와 단핵구에 대해서 화학주성 활성을 보이거나 호중구에 대해서는 그렇지 않음. 또한 강력한 골수억제(myelosuppressive) 활성을 보임, 골수모세포의 증식 억제. 재조합 SCYA16는 단핵구 및 THP-1 단핵구에 대해 화학주성 활성을 보이거나 휴지 임파구 및 호중구에 대해서는 그렇지 않다. RANTES로 미리 발현시켜 탈감작된 THP-1 세포에서 칼슘 유동을 유도
CCL8 (유도성의 작은 사이토카인 A8) Swiss-Prot: P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPK RWRDMSMKHL DQIFQNLKP	임파구, 호염기구 및 호산구를 유인하는 화학주성 인자. 신생물 형성 및 염증성 숙주 반응에 역할 담당. 이 단백질은 헤파린과 결합할 수 있다
CCL2 (유도성의 작은 사이토카인 A2) Swiss-Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIK AKEICADPKQ KWWQDSMDHL DKQTQTPKT	단핵구 및 호염기구를 유인하는 호중구 또는 호산구는 그렇지 않은 화학주성 인자. 단핵구 항종양 활성을 증가. 건선, 류마티스 관절염 또는 아테롬성 동맥경화증같은 단핵구성 침윤으로 특징되는 질병의 병리에 연루됨. 아테롬성 동맥경화증의 질병 진행중에 단핵구를 동맥 벽에 끌어다 놓는데 역할 가능성. CCR2 및 CCR4과 결합.
CCL18 유도성의 작은 사이토카인(A18) Swiss-Prot : P55774	QVGTNKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	임파구를 유인하지만 단핵구나 과립구는 그렇지 않은 화학주성 인자. 림프절에서 B 세포가 B 세포 낭으로 이동하는 데 연루 가능성. 림프절에서, 순전한 T 임파구를 수지상 세포 및 활성화된 대식세포 쪽으로 유인하고, 순전한 T 세포, CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대해서 화학주성 활성을 가지고 따라서 체액성 및 세포-매개성 면역 반응에서 역할한다.
	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASCGK RAIILETRQH RLFADPKAQ WVKDAMQHLDRQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRITPAAGG MDESWLEPE ATGESSLEP TPSSQEAQRA LGTSPELPTG VTGSSGTRLP PTPKAQDGGP VGTFLFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWVQ GQSPRPENSL	

	EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMHVSVVP VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLITP VPDQAATR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCPR KMAGEMA EGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	
CCL7 (유도성의 작은 사이토 카인A7) Swiss-Prot : P80098	QPVGIN TSTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KVVQDFMKHL DKKTQTPKL	단핵구 및 호염기구를 유인하지만 호중구는 그렇지 않은 화학주성 인자. 단핵구 항 종양 활성을 증가. 또한 젤라티나제 B의 방출을 유도. 이 단백질은 헤파린과 결합가능. CCR1, CCR2 및 CCR3와 결합.
Orexin A (Hypocretin-1) Swiss-Prot 043612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGI LTL	대개는 이러한 상보적 항상성 기능의 복잡한 거동적 및 생리적 반응을 조화롭게 함으로써 음식 섭취 및 수면-각성 상태를 조절하는데 중요한 역할을 하는 신경펩타이드. 그것은 또한 에너지 대사, 자율신경 기능, 호르몬 균형, 및 체액 조절에서 또한 역할을 수행한다. 에너지 대사, 자율신경 기능, 호르몬 균형 및 체액 조절에서 광범위한 역할을 담당. 오렉신-A 높은 친화력으로 OX1R 및 OX2R 둘 다와 결합한다.
서브스탄스 P	RPK PQQFFGLM	타치키닌의 종류. 타치키닌은 뉴런을 흥분시키고, 거동 반응을 일깨우는 활성 펩타이드로서 강력한 혈관 확장제 및 인슐린분비 촉진제(secretagogues)이고 많은 평활근을 (직접 또는 간접적으로) 수축시킨다.

네 번째 양태에서, 펩타이드 [Gln<sup>1</sup>]가스트린 (17 및 34 아미노산 길이), [Gln<sup>1</sup>] 뉴로텐신 및 [Gln<sup>1</sup>] FPP는 QC의 새로운 생리학적 기질로 확인되었다. 가스트린, 뉴로텐신 및 FPP는 그것들의 N-말단 위치에서 pGlu 잔기를 포함한다. 이러한 N-말단 pGlu 잔기는 모든 펩타이드에 대하여 QC 촉매작용에 의해 N-말단 글루타민으로부터 형성되는 것으로 나타났다. 그 결과, 이러한 펩타이드들은 N-말단 글루타민 잔기를 pGlu로 전환시 생물학적 기능면에서 활성화된다.

경상피성 변환(trans epithelial transducing) 세포, 특히 가스트린 (G) 세포는 위장에서 음식물에 도착과 위산 분비를 맞춘다. 최근의 연구에 따르면 복수의 활성 생성물은 가스트린 전구체로부터 생성되고, 및 가스트린 생합성에 복수의 조절 포인트들이 있다는 것이 밝혀졌다. 생합성 전구체 및 중간체(프로가스트린 및 Gly-가스트린)들은 추정되는 성장 인자들이다; 그것들의 생성물들, 즉 아미드화된 가스트린들은 상피성 세포 증식, 산-생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 (ECL) 세포의 분화, 및 ECL 세포에서 히스타민 합성 및 저장과 관련있는 유전자의 발현을 조절하는 것은 물론, 급성으로 산 분비를 자극한다. 가스트린은 또한 표피성장인자(EGF) 족의 구성원의 생성을 자극하며, 이는 그 다음으로 세포 기능을 저해하지만 표면 상피 세포의 성장을 자극한다. 십이지장 궤양 및 위암의 위험이 커지는 것으로 알려진, 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)에 감염된 사람은 높은 혈장 가스트린 농도를 가진다 (Dockray, G. J. 1999 J Physiol 15 315-324).

공동(antral) G 세포에서 방출되는, 펩타이드 호르몬 가스트린은 산분비(oxynitic) 점막에서 CCK-2 ECL 세포로부터 수용체를 통한 히스타민 합성 및 방출을 자극하는 것으로 알려져 있다. 이동된 히스타민은 체강벽 세포 사에 위치하는 H(2) 수용체에 결합함으로써 산 분비를 유도한다. 최근의 연구는, 가스트린은, 그것의 완전히 아미드화된 형태 및 덜 처리된 형태(프로가스트린 및 글리신-연장 가스트린) 둘 다의 형태에서, 또한 위장계에 대한 성장인자라는 것을 제시하고 있다. 아미드화된 가스트린의 주요 영양성 타겟은 위장의 산분비 점막을 위한 것이고, 여기서 그것은 위장 줄기 세포 및 ECL 세포의 증식 증가를 야기하여, 체강벽 및 ECL 세포 질량을 증가시키는 결과를 낳는다는 것이 확립되어 있다. 한편으로, 상기 덜 처리된 가스트린 (예를 들어, 글리신-연장 가스트린)의 주요 영양성 타겟은 결장 점막으로 보인다 (Koh, T. J. 및 Chen, D. 2000 Regul Pept 9337-44).

다섯 번째 양태에서, 본 발명은 QC의 활성 증가 이펙터를 위장관계 세포 증식, 특히 위장 점막 세포 증식, 상피 세포 증식을 자극시키는데, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 (ECL) 세포를 분화시키는데, 및 ECL 세포에서의 히스타민 합성 및 저장과 연관된 유전자를 발현시키는데는 물론 활성 [pGlu<sup>1</sup>]-가스트린의 농도를 유지 또는 증가시킴으로써 급성 산 분비를 자극하는데 사용하는 용도를 제공한다.

여섯 번째 양태에서, 본 발명은 활성 [pGlu<sup>1</sup>]가스트린으로의 비활성 [Gln<sup>1</sup>]가스트린의 전환율을 감소시킴으로써 포유동물에서 헬리코박터 과일로리 감염에 의한 또는 무관한 십이지장 궤양 질환 및 위암을 치료하는데 QC의 활성 감소 이펙터를 사용하는 용도를 제공한다.

뉴로텐신(NT)은 정신분열증의 병리생리학에 관여되는 신경펩타이드로서, 이전에 이러한 질환에 오조절된 것으로 나타난 신경전달 시스템을 특이적으로 조절하는 것이다. 뇌척수액 (CSF) NT 농도를 측정하는 임상 연구에 따라 일련의 정신분열증 환자의 감소된 CSF NT 농도가 항정신병 약물 치료에 의해 복구된다는 것이 밝혀졌다. 항정신병 약물의 작용 기작에 NT 시스템이 연루되는 것과 일치하는, 상당한 증거가 또한 존재한다. 척추로 투여된 NT의 거동 및 생화학적 효과는 전신적으로 투여된 항정신병 약물의 그것과 현저히 유사하고, 항정신병 약물은 NT 신경전달을 증가시킨다. 이러한 일련의 발견은 NT가 내인성 항정신병제로서 기능하고 있다는 가정에 이르게 되었다. 더욱이, 전형적인 그리고 비전형적인 항정신병 약물은 흑질선조체 및 중뇌변연계 도파민 말단 부위에서 NT 신경전달을 다르게 변경시키고, 이러한 효과들은 부작용 장애 및 효능을 각각 예측할 수 있다 (Binder, E. B. 등. 2001 Biol Psychiatry 50 856-872).

일곱 번째 양태에서, 본 발명은 항정신병 약물의 제조 및/또는 포유동물의 정신분열증 치료에 QC의 활성 증가 이펙터의 용도를 제공한다. QC의 이펙터는 활성 [pGlu<sup>1</sup>] 뉴로텐신의 농도를 유지 또는 증가시킨다.

임신 촉진 펩타이드 (FPP), 즉, 타이로트로핀 방출 호르몬 (TRH)과 연관된 트리펩타이드는 생식 림프장에서 발견된다. 시험관 및 생체내에서 얻은 최근의 증거에 따르면, FPP는 정자 수정능력을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 특히, FPP는 처음에는 비수정능 (무생식능) 정자를 자극하여 "작동 개시 (switch on)"로 되게 하고 더 빠르게 수정능력이 있게 하지만, 그러나 그 다음으로는 생식능을 억류하여서 정자가 자연적인 침체 (acrosome) 손실을 당하지 않게 되고 그러므로 생식 잠재 능력을 잃지 않는다. 이러한 반응들은 아데닐릴 사이클라제 (AC)/cAMP 신호 전달 경로를 조절하는 것으로 알려진, 아데노신에 의해 흥내내어지고 실제로는 증대된다. FPP 및 아데노신 모두 무생식능 세포에서 cAMP 생성을 자극하나 생식능 세포에서는 그것을 저해하는 것으로 나타나고, FPP 수용체는 아데노신 수용체 및 G 단백질과 어느정도 상호작용하여 AC의 조절을 이룬다. 이러한 사건들은 일부가 시초의 "작동 개시"에 중요하고 다른 일부는 침체 (acrosome) 반응 자체에 연계되어 있는 다양한 단백질의 타이로신 인산화 상태에 영향을 끼친다. 칼시토닌 및 안지오텐신 II, 또한 생식 임파액에서 발견되는 것으로서, 무생식능 정자에 대해 시험관적으로 유사한 효과를 가지며 및 FPP에 대한 반응을 확대할 수 있다. 이러한 분자들은 생체내에서 유사한 효과를 가지며, 생식 잠재능력을 자극하고 유지함으로써 생식능에 영향을 끼친다. FPP, 아데노신, 칼시토닌, 및 안지오텐신 II의 이용가능성에서의 감소 또는 이들의 수용체의 결합은 남성 불임증을 유발한다 (Fraser, L. R. 및 Adeoya-Osiguwa, S. A. 2001 Vitam Horm 63, 1-28).

여덟 번째 양태에서, 본 발명은 피임 약물의 제조 및/또는 포유동물의 수정능력을 감소시키는데, QC의 활성 저하 이펙터를 사용하는 용도를 제공한다. QC의 활성 저하 이펙터는 활성 [pGlu<sup>1</sup>] FPP의 농도를 감소시키고, 정자 생식능을 방지하고 및 정자 세포의 불활성화를 가져온다, 반대로, QC의 활성 증가 이펙터들은 남성 생식능을 자극하고 불임증을 치료할 수 있다는 것이 나타나진다.

아홉 번째 양태에서, QC의 생리학적 기질이 또한 본 발명 내에서 확인된다. 이러한 것들은 [Gln<sup>1</sup>]CCL2, [Gln<sup>1</sup>]CCL7, [Gln<sup>1</sup>]CCL8, [Gln<sup>1</sup>]CCL16, [Gln<sup>1</sup>]CCL18 및 [Gln<sup>1</sup>]프랙탈킨이다(표 2 참조). 이러한 폴리펩타이드들은 골수성 모세포 증식의 억제, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포성 면역 반응, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정과 같은 병리생리학적 조건에서 중요한 역할을 한다.

B형 간염, 사람 면역결핍 바이러스 및 흑색종에 대한, 몇몇의 세포독성 T 임파구 펩타이드에 기초한 백신이 최근 임상시험에서 연구되었다. 단독으로 또는 다른 종양 항원과 조합하여, 하나의 흥미로운 흑색종 백신 후보로 되는 것은 데카펩타이드 ELA이다. 이러한 펩타이드는 N-말단 글루탐산을 가진 Melan-A/MART-1 항원 면역 발현 (immunodominant) 펩타이드 유사체이다. 글루탐산의 아미노기 및 감마-카르복실기는 물론 글루탐산의 아미노기 및 감마-카르복시아미드기는 쉽게 축합되어 피로글루탐 유도체를 형성한다는 것이 보고되었다. 이러한 안정성 문제를 극복하기 위해, 약학적으로 관심있는 몇몇 펩타이드들이, 약학적 특성 손실없이, N-말단 글루탐산 또는 글루탐산 대신 피로글루탐산을 가지는 것으로 개발되었다. 불행히도 ELA와 비교할 때, 피로글루탐산 유도체 (PyrELA) 및 또한 N-말단이 아세틸화된 (acetyl-capped) 유도체 (AcELA)는 세포독성 T 임파구(CTL) 활성을 이끌어내는데 실패하였다. PyrELA 및 AcELA에 도입된 표면상 소변경에도 불구하고, 이러한 두 개의 유도체는 대개는 특이성 클래스 I 주 조직적합성 복합체(major histocompatibility

complex)에 대하여 ELA보다 낮은 친화성을 가진다. 결론적으로, ELA의 전체 활성을 보전하기 위해, PyrELA의 형성을 피해야 한다 (Beck A. 등. 2001, J Pept Res 57 (6): 528-38. ). 최근, 효소 글루타미닐 사이클라제 (QC)가 흑색종에서 과발현된다는 것이 또한 발견되었다 (Ross D. T 등., 2000, Nat Genet 24: 227-35.).

열 번째 양태에서, 본 발명은 QC의 이펙터를 골수성 모세포의 증식, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 악성 전이, 흑색 종, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정의 억제와 같은 병리생리적 상태의 치료용 의약품 제조하는데 사용하는 용도를 제공한다.

본 발명의 열한 번째 양태에서, [Gln<sup>1</sup>]오렉신(orexin) A는 QC의 생리적 기질로서 확인되었다. 오렉신 A는 음식 섭취 및 수면-각성 상태를 조절하는데 중요한 역할을 하는 신경펩타이드 (neuropeptide)로서, 대개는 이러한 상보적 항상성 기능의 복잡한 거동적 및 생리적 반응을 조화롭게 함으로써 기능한다. 그것은 또한 에너지 대사, 자율신경 기능, 호르몬 균형, 및 체액 조절에서 또한 역할을 수행한다.

열두 번째 양태에서, 본 발명은 QC의 이펙터를 음식 섭취 장애 및 수면-각성상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애를 치료하는 의약품 제조에 사용하는 용도를 제공한다.

몇몇의 단백질에서 폴리글루타민이 확장되면 파킨슨병 및 케네디병(Kennedy's disease)과 같은 신경퇴행성 질환으로 나타난다. 따라서, 그 기작은 대부분 미지로 남아있다. 폴리글루타민 반복체들의 생화학적 특성에 한가지 가능성 있는 설명이 제시된다: 글루타미닐-글루타미닐 결합에서의 내부절단 후 피로글루타메이트 형성은, 폴리글루타미닐 단백질의 이화적 안정성, 소수성, 아밀로이드 생성도 및 신경독성 확대를 통한 발병에 기여할 수 있다(Saido, T; Med Hypotheses (2000) Mar; 54 (3): 427-9). 열세 번째 양태에서, 본 발명은 따라서, 파킨슨 병 및 헌팅톤 병의 치료용 의약품 제조에 사용하는 QC 이펙터의 용도를 제공한다.

열네 번째 양태에서, 본 발명은 QC의 효소적 활성을 감소시키거나 또는 저해하는 일반적인 방법을 제공한다. 저해 화합물의 예가 또한 제공된다.

포유동물 QC의 억제작용은 처음에는 1,10-페난트롤린(phenanthroline) 및 환원된 6-메틸프테린에 대하여만 검출되었다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536). EDTA는 QC를 저해하지 않고, 따라서, QC는 금속-의존성 효소가 아니라는 결론에 이른다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262,8532-8536, Bateman, R. C. J. 등. 2001 Biochemistry 40, 11246-11250, Booth, R. E. 등. 2004 BMC Biology 2). 하지만 본 발명에서는 1,10-페난트롤린, 디피콜린산, 8-하이드록시-퀴놀린 및 다른 킬레이터들에 의한 QC의 저해 특성 (도 18, 19) 및 전이 금속 이온에 의한 QC의 재활성화(도 20)에 의해 드러난 바와 같이, 사람 QC 및 다른 동물 QC들은 금속-의존성 효소임이 밝혀졌다. 마지막으로, 상기 금속 의존성은 사람 QC에도 킬레이팅 아미노산 잔기가 보전되어 있다는 것을 보이는, 다른 금속-의존성 효소와의 서열 비교에 의해 나타난다 (도 21). 화합물과 활성-부위 결합 금속 이온과의 상호작용은 QC 활성을 감소하거나 또는 저해하는 일반적 방법을 제시하고 있다. 본 발명에서, 이미다졸 유도체가 QC의 강력한 억제제임이 나타난다. 연속 분석법을 사용하여 (자세한 것은 실시예 2 참조), 많은 이미다졸 유도체를 고도로 보전된 포유동물 QC들의 일원으로서 사람 QC를 저해하는 능력에 대하여 분석하였다.

따라서, 본 발명은 이미다졸 유도체 및 히스티딘과 이의 유도체를 저해 유형 및 잠재성 면에서 QC의 활성 저하 이펙터 및 이의 특성으로서 제공한다. 구조 및 K<sub>i</sub>-값이 표 3과 4에 도시되어 있다. 결과는 실시예 7에 상세히 기재하였다.

**[표 3]**

사람 QC 촉매 반응에서의 이미다졸 유도체의 억제 상수. 30 °C에서, 5 mM EDTA을 함유한 0.05 M Tris-HCl pH 8.0에서 결정.

화합물	K <sub>i</sub> -값(mM)	구조
<b>중심 구조체</b>		
이미다졸	0.103±0.004	
<b>벤즈이미다졸</b>	0.138±0.005	
N-1 유도체류		
1-벤질이미다졸	0.0071±0.0003	
1-메틸이미다졸	0.030±0.001	

1-비닐이미다졸	0.049±0.002	
옥살산 디이미다졸리다이드	0.078±0.002	
N-아세틸이미다졸	0.107±0.003	
N-(트리메틸실릴)-이미다졸	0.167±0.007	
N-벤조일이미다졸	0.174±0.007	
1-(2-옥소-2-페닐-에틸)-이미다졸	0.184±0.005	
1-(3-아미노프로필)-이미다졸	0.41± 0.01	
1-페닐이미다졸	억제없음	
1,1'-설포닐디이미다졸	억제없음	

**C-4(5) 유도체류**

N-오메가-아세틸히스타민	0.017±0.001	
L-히스티딘아미드	0.56±0.04	
H-His-Trp-OH	0.60±0.03	
L-히스티디놀	1.53±0.12	
L-히스티딘	4.4±0.2	
4-이미다졸-카르복스 알데히드	7.6±0.7	
이미다졸-4-카르보산	14.5±0.6	
메틸 에스테르 L-히스타민	0.85±0.04	

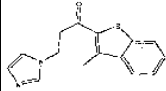
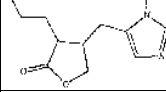
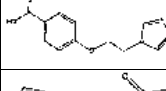
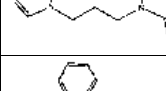
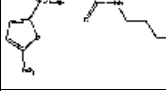
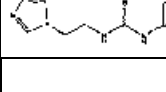
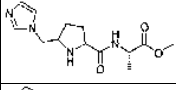
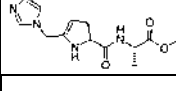
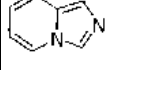
**C-4,5 유도체류**

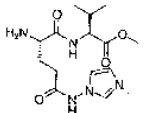
5-하이드록시메틸-4-메틸-이미다졸	0.129±0.005	
4-아미노-이미다졸-5-카르보 산 아미드	15.5±0.5	
4,5-디페닐-이미다졸	억제없음	
4,5-디시아노이미다졸	억제없음	

**C-2 유도체류**

2-메틸-벤질이미다졸	0.165±0.004	
2-에틸-4-메틸-이미다졸	0.58±0.04	
2-아미노벤즈이미다졸	1.8±0.1	
2-클로로-1H-벤즈이미다졸	억제없음	


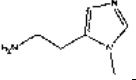
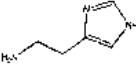
**기타**

3-(1H-이미다졸-1-일)-1-(3-메틸벤조[b]티오펜-2-일)프로판-1-온	0.0025±0.0001	
4-[(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)메틸]-3-프로필디하이드로퓨란-2-(3H)-온	0.0067±0.0003	
4-[2-(1H-이미다졸-1-일)-에톡시]벤조산	0.0034±0.0001	
3-[3-(1H-이미다졸-1-일)프로필]-2-티옥소이미다졸리딘-4-온	0.00041±0.00001	
5-니트로-2-[2-({3-(1H-이미다졸-1-일-)프로필}아미노)카르보닐]페닐]푸라미드	0.0066±0.0004	
N-(4-클로로페닐)-N'-[2-(1H-이미다졸-1-일)에틸]티오우레아	0.00165±0.00007	
	0.0322±0.0007	
	n. d.	
이미다조<1.5a>피리딘	0.0356±0.0005	

메틸 (2S)-2-[[ (2S)-2-아미노-5-(1H-이미다졸-1-yl)아미노]-5-옥소펜타노일]아미노}-3-메틸부타노에이트	$0.164 \pm 0.004$	
---	-------------------	---

**[표 4]**

L-히스타민 및 이의 두 가지 생물학적 대사물(텔레-메틸히스타민으로 알려진)에 의한 QC 억제

화합물	K <sub>i</sub> 값(mM)	구조
L-히스타민	0.85 ± 0.04	
3-메틸-4-(α-아미노에틸)-이미다졸	0.120 ± 0.004	
1-메틸-4-(α-아미노에틸)-이미다졸	n. i.	

놀랍게도, 효소 활성을 특성화하는 동안, N-말단 글루타미닐 잔기 외에, N-말단 β-호모-글루타미닐 잔기 또한 식물 및 동물 출처의 QC들에 대한 기질로서 특성을 수행하는 것이 발견되었다. N-말단 β-호모-글루타미닐 잔기는 각각 사람 및 파파야 QC의 촉매작용에 의해 5원자 락탐 고리로 전환되었다. 결과를 실시예 5에 기재하였다. 적용된 방법은 실시예 2에 나타내었으며 펩타이드 합성은 실시예 6에 설명된 바와 같이 수행되었다.

본 발명의 다른 바람직한 양태는 QC의 이펙터를 스크리닝하는 방법을 포함한다.

일군의 화합물로부터 QC의 활성 변경 이펙터를 확인하는 바람직한 스크리닝 방법은

- a) 임의의 화합물들과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 선택적으로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 활성 변경 이펙터를 확인하는 단계를 포함한다.

다른 바람직한 스크리닝 방법은 QC의 활성-부위 결합 이온과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 이펙터의 확인 및 선택 방법에 관한 것이고:

- a) 임의의 화합물과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC에 의해 전환되는 QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 선택적으로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 변화가 활성 변경 이펙터를 확인하는 데 사용되는 단계를 포함한다.

전술한 스크리닝 방법에 바람직한 것은 포유동물 QC 또는 파파야 QC이다. 특히, 바람직한 것은 포유동물 QC이고, 이러한 스크리닝 방법에 의해 확인된 이펙터는 포유동물 특히 사람의 질병 치료에 사용될 것이기 때문이다.

전술한 스크리닝 방법에 의해 선택된 제제는 QC의 적어도 하나의 기질의 전환을 저하시킴으로써 (음성적 이펙터, 억제제), 또는 QC의 적어도 하나의 기질의 전환을 증가시킴으로써 (양성적 이펙터, 활성제) 작동할 수 있다.

본 발명의 화합물은 산부가 염, 특히 약학적 허용 산부가 염으로 전환될 수 있다.

본 발명의 화합물의 염은 무기염 또는 유기염의 형태로 있을 수 있다.

본 발명의 화합물은 산부가염, 특히 약제학적으로 허용가능한 산부가염으로 전환되고 사용될 수 있다. 약학적 허용염은 일반적으로 기본 측쇄가 무기 또는 유기산으로 양성자화된 형태를 취한다. 대표적인 유기산 또는 무기산은 염화수소산, 황화수소산, 과염소산, 황산, 질산, 인산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 만델산, 메탄술폰산, 하이드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 옥살산, 파모산(pamoic acid), 2-나프탈렌술폰산, p-톨루엔술폰산, 시클로헥산설파산, 실리실산, 사카린(saccharinic)산 또는 트리플루오로아세트산을 포함한다. 본 발명의 화합물의 모든 약학적 허용 산부가 염 형태는 본 발명의 범위 내에 포함되어 있다.

자유 화합물 및 염의 형태로 있는 화합물간의 밀접한 관계의 관점에서, 화합물이 이러한 맥락에서 언급될 때마다, 상응하는 염이 조건하에서 가능하거나 적절하다면, 또한 포함되도록 의도되는 것이다.

본 발명에 따른 화합물들이 적어도 하나의 키랄 중심을 가지고 있을 때, 이들은 거울상 이성체(enantiomer)로서 당연히 존재한다. 상기 화합물들이 둘 이상의 키랄 중심을 가지고 있을 때, 이들은 추가적으로 부분입체이성체(diastereomer)로서 존재한다. 그러한 모든 이성체 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 더욱이, 상기 화합물의 결정 형태 일부는 다형체로서 존재할 수 있고, 그러한 것은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 상기 화합물의 일부는 물에서의 용매화합물 (즉, 수화물) 또는 통상의 유기 용매를 형성할 수 있고, 그러한 용매화합물은 본 발명의 범위내에 포함되는 것으로 의도된다.

염을 포함하는 이들 화합물은 또한 수화물의 형태로 얻어질 수 있거나, 또는 이들의 결정화에 사용되는 다른 용매를 포함할 수 있다.

다른 양태에서, 본 발명은 필요한 목적물에서 QC 효소 활성의 조절에 의해 매개되는 상태를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 바, 임의의 본 발명의 화합물 또는 이의 약학 조성물을 특정 양으로 투여하고 및 상기 상태를 치료하는데 치료적으로 효과적인 섭생법으로 투약하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물, 및 이의 상응하는 약학적 허용 산부가 염 형태를 목적물에서 QC 활성의 조절에 의해 매개되는 상태를 예방 또는 치료하는 의약품의 제조에 사용하는 용도를 포함한다. 상기 화합물은 정맥내, 경구, 피하, 근육내, 피부내, 장관외 및 이의 조합경로를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 통상적인 투여 경로로 환자에 투여될 수 있다.

또한 바람직한 구현 형태에서, 본 발명은 약제학적 조성물, 즉, 본 발명의 적어도 하나의 화합물 또는 이의 염을, 선택적으로는 하나 이상의 약학적 허용 담체 및/또는 용매와 조합하여 포함하는 의약품에 관한 것이다.

약학 조성물은, 예를 들어, 장관 외 또는 장관 내 제형으로 있을 수 있고 적절한 담체를 포함할 수 있고, 또는 경구 투여에 적합한 담체를 포함하는 경구 제형으로 있을 수 있다.

본 발명에 따라서 투여되는 QC 활성의 이펙터는 억제제로서 약학적으로 투여될 수 있는 제형 또는 조제 복합물에 또는 포유동물에서 QC 단백질 농도를 낮추는 효소 단백질의 억제제, 기질, 가기질(pseudosubstrate), QC 발현의 억제제, 결합 단백질 또는 항체와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 환자와 질병에 대해 개별적으로, 특히 개인적 내성, 알레르기 및 부작용을 피하기 위해, 맞춤 치료에 사용될 수 있다.

화합물은 또한 시간의 함수로서 달라지는 활성 정도를 나타낸다. 치료하는 의사에게는 이에 따라 환자의 개별 상황에 상이하게 반응하는 기회가 주어진다: 그는 한편으로, 작용 개시 속도를, 다른 한편으로 작용 기간, 특히 작용 강도를 조정할 수 정확하게 조정할 수 있다.

본 발명에 따른 바람직한 치료 방법은 포유 동물에서 QC 효소 활성의 조절로 매개되는 상태의 예방 또는 치료에 대한 새로운 접근을 제시한다. 유리하게는, 그것은 포유동물에서 특히 사람 의약품으로, 간단하고, 상업적으로 적용될 수 있고 및, 특히 생리적 활성 QC 기질, 예를 들어, 표 1 및 2에 기재된 기질의 비균형적 농도에 기초한 질병의 치료에 사용되기에 적합한 것이다.

바람직하게는, 화합물을, 예를 들어, 상기 활성성분을 선행기술에 공지된 희석제, 부형제 및/또는 담체와 같은 통상적인 첨가제와 조합하여 포함하는 약학적 제조물의 형태로 투여할 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 장관 외로 (예를 들어 생리 식염수에 포함되어 정맥 내로) 또는 장관 내로 (예를 들어, 통상적인 담체와 제제되어, 경구적으로) 투여될 수 있다.

상기 화합물의 하나 이상의 일일 투여분이, 내생적 안정성 및 생체 이용가능성에 따라, 정상적인 혈당치를 유지하도록 제시될 수 있다. 예를 들어, 인체에서 그러한 투약 범위는 일일 약 0.01 mg 내지 250.0 mg의 범위이고, 바람직하게는 체중 킬로그램당 화합물 약 0.01 내지 100 mg의 범위이다.

QC 활성의 이펙터를 포유동물에 투여함으로써, 알츠하이머병, 다운 증후군, 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 또는 무관한 궤양 질환 및 위암, 병원성 정신질환, 정신분열증, 불임증, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로부터 선택된 상태를 예방 또는 완화시키거나 또는 치료할 수 있다.

또한, QC 활성의 이펙터를 포유동물에 투여함으로써, 위장관계 세포 증식, 바람직하게는 위장 점막 세포, 상피 세포의 증식, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 세포의 급성 산 분비 및 분화를 자극하는 것이 가능할 수 있다.

또한, QC 억제제를 포유 동물에 투여하면 정자 세포 기능의 손실에 이르게 되고, 따라서 남성 생식능을 억제한다. 따라서, 본 발명은 남성 생식능을 규제 및 조절하는 방법 및 QC의 활성 저하 이펙터를 남성 피임약으로 제조하는 용도를 제공한다.

QC 활성의 이펙터를 포유동물에 투여함으로써, 골수성 모세포의 증식을 억제하는 것이 가능할 수 있다.

본 발명에 따라 사용된 화합물은 따라서 원래 공지된 방식으로, 불활성, 비독성, 약학적 적합 담체, 및 첨가제 또는 용제를 사용하여, 예를 들어, 정제, 캡슐, 당의정, 알약, 좌약, 과립, 에어로솔, 시럽, 액상, 고상 및 크림 형 유탕액 및 현탁액 및 용액과 같은 통상적인 제형으로 전환될 수 있다. 이러한 각 제형에서, 치료적으로 유효한 화합물은 바람직하게는 전체 혼합물의 약 0.1 내지 80 중량 %, 더 바람직하게는 1 내지 50 중량 %로, 즉 얻고자하는 전술한 투약 수준에 충분한 양으로 있다.

상기 기질들은 당의정, 캡슐, 이중 캡슐, 정제, 점적액, 시럽등의 형태의 약품으로, 또는 또한 좌약으로 또는 비강 분무제로서 사용될 수 있다.

상기 제형들은 바람직하게는, 예를 들어, 활성 성분을 용제 및/또는 담체로 증량함으로써 제조할 수 있는데, 가능하다면, 예를 들어, 물이 희석제로서 사용되는 경우, 선택적으로 유화제 및/또는 분산제를 보조 용제로서 선택적으로 사용될 유기 용제에 대해 사용할 수 있다.

본 발명과 관련하여 유용한 부형제의 예는: 물; 과라핀류 (예를 들어 천연 오일 분), 식물성 기름 (예를 들어 평지씨유, 땅속 열매 기름, 참기름), 알콜류 (예를 들어 에틸 알콜, 글리세롤), 글리콜류 (예를 들어 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜)와 같은 비독성 유기용제; 예를 들어, 천연 분말 광물 (예를 들어 고도로 분산된 실리카, 실리케이트)와 같은 고형 담체; 당류 (예를 들어 원당, 락토즈 및 텍스트로즈); 비이온성 및 음이온성 유화제류 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 알킬설포네이트류 및 아릴설포네이트류)와 같은 유화제류; 분산제류 (예를 들어 리그닌, 셀파이트 액, 메틸셀룰로즈, 전분 및 폴리비닐피롤리돈); 윤활제 (예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 스테아르산 및 소듐 라우릴 설페이트) 및 선택적으로 향료제를 포함한다.

제형의 투여는 일상적인 방식, 바람직하게는 장관내 또는 장관외, 특히 경구적으로 실행될 수 있다. 장관내 투여의 경우, 정제들은 전술한 담체외에 소듐 사이트레이트, 칼슘 카보네이트 및 칼슘 포스페이트와 같은 첨가제를, 바람직하게는 감자 전분, 젤라틴등과 같은 다양한 첨가제와 함께 더 포함할 수 있다. 더욱이, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 라우릴 설페이트 및 탈크와 같은 윤활제는 타정시 함께 사용할 수 있다. 경구 투여용 수성 현탁액 및/또는 엘릭서이 경우, 다양한 향미 중화제 또는 착색제가 전술한 부형제에 더하여 활성성분에 첨가될 수 있다.

장관의 투여의 경우, 적절한 액상 담체를 사용하는 활성 성분의 용액을 사용할 수 있다. 일반적으로, 정맥내 투여의 경우, 효과적인 결과를 얻기 위해서는, 체중 kg당, 일일 약 0.01 내지 2.0 mg, 바람직하게는 약 0.01 내지 1.0 mg을 투여하고, 장관내 투여의 경우 투여량은 체중 kg당 일일 약 0.01 내지 2 mg, 바람직하게는 약 0.01 내지 1 mg인 것이 유리하다.

하지만 특정의 경우 실험 동물 또는 환자의 체중에 따라 또는 투여 경로의 유형에 따라, 그리고, 동물의 종류 및 약에 대한 개인적 반응, 또는 투여되는 간격에 근거하여, 전술한 것과 다른 투여량이 필요할 수 있다. 따라서, 어떤 경우는 전술한 최소양보다 더 적은 양을 사용하는 것이 충분할 수 있는 반면, 다른 경우는 전술한 상한치가 연장되어야만 된다. 상대적으로 많은 양이 투여되는 경우, 이러한 양을 하루동안 단일 투약분으로 나누는 것이 바람직하다. 사람 의약품으로 투여시, 상기 동일한 투약 범위가 주어진다. 이 경우 전술한 것이 유사하게 적용된다.

### 약제학적 제형에

1. 본 발명의 화합물을 개당 100 mg 함유하는 캡슐:

약 10,000개 캡슐용으로, 하기 조성물의 용액을 제조하였다:

본 발명의 화합물 1.0 kg

글리세롤 0.5 kg

폴리에틸렌 글리콜 3.0 kg

물 0.5 kg

5.0 kg

상기 용액을 공지된 방법으로 연질 젤라틴 캡슐로 넣었다. 상기 캡슐은 씹기 또는 넘기기 적합하다.

2. 본 발명의 화합물을 100 mg 포함하는 정제 또는 코팅된 정제 또는 당의정:

하기 양으로 100,000 정제를 제조하였다:

본 발명의 화합물

미세분말 10.0 kg

글루코스 4.35 kg

락토스 4.35 kg

전분 4.50 kg

셀룰로즈, 미세분말 4.50 kg

상기 구성성분들을 혼합한 후 하기 성분으로부터 제조된 용액을 첨가하였다

폴리비닐피롤리돈 2.0 kg

폴리소르베이트 0.1 kg

물 약. 5.0 kg

그리고 습기있는 질량체를 갖고 마그네슘 스테아레이트 0.2 kg 첨가후, 건조시키는 공지된 방법으로 과립화하였다. 완료된 정제 혼합물 30.0 kg을 가공하여 300 mg 무게의 볼록한 정제로 형성한다. 이상적으로는, 정제에 공지된 코팅물을 또는 당의를 입힌다.

본 발명에 따른 억제학적 조성물은 QC 활성의 적어도 하나의 이펙터 및 적어도 하나의 DP IV 억제제의 조합물을 포함한다. 그러한 약학 조성물 특히 알츠하이머병 및 다운 증후군 치료에 유용하다.

실시에 1 : 사람 및 파파야 QC의 제조

#### 숙주 균주 및 배지

사람 QC의 발현에 사용되는, 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 균주 X33 (AOX1, AOX2)를 제조사 (Invitrogen) 설명서에 따라, 배양하고, 형질전환하고 및 분석하였다. *P. pastoris*에 필요한 배지, 즉 완충 글리세롤 (BMGY) 복합 또는 메탄올 (BMMY) 복합배지(complex media), 및 발효 기본 염 배지를 제조사 추천에 따라 제조하였다.

#### 사람 QC를 암호화하는 플라즈미드 벡터의 분자 클로닝

기본 분자 생물학 기술을 적용하여 모든 클로닝 과정을 행하였다. 효모에서의 발현에는 벡터 pPICZaB (Invitrogen)를 사용하였다. pQE-31 벡터 (Qiagen)를 사용하여 *E. coli*에서 사람 QC를 발현시켰다. 코돈 38로 시작하는 성숙한 QC의 cDNA를 6x히스티딘 태그를 암호화하고 있는 플라즈미드로 프레임 내에 융합하였다. 프라이머 pQCyc-1 및 pQCyc-2 (표 1)을 사용하여 증폭하고 및 서브클로닝한 후, 단편물을 SphI 및 HindIII의 제한 부위를 사용하는 발현벡터로 삽입하였다.

#### *P. pastoris*의 형질전환 및 소규모 발현

플라즈미드 DNA를 *E. coli* JM109에서 증폭시키고 제조사(Qiagen사)의 추천사항에 따라 정제하였다. 사용된 발현 플라즈미드 pPICZaB에는, 절단용으로 세 개의 제한 부위가 제공되어 있다. QC cDNA 내에서 SacI 및 BstXI이 절단되므로, PmeI이 절단에 선택되었다. 20 내지 30 µg 플라즈미드 DNA를 PmeI으로 절단하고, 에탄올 침전하고, 멸균 탈이온수에 용해하였다. 전기천공법으로 제조사 (BioRad) 설명서에 따라 상기 DNA 10 µg을 컴피턴트(competent) *P. pastoris* 세포의 형질전환에 적용하였다. 150 µg/ml Zeocin을 함유한 플레이트 상에서 선택하였다. 선형화된 플라즈미드를 사용하여 한번 형질전환하여 수 백의 형질전환체를 생성하였다.

상기 재조합 효모 클론을 QC 발현에 대해 시험하기 위해, 재조합물을 2 ml BMGY를 함유한 10 ml 원추형 튜브에서 24시간 배양하였다. 그 후, 효모를 원심분리하고 및 0.5 % 메탄올을 함유한 2 ml BMMY에 재현탁하였다. 이 농도는 메탄올을 매 24 시간마다 72시간까지 첨가함으로 유지되었다. 이후, 상등액에서의 QC 활성을 결정하였다. 상기 융합 단백질의 존재는 6x히스티딘 태그 (Qiagen)에 직접적인 항체를 사용하는 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. 가장 높은 QC 활성을 나타내는 클론들을 선택하여 다음 실험 및 발효에 사용하였다.

#### 발효기에서의 대규모 발현

QC의 발현은 51 반응기 (Biostat B, B. Braun biotech)에서, 특히 "Pichia 발효 과정 가이드라인" (Invitrogen)에 설명된 바와 같이 실시하였다. 간략히, 세포를 희소염 및 유일한 탄소원으로서 글리세롤이 보충된 발효 기본 염(basal salt) 배지 (pH 5.5)에서 배양하였다. 약 24 시간동안의 처음 배치 상 및 후속적인 약 5시간동안의 페드-배치(fed-batch) 상 과정 중에, 세포가 증량되었다. 세포 생 무게가 200 g/l에 도달하면, 전체 약 60 시간의 발효에 삼단계 공급 과정을 적용하면서, 메탄올을 사용하여 QC 발현을 유도하였다. 후속적으로, 6000xg 속도로 4 °C에서 15 분동안 원심분리하여 QC-함유 상등액로부터 세포를 제거하였다. NaOH를 첨가하여 pH를 6.8로 조정하고, 결과된 탁한 용액을 37000xg 속도로, 4 °C에서 40 분간 다시 원심분리하였다. 계속 혼탁할 경우, 셀룰로즈 막 (구멍 크기 0.45 µm)를 사용하여 추가 여과 단계를 적용하였다.

#### *P. pastoris*에서 발현된 6x히스티딘 표지 QC의 정제

고정된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 His-표지 QC를 먼저 정제하였다. 일반적 정제과정으로, 배양 상등액 1000 ml를 750 mM NaCl을 함유하고, 50 mM 인산염 완충액, pH 6.8로 평형화시킨 Ni<sup>2+</sup>-적하 킬레이팅 세파로즈 FF 컬럼 (1.6 x 20 cm, Pharmacia)에 5 ml/min의 유동속도로 적용하였다. 10배 컬럼 부피의 안정화 완충액 및 5 mM 히스티딘을 함유하는 5배 컬럼 부피의 안정화 완충액으로 세척후, 결합된 단백질을 150 mM NaCl 및 100 mM 히스티딘을 함유하는 pH 6.8의 50 mM 인산염 완충액으로 용출시켰다. 수득한 용출물을 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 6.8에 대하여 4 °C에서 밤새 투석하였다. 후속적으로, QC를 투석 완충액으로 평형화된 Mono Q6 컬럼 (BioRad) 상에서 음이온 교환 크로마토그래

피로 정제하였다. QC-함유 분획물을 컬럼상에 4 ml/min의 유동속도로 적재하였다. 다음, 컬럼을 100 mM NaCl을 함유하는 평형화 완충액으로 세척하였다. 각각 30배 또는 5배 컬럼부피에 240 mM 및 360 mM NaCl을 함유하는 평형화 완충액을 나타내는 두 가지 구배로 용출하였다. 6 ml의 분획물을 모으고 및 SDS-PAGE로 순도를 분석하였다. 균질한 QC를 함유하는 분획물을 합치고 한외여과하여 농축시켰다. 장기간 보관하기 위해(-20°C), 글리세롤을 최종 50%의 농도로 첨가하였다. 단백질을 Bradford 또는 Gill과 von Hippel의 방법 (Bradford, M. M. 1976 Anal Biochem 72,248-254 ; Gill, S. C. 및 von Hippel, P. H. 1989 Anal Biochem 182, 319-326.)에 따라 정량하였다.

#### E. coli에서의 QC의 발현 및 정제

QC를 함유하고 있는 작제물을 M15 세포로 형질전환하고 (Qiagen) 및 선택 LB 아가 플레이트 상에서 37 °C에서 배양하였다. 단백질 발현은 1 % 글루코스 및 1 % 에탄올을 함유하고 있는 LB 배지에서 실온에서 실시하였다. 배양물이 약 0.8의 OD<sub>600</sub>에 도달하면, 0.1 mM IPTG로 밤새 발현을 유도하였다. 한 주기로 동결 및 해동한 후, 세포를 300 mM NaCl 및 2 mM 히스티딘을 함유하는 50 mM 인산염 완충액, pH 8.0의 2.5 mg/ml 라이소자임으로 4 °C에서 30분간 처리하여 용혈시켰다. 용액을 37000xg 속도로, 4 °C에서 30분간 원심분리하여 맑게한 후, 유리 프리트를 적용 (DNA 분리)하여 정제하고 및 미정제 및 정제 침전물에 셀룰로스를 적용하는 추가의 두 정제단계를 실시하였다. 상등액 (약 500 ml)을 Ni<sup>2+</sup>-친화성 컬럼 (1.6 x 20 cm) 상에 1 ml/min의 유동속도로 적용하였다. 150 mM NaCl 및 100 mM 히스티딘을 함유하는 50 mM 인산염 완충액으로 QC를 용출하였다. QC-함유 분획물을 한외여과하여 농축하였다.

#### 파파야 라텍스 출처 QC의 정제

BioCAD 700E (Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Germany)을 사용하여 변형된 기존의 방법 (Zerhouni, S. 등. 1989 Biochim Biophys Acta 138, 275-290)으로 QC를 파파야 라텍스로부터 준비하였다. 50 g 라텍스를 물에 용해하고 본 명세서에 설명된 바와 같이 원심분리하였다. S-메틸 메탄티오술포네이트로 프로테아제를 불활성화시키고, 수득한 미가공 추출물을 투석하였다. 투석후, 전체 상등액을 (21 X 2.5 cm i.d.) 100 mM 소듐 아세테이트 완충액, pH 5.0로 평형화시킨 SP Sepharose Fast Flow 컬럼에 적재하였다 (유동속도 3 ml/min). 2 ml/min의 유동속도에서 소듐 아세테이트 완충액 농도를 증가시킴으로써 삼 단계로 용출을 실시하였다. 제 1 단계는 0.5배 컬럼 부피에서 아세테이트 완충액을 0.1에서 0.5 M까지 직선 구배한 것이다. 제 2 단계는 4배 컬럼 부피에서 완충액 농도를 0.5에서 0.68 M까지 선형적으로 증가시킨 것이다. 마지막 용출단계에는, 일 컬럼부피의 0.85 M 완충액을 적용하였다. 최고 효소 활성을 함유하는 분획물(6 ml)들을 합쳤다. 한외여과하여 농도와 완충액을 0.02 M Tris/HCl, pH 8.0까지 변화시켰다 (Amicon; 막의 컷오프 분자질량 10 kDa).

이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 수득한 농축된 파파야 효소에 2 M의 최종농도로 황산암모늄을 첨가하였다. 이 용액을 2 M 황산암모늄, 0.02 M Tris/HCl, pH 8.0로 평형화된 (21 X 2.5 cm i.d.) 부틸 세파로즈 4 Fast Flow 컬럼 상에 적용하였다 (유동속도 1.3 ml/min). 황산암모늄의 농도를 낮추면서 삼 단계로 용출하였다. 제 1 단계에서, 2부터 0.6 M까지의 황산암모늄, 0.02 M Tris/HCl, pH 8.0의 직선 구배를 0.5배 컬럼 부피에 1.3 ml/min의 유동속도로 적용하였다. 제 2 단계는 5배 컬럼 부피에서 0.6에서 0 M까지의 황산암모늄, 0.02 M Tris/HCl, pH 8.0의 직선구배를 1.5 ml/min의 유동속도로 적용한 것이다. 마지막 용출 단계는 0.02 M Tris/HCl, pH 8.0을 2배 컬럼 부피에 1.5 ml/min의 유동속도로 적용하여 실시하였다. QC 활성을 함유하는 모든 분획물을 합치고 한외여과로 농축하였다. 얻어진 균질한 QC를 -70 °C에서 보관하였다. 최종 단백질 농도는 Bradford의 방법을 사용하여, 소혈청 알부민으로 얻은 표준 곡선과 대비하여 결정되었다.

#### 실시에 2 : 글루타미닐 사이클라제 활성 분석

##### 형광광도 분석(Fluorometric assays)

마이크로플레이트(Perkin Elmer)에 대하여 30 °C에서 BioAssay Reader HTS-7000Plus를 사용하여 모든 측정을 실시하였다. QC 활성은 H-Gln-βNA를 사용하여 형광광도적으로 조사되었다. 샘플은 최종 250 μl의 부피 내에, 0.2 mM 형광 발생성 기질, 20 mM EDTA함유 0.2 M Tris/HCl, pH 8.0에 포함된 0.25 U 피로글루타미닐 아미노펩티다제 (Unizyme, Horsholm, Denmark) 및 QC의 적절히 희석된 분배물로 구성되었다. 여기/방출 파장은 320/410 nm이었다. 글루타미닐 사이클라제 첨가로 분석 반응이 개시되었다. QC 활성은 분석 조건 하에서 나프틸아민의 표준 곡선으로부터 결정되었다. 일 유닛은 설정된 조건 하에서 분당 H-Gln-βNA로부터 1 μmol pGlu-βNA를 형성하는데 촉매하는 QC의 양으로 정의된다.

제 2 분광광도 분석에서, QC 활성은 H-Gln-AMC를 기질로 사용함으로써 결정되었다. 반응은 마이크로플레이트에 대해 NOVOStar 독출기(BMG labtechnologies)를 사용하여 30 °C에서 실시되었다. 샘플은 최종 부피 250  $\mu$ l에서, 다양한 농도의 형광발생성 기질, 5 mM EDTA를 함유한 0.05 M Tris/HCl, pH 8.0에 포함된 0.1 U 피로글루타밀 아미노펩티다제 (Qiagen) 및 QC의 적절히 희석된 분배물로 구성되었다. 여기/방출 파장은 380/460 nm이었다. 글루타미닐 사이클라제 첨가로 분석 반응이 개시되었다. QC 활성은 분석 조건하에서 7-아미노-4-메틸쿠마린의 표준 곡선으로부터 결정되었다. 역학 데이터는 GraFit 소프트웨어를 사용하여 평가하였다.

### QC의 분광광도 분석법

이러한 신규의 분석법을 사용하여 대부분의 QC 기질에 대하여 동적(kinetic) 변수를 결정하였다. QC 활성은, 글루타메이트 탈수소효소를 보조 효소로 사용하는 이전의 불연속적 분석법(Bateman, R. C. J. 1989 J Neurosci Methods 30,23-28)를 적용하여 유도된, 연속적 방법을 사용하여, 분광광도적으로 분석되었다. 샘플은 최종 250  $\mu$ l의 부피 내에 각각의 QC 기질, 0.3 mM NADH, 14 mM  $\alpha$ -케토글루타르 산 및 30 U/ml 글루타메이트 탈수소효소로 구성되었다. 반응은 QC 첨가로 개시되었고, 및 340 nm에서의 흡광도 감소를 8 내지 15 분간 측정함으로써 관측되었다. 전형적인 시간 경과에 따른 생성물 형성이 도 1에 도시되어 있다.

초기 속도를 조사하고, 분석 조건 하에서 효소 활성을 암모니아의 표준 곡선으로부터 결정하였다. 모든 샘플은 30 °C에서, 마이크로플레이트에 대해 SPECTRAFluor Plus 또는 Sunrise (둘다 TECAN 제품) 리더를 사용하여 측정되었다. 동적 데이터는 GraFit 소프트웨어를 사용하여 평가하였다.

### 억제제 분석

억제제 시험에 대해, 샘플 조성물은 추정된 저해성 화합물을 첨가한 것을 제외하고는 전술한 바와 같았다. 신속한 QC-저해 시험용 샘플은 4 mM의 각 억제제 및 1  $K_M$ 에서의 기질 농도를 포함하였다. 저해작용을 더 연구하고  $K_i$ -값을 결정하기 위해, 보조 효소에 대한 억제제의 영향을 먼저 조사하였다. 모든 경우에서, 어느 효소에서도 영향이 검출되지 않았고, 따라서 QC 저해작용의 신뢰할만한 결정이 이루어 질 수 있었다. 저해 상수는 GraFit 소프트웨어를 사용하여 진행 곡선을 경쟁적 저해에 대한 일반적인 방정식에 맞추어 결정되었다.

### 실시에 3: MALDI-TOF 질량 분광분석

매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 질량분광분석을 선형적 시간 비행거리 분석기를 구비한 휴렛-팩카드 G2025 LD-TOF 시스템을 사용하여 실시하였다. 상기 장비는 337 nm 질소 레이저, 강력한 가속원(source) (5 kV) 및 1.0 m 행정(flight)튜브를 구비하였다. 검출기 작동은 양이온 모드이고 신호는 개인용 컴퓨터에 연결된 LeCroy 9350M 디지털 보관 오실로스코프를 사용하여 기록하고 여과하였다. 샘플(5  $\mu$ l)을 동일 부피의 매트릭스 용액과 혼합하였다. 매트릭스 용액에 대해서는, 30 mg 2',6'-디하이드록시아세토펜 (Aldrich) 및 44 mg 디암모늄 하이드로젠 시트레이트 (Fluka)를 1 ml 아세토니트릴/0.1% TFA 함유 물 (1/1, v/v)에 용해함으로써 제조된, DHAP/DAHC를 사용하였다. 작은 부피(=1 $\mu$ l)의 매트릭스-분석체-혼합물을 탐침 팁에 이전하고 및 진공 챔버(Hewlett-Packard G2024A 샘플 prep accessory)에서 즉시 증발시켜 신속하고 균일하게 샘플을 결정화시켰다.

Glu<sup>1</sup>-고리화의 장기간 시험을 위해, A $\beta$ -유도 펩타이드를 100 $\mu$ l 0.1 M 소듐 아세테이트 완충액, pH 5.2 또는 0.1M Bis-Tris 완충액, pH 6.5에서 30 °C에서 항온처리하였다. 펩타이드를 0.5mM [A $\beta$ 3-11a] 또는 0.15mM [A $\beta$ 3-21a] 농도로 적용하고, 및 0.2 U QC 24 시간 내내 첨가하였다. A $\beta$ 3-21a의 경우, 분석물을 1 % DMSO를 함유하였다. 상이한 시간에, 샘플을 분석튜브로부터 제거하였고, ZipTips (Millipore)를 제조사 설명서에 따라 사용하여 펩타이드를 추출하였고, 매트릭스 용액 (1:1 v/v)과 혼합한 후, 질량 스펙트럼을 기록하였다. 음성 대조군은 QC나 또는 가열 비활성화 효소 어느 것도 포함하지 않았다. 억제제 연구를 위해, 저해성 화합물을 첨가한 것을 제외하고는(5mM 벤즈이미다졸 또는 2mM 1,10-페난트롤린) 샘플 조성물은 전술한 바와 같은 것을 사용하였다.

### 실시에 4: pH 의존성

사람 및 파파야 QC의 촉매작용의 pH-의존성을 일차 차수 속도 조건하에서 조사하여, 특이성 상수  $k_{cat}/K_M$ 에 대한 양성자 농도의 영향을 반영하였다. 이를 위해, 피로글루타밀 아미노펩티다제를 보조 효소로 및 Gln- $\beta$ NA를 기질로 사용하는 연계된 효소 분석법을 이용하였다. 피로글루타밀 아미노펩티다제는 pH 5.5-8.5 사이에서 활성적이고 안정한 것으로 나타났다

(Tsuru, D. 등. 1978 J Biochem (Tokyo) 84, 467-476). 따라서, 이 분석은 이러한 pH-범위에서 QC 촉매작용을 연구할 수 있게 한다. 얻은 속도 곡선은 도 2에 도시된 바와 같이, 전형적인 종 모양 곡선에 들어맞았다. 사람 QC는 약 pH 7.8 내지 8.0에서 최적을 나타내는 좁은 pH-의존성을 가진다. 속도는 염기성 pH일수록 낮아지는 경향이 있다. 이것은 pH 8.5까지는 활성이 떨어지지 않는 파파야 QC로 관측되는 속도 곡선(도 2, 삽입도)과 반대이다. 하지만, 효소 둘 다는 pH 8에서 최적의 특이성을 가지고 있다. 상기 곡선을 분석한 결과, 놀랍게도 사람 및 파파야 QC에 대해 각각  $7.17 \pm 0.02$  및  $7.15 \pm 0.02$ 의 산도 범위에서 동일한  $pK_a$ -값이 나타난다는 것이 밝혀졌다.

염기성 pH 값에서 사람 QC의 활성 감소는 명백히 약 8.5의  $pK_a$ 를 가지는 기의 분리로 인한 것이다. 파파야 QC의 경우, 두 번째  $pK_a$  값의 신뢰성있는 결정을 가능케하는 기본 pH-범위에서 지나친 데이터 포인트가 없다. 이것은 상기 데이터를 단일 분리 모델에 맞추므로써 지지되며, 데이터를 이중 분리 모델에 맞추는 것과 비교할 때, 거의 동일한  $pK_a$ -값 ( $pK_a$   $7.13 \pm 0.03$ )를 가진다. 이것은 두  $pK_a$ -값이 상당히 떨어져 있다는 것을 말한다.

### pH 안정성

식물 및 동물 효소를 30 °C에서 30 분간 pH 4 내지 10 사이의 상이한 pH 값에서 항온처리하여 글루타미닐 사이클라제의 안정성을 조사하였다. 그 후, 표준 조건하에서 QC 활성을 결정하였다. 그 결과는 도 3에 도시되었다.

파파야 라텍스의 QC는 연구된 pH-범위에서 안정하였고, 산성 또는 염기성 범위에서 불안정한 경향이 없었다. 대조적으로, 사람 QC는 7과 8.5 사이의 pH-범위에서 비견할 만한 안정성을 보였을 뿐, pH 8.5 이상 및 pH 6 이하의 pH 값에서는 현저히 불안정하였다. 따라서, pH 8 근처 범위가 식물 및 사람 QC의 활성과 안정성에 최적으로 보이며, 및 QC들의 기질 특이성 비교를 수행하는 적절한 pH-값으로 보인다.

실시에 5 : QC의 기질 특이성 결정

### 분광분석법

연속 분광분석을 실시예 2에 설명한 바와 같이 실시하였다. 따라서,  $\alpha$ -케토글루타르산으로부터 글루타메이트로 형성됨에 따른 암모니아 방출 및 후속적인 NADH/H<sup>+</sup> 소비에 의해 야기된 340nm에서의 흡광도 감소는 QC 활성을 반영한다. 도 1에 도시된 바와 같은, 선형적인 진행 곡선이 관측되었고 및 측정된 활성과 QC의 농도 간에 선형적인 관계가 있었다. 또한, 제시된 연속분석법을 사용하여 H-Gln-Gln-OH에 대해 얻은 동적 변수들은 (Table 1) 불연속적 방법을 사용하여 얻은 것과 상당히 일치하였다 ( $K_M = 175 \pm 18 \mu M$ ,  $k_{cat} = 21.3 \pm 0.6 s^{-1}$ ). 표 1에 나타난, 파파야 QC에 의한 기질 H-Gln-Ala-OH, H-Gln-Glu-OH, H-Gln-Gln-OH, H-Gln-OtBu 및 H-Gln-NH<sub>2</sub>의 전환에 대한 동적 변수는 pH 8.8 및 37 °C에서 직접적인 방법을 사용하여 결정된 것과 잘 대응한다 (Gololobov, M. Y. 등. 1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377, 395-398). 따라서, 신규한 연속 분석법이 신뢰할만한 결과를 제공한다는 것은 명백하다.

### 디-, 트리- 및 디펩타이드-대용물

전술한 연속 분석법을 이용하여, 약 30개의 화합물을 C. 파파야 및 사람 QC의 잠재적인 기질로서 시험하였다. 결과를 표 5에 나타낸다. 특이성들을 비교함으로써, 거의 모든 펩타이드 기질들이 사람 효소에 비해 파파야 QC에 의해 더 효과적으로 전환된다는 것이 나타났다. 흥미롭게도, 양 쪽 효소에 대하여, 두 번째 위치에서 큰 소수성 잔기를 가지는 기질이, 다른 트리펩타이드와 비교하여 H-Gln-Tyr-Ala-OH, H-Gln-Phe-Ala-NH<sub>2</sub> 및 H-Gln-Trp-Ala-NH<sub>2</sub>의 특이성에 의해서 또는 디펩타이드 기질에 대비한 발색성 기질 H-Gln-AMC, H-Gln-NA 및 H-Gln-Tyr-OH의 반응성에 의해서 나타난 바와 같이, 가장 유력한 것이다. 파파야 QC의 경우, 이러한 발견은 특이성은 두 번째 아미노산 잔기의 크기화 관계가 있다는 이전의 결과와 일치한다 (Gololobov, M. Y. 등. 1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377,395-398).

식물 및 동물 QC의 특이성에서 유일하게 인상적인 차이는 H-Gln-OtBu의 경우에 발견된다. 에스테르가 디펩타이드 기질에 비해 유사한 특이성을 가지는 파파야 QC에 의해 전환되는 반면, 사람 QC에 의해서는 약 일차수의 크기로 느리게 전환되었다.

### 올리고펩타이드

몇몇의 디펩타이드 및 트리펩타이드외에, 많은 올리고펩타이드를 파파야 및 사람 QC에 의한 전환시 시험하였다(표 5). 흥미롭게도, 일단의 테트라펩타이드 군에 대한 사람 및 식물 QC 간의 특이성에서의 전체적인 차이는 디펩타이드 및 트리펩타이드 기질에 대해 관측되는 바와 같이 크지 않다. 이것은 3번째 및 4번째 위치의 아미노산이 특히 사람 QC의 동적 거동에 여전히 영향을 미친다는 것을 가르킨다. 그러나, 예외로서, 두 번째 아미노산 위치에서 프롤린 잔기를 가지는 펩타이드들은 구조체 H-Gln-Xaa-Tyr-Phe-NH<sub>2</sub>의 일단의 테트라펩타이드 군에서 현저하게 감소된  $k_{cat}/K_M$  값을 나타낸다(표 5). 특이성에서의 감소는 사람 QC에 대해 더욱 심화되고, 이것은 파파야 QC와 비교하여  $k_{cat}/K_M$ -값에서 약 8 배 차이가 난다.

다른 테트라펩타이드들에 비교하여 H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH<sub>2</sub>, H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH<sub>2</sub> 및 H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>에 대한 특이성에 의해 밝혀지는 바와 같이, 글루타민의 양전하 아미노산 C-말단을 가진 기질의 전환에 사람 QC가 약간 감소된 특이성을 보이는 것으로 관측된다. 명백히, 감소된 특이성은 주로 더 작은 전환 수에 기인한다. 이러한 효과는 식물 효소에 대한 경우에는 없다.

**[표 5]**  
사람 및 파파야 QC의 펩타이드 기질의 동적 평가

기질	사람 QC				파파야 QC			
	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_i^*$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_i^*$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )
H-Gln-OH	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23 ± 0.1
H-Gln-AMC	54 ± 2	5.3 ± 0.1	n.d.	98 ± 2	42 ± 1	39.4 ± 0.4	n.d.	938 ± 13
H-Gln-β NA	70 ± 3	20.6 ± 0.5	1.21 ± 0.07	294 ± 6	38 ± 3	51.4 ± 1.4	1.20 ± 0.08	1353 ± 70
H-Gln-OtBu	1235 ± 74	6.7 ± 0.2	n.i.	5.4 ± 0.2	223 ± 9	49.4 ± 0.6	n.i.	222 ± 6
H-Gln-NH <sub>2</sub>	409 ± 40	12.8 ± 0.5	n.i.	31 ± 2	433 ± 13	44.8 ± 0.4	n.i.	103 ± 2
H-Gln-Gly-OH	247 ± 10	13.2 ± 0.2	n.i.	53 ± 1	641 ± 20	45.8 ± 0.4	n.i.	71 ± 2
H-Gln-Ala-OH	232 ± 5	57.2 ± 0.4	n.i.	247 ± 4	158 ± 8	89.8 ± 1.0	n.i.	442 ± 16
H-Gln-Gln-OH	148 ± 5	20.7 ± 0.2	n.i.	140 ± 2	44 ± 3	43.2 ± 0.7	n.i.	982 ± 51
H-Gln-Glu-OH	359 ± 10	24.7 ± 0.2	n.i.	58 ± 1	106 ± 5	50.3 ± 0.6	n.i.	475 ± 17
H-Gln-Val-OH	196 ± 5	17.2 ± 0.1	n.i.	88 ± 2	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Tyr-OH	211 ± 5	94 ± 1	n.i.	446 ± 6	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Gln-Tyr-NH <sub>2</sub>	79 ± 2	45.1 ± 0.4	n.i.	524 ± 8	103 ± 4	53.6 ± 0.7	n.i.	520 ± 13
H-Gln-Gly-Pro-OH	130 ± 5	25.3 ± 0.2	n.i.	195 ± 7	333 ± 15	41.7 ± 0.5	n.i.	125 ± 4
H-Gln-Tyr-Ala-OH	101 ± 4	125 ± 1	n.i.	930 ± 27	63 ± 3	104.0 ± 1.0	n.i.	1650 ± 63
H-Gln-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>	69 ± 3	109 ± 1	n.i.	1811 ± 64	111 ± 5	132.1 ± 0.6	n.i.	1190 ± 48
H-Gln-Trp-Ala-NH <sub>2</sub>	50 ± 2	47.0 ± 0.7	n.i.	940 ± 24	78 ± 5	151.8 ± 2.6	n.i.	1946 ± 91
H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH <sub>2</sub>	143 ± 4	33.5 ± 0.4	n.i.	234 ± 4	123 ± 10	49.2 ± 1.7	n.i.	400 ± 19
H-Gln-Asn-Gly-Ile-NH <sub>2</sub>	172 ± 5	56.6 ± 0.5	n.i.	329 ± 7	153 ± 9	51.4 ± 0.9	n.i.	336 ± 14
H-Gln-Ser-Tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	55 ± 3	52.8 ± 0.8	n.i.	960 ± 38	135 ± 6	64.9 ± 1.0	n.i.	481 ± 14
H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	55 ± 2	29.6 ± 0.3	n.i.	538 ± 14	124 ± 6	48.9 ± 0.7	n.i.	394 ± 13
H-Gln-Pro-Tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	1889 ± 152	31.7 ± 1.2	n.i.	17 ± 1	149 ± 14	18.8 ± 0.6	n.i.	126 ± 8
H-Gln-His-tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	68 ± 3	55.4 ± 0.7	n.i.	815 ± 26	92 ± 7	75.9 ± 1.4	n.i.	825 ± 48

H-Gln-Gln-Tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	41±2	41.4± 0.4	n.i.	1010± 40	45± 2	52.9± 0.7	n.i.	1176± 37
H-Gln-Glu-Tyr-Phe-NH <sub>2</sub>	47±4	46± 1	n.i.	979± 62	100± 4	54.6± 0.6	n.i.	546± 16
H-Gln-Glu-Ala-Ala-NH <sub>2</sub>	77±4	46± 1	n.i.	597± 18	102± 4	53.7± 0.6	n.i.	526± 15
H-Gln-Glu-Tyr-Ala-NH <sub>2</sub>	69±2	42.1± 0.4	n.i.	610± 12	113± 5	44.7± 0.5	n.i.	396± 13
H-Gln-Glu-Ala-Phe-NH <sub>2</sub>	39±3	39± 1	n.i.	1000± 51	81± 3	48.5± 0.45	n.i.	599± 17
H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	55±2	45.8± 0.5	n.i.	833± 21	107± 6	58.5± 0.4	n.i.	547± 27
H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH <sub>2</sub>	54±3	33.4± 0.5	n.i.	619± 25	118± 6	48.2± 0.8	n.i.	408± 14

(n.r., 비반응; n.i., 무저해; n.d., 미결정; \*, 기질 저해에 관하여)

테트라펩타이드로 얻어진 결과는 또한 또 다른 결론을 이끌어 낸다. 이미 지적한 바와 같이, 파파야 QC는 디펩타이드에 대해 더 높은 선택성을 나타냈다. 특정의 테트라펩타이드의 경우, 그러나, 표 5에 주어진 데이터의 그래프를 제공하고 있는 도 4에 도시된 바와 같이, 두 번째 아미노산 위치에서 글루타메이트를 포함하는 일단의 펩타이드군에 대하여, 사람 QC에는 더 높은 특이성 상수가 관찰되었다. 더욱이, 사슬 길이가 디- 에서 테트라펩타이드로 증가함에 따라, 사람 QC의 선택성은, 파파야 QC로 얻어진 결과와는 상반되게, 증가한다. 또한, 사람 QC의 가장 높은 선택성은 3번째 및 4번째 아미노산 위치에서 벌기한 소수성 잔기를 포함하는 펩타이드에 대하여 기록하고 있는 바, 이것은 효소와 소수성 상호작용을 나타내는 것이다. 각 펩타이드에 대한 동적 변수를 비교함으로써, 변화는 주로 더 낮은 K<sub>M</sub>-값에 기인하는 것으로 보이고, 펩타이드의 전환에 대한 턴오버 수가 유사한 것으로 발견되었다. 따라서, 더 긴 펩타이드에 대한 사람 QC의 더 높은 선택성은 더 소수성인 기질이 효소에 더 견고히 결합하는 결과로 생각된다.

3번째 및 4번째 위치에서 소수성 아미노산을 포함하는 펩타이드로 관찰된 사람 및 식물 QC간의 차이점은 또한 H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH<sub>2</sub> 및 H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH<sub>2</sub> 또는 H-Gln-Gln-OH 및 H-Gln-Gln-Tyr-Phe-OH를 향한 효소의 특이성 상수를 비교함으로써 명백해진다.

사람 QC는 또한 N-말단 Gln 및 C-말단 Ala 잔기를 포함하는 동족 기질에 대해 더욱 선택적인 것으로 발견되었다 (표 6). 사람 QC의 선택성이 기질 길이에 따라 증가하는 반면, 파파야 QC에는 그러한 경향이 없다. 사람 QC가 서열에서 Ser 잔기를 포함하는 펩타이드에 덜 특이적이기 때문에, 측쇄의 성질이 또한 중요한 것으로 보인다 (표 6).

**[표 6]**  
사람 및 파파야 QC의 활성에 대한 기질 길이의 영향

기질	사람 QC			파파야 QC		
	K <sub>M</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (S <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mM <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (S <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mM <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )
H-Gln-Ala-NH <sub>2</sub>	155±9	40.1± 0.9	259±9	212±21	62.8±3.0	296± 15
H-Gln-Ala-Ala-NH <sub>2</sub>	87±3	76.3± 0.7	877±22	164±6	83.2±1.0	507± 12
H-Gln-Ala-Ala-Ala-NH <sub>2</sub>	65±3	60.5± 0.7	1174±43	197±8	74.6±1.0	379± 10
H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-NH <sub>2</sub>	79±6	55.3± 1.6	700±33	216±6	78.5±1.0	363±5

촉매작용에 대한 이온 강도의 영향

기질 특이성에 대한 영향에 대하여 조사한 다른 변수는 이온강도였다. 이를 위해, 몇몇 기질의 고리화에 대한 동적 변수를 0.5 M KCl 존재 및 무존재 하에서 결정하였다 (표 7). 놀랍게도, 무하전 백본을 가진 기질에 대한 선택성은 파파야 라텍스의 QC 및 사람 QC의 경우, 염의 추가로 유의하게 변화되지 않는다. H-Gln-Ala-OH 및 H-Gln-Glu-OH에 대한 사람 QC의 특이성 상수는, 그러나, KCl 첨가에 의해 감소된다. 개별 동적 변수에 의해 나타나는 바와 같이, 이러한 효과는, 증가하는  $K_M$  및  $k_{cat}$ -값에 의한 것이다. 파파야 QC의 경우, 어떠한 변수에도 이러한 효과가 검출되지 않았다. 상기 효과는 음전하로 하전된 기질로 인한 것으로는 보이지 않는데, 하전되지 않은 것의 변수들이 음전하 하전된 펩타이드 H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH<sub>2</sub>에 대하여 발견되기 때문이다. 염 첨가의 흥미로운 효과는 양전하 하전된 기질 H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH<sub>2</sub> 및 H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>에 대하여 발견된다. 식물 및 사람 QC의 경우, 촉매 작용에 대한 양성적 효과가 더 작은  $K_M$  값 및 약간 더 큰 턴오버 수로 인하여 주로 결정되었다.

**[표 7]**  
사람 및 파파야 QC의 촉매작용에 대한 이온강도의 효과

	기질	0.05 M 트리스-NaOH, pH 8.0				0.05 M 트리스-NaOH, pH 8.0, 0.5 M KCl			
		$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
파파야 QC	H-Gln-NH <sub>2</sub>	0.434 ±0.015	43.4 ±0.4	100±3	n. i.	0.446 ±0.010	45.2 ±0.3	101±2	n. i.
	H-Gln-β NA	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 ±.9	509±19	n. i.	0.143 ±0.005	68.1 ±0.6	480±12	n. i.
	H-Gln-Glu-OH	0.098 ±0.005	45.0 ±0.5	459±18	n. i.	0.094 ±0.003	44.4 ±0.3	472±12	n. i.
	H-Gln-Trp-Ala-NH <sub>2</sub>	0.079 ±0.005	138±3	1747±73	n. i.	0.072 ±0.004	133±3	1847±61	n. i.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH <sub>2</sub>	0.106 ±0.008	52.9 ±1.2	499±26	n. i.	0.065 ±0.005	48.4 ±1.0	745±42	n. i.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH <sub>2</sub>	0.102 ±0.007	50±1	493±22	n. i.	0.053 ±0.002	58.1 ±0.7	1096±28	n. i.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	0.109 ±0.005	52.4 ±0.7	481±16	n. i.	0.094 ±0.003	53.6 ±0.5	570±13	n. i.
사람 QC		0.05 M Tris-HCl, pH 8.0				0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M KCl			
		$K_M$ (mM)	$K_{ca}$						
	H-Gln-NH	0.442 ±0.030	12.8 ±0.3	29±1	n. i.	0.401 ±0.014	12.2 ±0.1	30±1	n. i.
	H-Gln-β NA	0.076 ±0.004	21.7 ±0.5	285±8	1.39 ±0.08	0.063 ±0.003	20.0 ±0.4	318±9	0.97 ±0.04
	H-Gln-Ala-OH	0.269 ±0.007	54.4 ±0.5	202±3	n. i.	0.357 ±0.012	47.6 ±0.6	133±3	n. i.
	H-Gln-Glu-OH	0.373 ±0.015	21.4 ±0.3	57±2	n. i.	0.607 ±0.036	18.9 ±0.5	31±1	n. i.
	H-Gln-Trp-Ala-NH <sub>2</sub>	0.054 ±0.003	50.8 ±0.6	941±41	n. i.	0.056 ±0.002	50.0 ±0.4	893±25	n. i.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH <sub>2</sub>	0.166 ±0.013	31±1	187±9	n. i.	0.091 ±0.005	29.8 ±0.5	327±12	n. i.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH <sub>2</sub>	0.051 ±0.003	29.4 ±0.5	577±24	n. i.	0.034 ±0.001	31.6 ±0.3	929±19	n. i.
H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	0.060 ±0.002	46.6 ±0.5	777±18	n. i.	0.061 ±0.002	45.6 ±0.5	748±16	n. i.	

## 생리학적 기질

초기 연구에서, QC에 의한  $[Gln^1]$ -TRH 및  $[Gln^1]$ -GnRH의 전환은 이미 소 및 돼지의 뇌하수체로부터 얻은 QC에서 나타났다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536; Fischer, W. H. 및 Spiess, J. 1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84, 3628-3632). 이러한 이미 조사된 뇌하수체 호르몬에 더하여, 사람 QC의 세 가지 잠재적인 생리학적 기질들, 이름하여  $[Gln^1]$  가스트린,  $[Gln^1]$  뉴로텐신, 및  $[Gln^1]$  FPP를 합성하였고 전환시 시험하였다. 이들의 전환에 대한 동적 변수는 표 1에 기재되어있다. 흥미로운 것은, 글루타미닐 펩타이드들이 각각 피로글루타미닐 펩타이드들로 전환되는데, 그들의 크기, 즉, 17개 아미노산을 가진 제일 큰 펩타이드 프로-가스트린 뒤로, 프로-뉴로텐신, 프로-GnRH, 프로-TRH 및 프로-FPP가 뒤따르는 크기에 의존하여 특이성 상수가 증가한다. 이러한 발견은 합성 펩타이드들에게서 얻은 데이터와 상응한다.

놀랍게도, 더 긴 기질들은 또한 더 높은 선택성으로 식물효소에 의해 전환되며, 이것은 더 짧은 올리고펩타이드에서의 발견과 부분적으로 배치된다. 아마도, 활성부위와 멀리 떨어진 곳에서, 기질 및 효소간의 제 2의 결합 상호작용이 있을 수 있다.

## 변형된 아미노산을 포함하는 펩타이드

QC의 특이성 및 선택성을 더욱 조사하기 위해, N-말단 글루타미닐 잔기 또는 두 번째 위치에서 변형된 아미노산을 포함하는 펩타이드를 합성하였다. MALDI-TOF 질량 분광분석으로 이러한 펩타이드들의 전환을 정량적으로 분석하였다 (참조 실시예 3). 각각 글루타미닐 잔기 또는 이의 유사체의 고리화로 인하여, 촉매작용의 기질 및 생성물의 질량차이를 검출하였다. 기질 몰 당 일 몰의 암모니아 방출의 경우, 또한 분광분석법으로 정량적으로 분석하였다.

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. 펩타이드- 및 부분적인 이소펩타이드 결합을 통해 리실 잔기에 결합된 N-말단에서의 두 개의 글루타미닐 잔기를 포함하는, 이러한 N-말단성 분지 펩타이드는 동일한 방식으로 사람 (도 5) 및 파파야 QC (미도시)에 의해 전환되었다. 일치하는 기질 전환(도 5)에 의해 나타난 바와 같이, 구별되는 잔기에 대한 검출할만한 선호도가 없이, 양 쪽 글루타미닐 잔기 둘 다 피로글루탐산으로 전환된다. 따라서, 다르게 결합된 글루타미닐 잔기에 대한 QC의 선택도는 기본적으로 다르지 않다.

H-Gln(OMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH<sub>2</sub>. 메틸화된 글루타미닐 잔기는 파파야 QC에 의해 오로지 피로글루타미닐 잔기로 전환되었다 (도 6). 또한, 펩타이드에 의한 사람 QC의 저해는 검출되지 않았고, 이는 메틸화된 잔기가 사람 QC에 의해 인지되지 않는다는 것을 나타낸다.

H-Glu(OMe)-βNA 및 H-Glu-βNA. 이러한 화합물 어느 것도 파파야 또는 사람 QC에 의해 전환되지 않았다. 이러한 형광발생 기질들은 피로글루타미닐 아미노펩티다제를 보조 효소로 사용하여, 형광측정법으로 분석하였다. O-메틸화 글루타메이트 잔기들은, 그러나, 트리스 및 트리신 완충액 둘 다에서, 비효소적으로 촉매되는 고리화로의 경향을 보이면서, 매우 불안정하였다. 더욱이, 기질로서 H-Gln-AMC에 대한 양쪽 QC의 활성은 더 긴 펩타이드들 H-Glu(OMe)-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> 또는 H-Glu-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>에 의해 저해되지 않았고, 이는 글루탐산 또는 유도체가 양쪽 QC 형태에 의해 인식되지 않았다는 것을 알려준다. 더욱이, 그 결과는 글루탐산 잔기의 음전하 하전이 활성 부위로부터 펩타이드를 배척하는 유일한 이유가 아니라는 것을 알려준다.

H-Gln-시클로(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe). 분자 내부간 부분적인 이소펩타이드 결합을 가지고 있는, H-Gln-시클로(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)의 전환을 정량분석하였고, 사람 및 파파야 QC에 대해 각각  $240 \pm 14 \mu\text{M}$  및  $133 \pm 5 \mu\text{M}$ 의  $K_M$ -값이 나타났다. 사람 QC ( $22.8 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ )에 비해 파파야 QC ( $49.4 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ )에 의한 전환의 더 높은 턴 오버 수로 인하여, 식물 효소는 사람 QC보다 약 4-배 더 높은  $k_{cat}/K_M$  값인  $372 \pm 9 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ 를 나타낸다. 따라서, 파파야 QC의 경우 특이성 상수는 H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>와 같이 유사한 크기를 가지는 기질에 비해 약간 작을 뿐이다. 사람 QC에 대한  $k_{cat}/K_M$  값은, 그러나,  $95 \pm 3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 를 가지는 것으로 나타났고 이는 유사한 크기의 기질에 비해 약 일 차수 크기가 작은 것이다 (표 5).

H-β호모Gln-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. N-말단 호모글루타미닐 잔기는 각각 사람 및 파파야 QC의 촉매작용에 의해 5일 락탐 고리로 전환되었다. 동시에 나타나는 암모니아의 방출은 분광분석적으로 및 전술한 바와 같은 MALDI-tof 분석에 의해 분석되었다. QC가 빠졌거나 가열되었을 때, 암모니아 방출이 검출되지 않았고, 이는 고리화의 특이적 촉매작용을 나타낸다. 효미롭게는, C. 파파야 ( $K_M=3.1\pm 0.3$  mM,  $k_{cat}=4.0\pm 0.4$  S<sup>-1</sup>) 및 사람 ( $K_M=2.5\pm 0.2$  mM,  $k_{cat}=3.5\pm 0.1$  S<sup>-1</sup>)의 QC는 각각 거의 동일한  $1.4\pm 0.1$  및  $1.3\pm 0.1$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>의  $k_{cat}/K_M$ 을 가지고 이러한 펩타이드 전환을 촉매한다. 따라서, β-호모글루타민 잔기의 고리화는 N-말단에서 글루타미닐 잔기를 포함하는 유사한 크기의 펩타이드에 비해 약 1000배 감소한 효율로 촉매된다. 이것은 기질의 α-탄소의 구성이 QC 형태에 의한 기질 인식에 중요하지만 필수적인 것이 아니라는 것을 나타낸다. 기질이 되는 필수적 요건은 고리화하기 쉬운 거리와 각도에 있는 γ-아미드기와 비양성자화된 N-말단 아미노기이고, 이는 N-말단 글루타미닐 및 호모-글루타미닐 잔기에 의해 수행되는 요건이다.

실시에 6: QC 기질의 합성

올리고펩타이드류. 펩타이드 합성기 (Labortec SP650, Bachem, Switzerland)사용하여, 전술한 바와 같이 (Schilling, S. 등. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857), 펩타이드를 0.5 mmol 규모로 반자동으로 합성하였다. 자동화 Symphony Peptide 합성기(Rainin Instrument Co.)를 사용하여, 설명된 바와 같이 (Manhart, S. 등. 2003 Biochemistry 42,3081-3088), 더 긴 펩타이드를 25 μmol 규모로 합성하였다. 모든 펩타이드 짝결합에 대해서, 고상 펩타이드 합성의 변경된 Fmoc-프로토콜을 이용하면서 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU; Novabiochem)/염기 (디이소프로필 에틸아민 또는 N-메틸-모르폴린; Merck)을 사용하였고, 또는 난이한 짝결합의 경우, N-[(디메틸아미노)-1H-1, 2, 3-트리아졸로 [4,5-b] 피리딘-1-일메틸렌]-N-메틸메탄암미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥사이드 (4, 5) (HATU; Applied Biosystems)/디이소프로필 에틸아민을 활성화 시약으로서 사용하였다. 트리플루오로아세트 산 (TFA; Merck) 함유 각테일로 수지로부터 절단한 후, 미정제 펩타이드를 더 이상의 N-말단 글루타민의 고리화를 피하기 위해 산이 없는 용제를 사용하여 예비 HPLC로 정제하였다. 물에 함유된 직선 구배의 아세토니트릴(Merck) (40분에 걸쳐 5 내지 40 % 또는 65 % 아세토니트릴)를 250-21 Luna RP18 컬럼 (Phenomenex) 상에 사용하여 예비 HPLC를 수행하였다. 펩타이드 순도 및 정체를 확인하기 위해, 분석 HPLC 및 ESI-MS를 사용하였다.

Glu(NH-NH<sub>2</sub>)-Ser-Pro-Thr-Ala-NH<sub>2</sub>. 직선 전구체 펩타이드 (Fmoc-Glu-Ser-Pro-Thr-Ala-NH<sub>2</sub>)를 표준 Fmoc-과정 (Schilling, S. 등. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857)에 따라 Rink 아미드 MBHA 수지 (Novabiochem) 상에서 합성하였다. 수지로부터 Fmoc-보호 펩타이드를 절단한 후, 펩타이드를 디에틸 에테르 (Merck)로 침전시키고, 정제하고 및 건조시켰다. 디클로로메탄 (DCM, Merck)에서 HMBA-AM 수지 (1.16 mmol/g, Novabiochem)를 전구체 펩타이드 (3 eq.)의 글루탐산의 γ-카르복실산 기 짝결합에 사용하였다. 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC, Serva) (4 eq.) 및 디메틸아미노피리딘 (DMAP, Aldrich) (0.1 eq)을 짝짓기 시약으로 사용하였다. 12 시간 후, 수지를 정제하고, DCM로 세척하고 및 반응을 반복하였다. 20% 피페리딘을 함유한 DMF 용액을 사용하여 (3 x 5 min) N-말단 Fmoc-기를 탈보호한 후, 펩타이드 수지를 5% 하이드라진 용액 (20 ml/g)으로 1.5 시간 처리하였다. 수지를 정제하고 디메틸포름아미드 (DMF, Roth, Germany) 및 TFA로 세척하였다. 증발 후, 조 펩타이드를 에테르로 침전시켜 76 % 수율로 얻었다.

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. 표준 Fmoc/<sup>t</sup>Bu-과정에 따라, 상기 선형 펩타이드를 Rink 아미드 MBHA (Schilling, S. 등. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857) 상에서 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH를 두 번째 아미노산 짝결합으로서 사용하여 합성하였다. 20 % 피페리딘 (Merck)을 함유한 DMF를 사용하여 리신의 두 개 아미노 보호기를 탈보호시킨 후, 4 eq. Fmoc-Gln(Trt)-OH를 짝지었다. 표준 절단 방법은 95% 수율을 나타냈다.

H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH<sub>2</sub>. Fmoc-MI-AM (Novabiochem) 수지 상에 적재된 Fmoc-Glu-OtBu로부터 시작하여, Fmoc-Gln(NMe)-OH를 합성하였다. DCM로 부풀린 후, 수지(0.5 g)를 DMF로 세척하고 및 20% 피페리딘을 함유한 DMF 용액으로 탈보호시켰다. 수지를 5 ml DMF에 넣고, 다음, 5 eq. Fmoc-Glu-OtBu, 5 eq. HATU 및 10 eq. DIPEA를 첨가하고 6시간 흔들었다. 정제 및 세척 후, 생성물을 표준 TFA 절단 조건에 따라 절단하였다. 펩타이드 H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH<sub>2</sub>를 설명한 바와 같이 (Schilling, S. 등. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857) 합성하였다. Fmoc-Gln(NMe)-OH를 HATU/DIPEA와 밤새 결합시켰다. 표준 절단 방법은 조 펩타이드를 78% 수율로 수득하였다.

H-Glu(OMe)-β-나프틸아미드, H-Gln-Val-OH, H-Gln-Tyr-OH. Boc-보호 디펩타이드를 이소부틸 클로로카보네이트 (Merck)를 사용하여 표준 혼합 무수물 방법에 따라 합성하였다. C-말단 메틸에스테르 Boc-Gln-Tyr-OMe 및 Boc-Gln-Val-OMe를 1 N NaOH를 함유한 디옥산을 사용하여 사포닌화시켰다. Boc-보호된 펩타이드를 HCl/디옥산 용액으로 10 분간 탈보호시켰다. 증발후, 잔류물을 수 개 용제를 사용하여 결정화시켜 60 내지 70 %의 고형 화합물을 얻었다.

H-Gln-시클로(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe). 2-클로로트리틸 수지상에서 전구체 Boc-Gln (Trt)-Lys-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Phe-OH을 합성하였다. Fmoc-Lys(Mtt)-OH를 사용하여 Fmoc/<sup>t</sup>Bu-전략의 표준 방법에 따라 커플링을 실시하였다. 3% TFA 함유 DCM용액으로 절단 후 (10 번, 5 분), 용액을 10 % 피리딘(Merck) 함유 메탄올(MeOH; Merck)로 중화시키고, DCM 및 MeOH로 3번 세척하고, 5 %의 부피로 증발시키고, 및 조 펩타이드를 빙냉수에 침전시켰다. 이 후, 상기 조 펩타이드를 DCC/N-하이드록시벤조트리아졸 (HOBt; Aldrich) 활성화로 고리화시켰다. 조 펩타이드를 무수 디클로로메탄 (0.2 mmol/50 ml)에 용해하고, 0.2 mmol N- 메틸모르폴린 및 0.4 mmol 1-하이드록시벤조트리아졸을 첨가하였다. 이 용액을 0 °C에서 0.4 mmol 디시클로헥실카르보디이미드를 함유한 250 ml 디클로로메탄용액에 적가하였다. 실온에서 밤새 교반하면서 반응을 수행하였다. N,N'-디시클로헥실우레아를 정제후, 용제를 증발 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해하고 및 1N HCl, NaHCO<sub>3</sub> 및 물의 포화용액으로 수회 세척하였다. 용액을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고 및 진공에서 증발 건조시켰다.

실시에 7: QC의 이펙터의 특성화

### 이미다졸 유도체

5원 고리의 상이한 위치에서 치환체를 가지고 있는 이미다졸 및 벤즈이미다졸 유도체를 QC의 억제제로 시험하였다 (표 3). 구성원자의 구성에 이미다졸 고리가 참조된다. 적용된 방법은 실시에 2에 설명되어 있다.

C-4(5) 및 C-4,5 유도체. 이미다졸 고리에서 구성적으로 등가인 4- or 5-위치중 하나 또는 둘 다의 위치에서 치환체를 가지는 화합물은 사람 QC의 저해작용에 감소된 능력을 보였다. 그러나, 예외로, N-아세틸화 히스타민은 가장 유력한 저해 화합물중 하나로 판명되었다. 이러한 위치에서 작은 치환체들은 5-하이드록시메틸-4- 메틸-이미다졸의 유사한 저해 상수에 의해 나타난 바와 같이, 이미다졸에 비해, 거의 결합에 영향을 끼치지 못한다. 이러한 부위에 부착된 더 큰 그리고 더 벌키한 기들은 효소에 의한 화합물 결합을 감소시키거나 폐하였다. 시험된 다른 치환체들 일부는 이미다졸 고리에서 전자 밀도를 감소케하는, 음성적 유도(inductive) 또는 공명(mesomeric) 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. L-히스티딘 및 히스티딘아미드의 K<sub>i</sub>-값에서의 차이는 또한 결합에 대한 전하의 효과를 나타낸다. 하전된 기질의 정전기적 배척에 대한 증거는 이미 기질 특이성 연구에서 나타났다, 즉 글루타민아미드는 쉽게 사람 QC에 의해 전환되나, 기질로서 자유 글루타민에 대해서는 아무런 반응성도 관측되지 않았다.

C-2 유도체. 시험된 모든 유도체는 QC를 이미다졸로서 더 약하게 저해하였다. 양성자보다 더 큰 임의의 치환은 적절한 QC-결합을 방해한다. 오로지 2-메틸-벤즈이미다졸에서의 메틸기로 인해, 저해 상수는 약 한 차수 크기로 감소된다. 매우 유사한 관계가 벤즈이미다졸 및 2-아미노-벤즈이미다졸에 대한 K<sub>i</sub>-값들을 비교함으로써 나타난다. 더하여, 그 결과는 영향이 전자적 변경과는 무관함을 알려준다.

N-1 유도체. 사람 QC의 저해작용에 시험된 이미다졸 유도체 중에서, 이미다졸에 비해 향상된 K<sub>i</sub>-값을 가지는 대부분 화합물은 하나의 질소 원자에서 변경된 것이다. 이러한 화합물은 또한 가장 효과적인 QC 억제제들 중의 하나, 1-벤질이미다졸을 포함한다. 흥미롭게도, 실험 조건하에서 불활성인, 1-벤조일이미다졸 및 페닐이미다졸에 대해 나타날 수 있는 바와 같이, 이러한 구조를 조금만 변경해도 저해 특성을 잃게된다. 또한 이러한 경우, 관측된 변화는 페닐기의 음성적 공명(mesomeric) 효과로 인해 이미다졸 고리의 감소된 전자 밀도로만 야기된 것으로 보이지 않는 데, 이는 또한 양성적 유도(inductive) 효과를 나타내는 벌키 트리메틸-실릴기가 다른 잔기에 비해 감소된 결합을 보이기 때문이다. 흥미로운 것은, 이러한 기의 덜 효과적인 화합물들중 하나는 1-아미노프로필-이미다졸이라는 것이다. 이 화합물의 작은 효능은 염기성 아미노기에 의해 야기되는 것으로, 공간적으로 유사한 화합물들인 1-메틸이미다졸 및 1-비닐이미다졸이 활성 부위와 향상된 결합을 보이기 때문이다. 따라서, 양하전 아미노기는 더 작은 K<sub>i</sub>-값을 결과하며, N-ω-아세틸화 히스타민 (표 3) 및 히스타민 (표 4)의 K<sub>i</sub>-값을 비교함으로써 확증되어 진다.

3,4 및 3,5 유도체의 효과. 위치 4(5) 또는 둘 다에서 치환체를 포함하는 이미다졸 유도체는 효소와의 결합에 제한된 효율을 가지고 있는 것으로 나타난다. 특이적 치환체의 효과는 L-히스타민 및 히스타민의 생물학적 분해과정에서의 두 중간체

인, 3-메틸-4-히스타민과 3-메틸-5-히스타민의 저해 상수를 비교함으로써 명확하게 된다 (표 4). L-히스타민은 그것의 아세틸화된 상응물에 비해 약 일 차수 크기 작은  $K_i$  값을 가지고 있다. 하나의 질소를 메틸화하면 3-메틸-4-히스타민의 경우 상당한 효능 증가를 가져온다. 3-메틸-5-히스타민으로 이끄는 메틸화는, 그러나, 저해 활성을 완전히 잃게 한다. 따라서, 관측된 효과는 염기성 질소 근처의 탄소의 유도화로 인한 결합의 공간적 장애(sterical hindrance)에 의해 주로 나타나는 것 같다. 추측상, 염기성 질소가 효소와의 결합에 중요한 역할을 하는 것 같다.

실시에 8: A $\beta$ 3-40/42 유도체의 형성

세 번째 위치에서 글루타민을 글루탐산 잔기대신 포함하는 A $\beta$ 3-40/42의 두가지 짧은 N-말단 펩타이드 서열, [Gln<sup>3</sup>]-A $\beta$ 1-11 (서열: DAQFRHDSGYE) 및 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11을 사용하여 측정하였다. DP IV에 의한 절단 및 상기 두 펩타이드의 N-말단 글루타민 잔기의 QC에 의한 고리화를 MALDI-TOF 질량분광 분석으로 측정하였다. 정제된 DP IV (돼지 신장) 또는 미정제 돼지 뇌하수체 분쇄물을 QC 출처로서 및 연속 촉매작용을 측정하기 위한 효소원으로 사용하였다.

## 결과

1. DPIV에 의해 촉매된 [Gln<sup>3</sup>] A $\beta$ 1-11a로부터의 [Gln<sup>3</sup>] A $\beta$ 3-11a의 형성 및 DP IV-억제제 Val-피롤리다이드 (Val-Pyrr)에 의한 이의 방지

DPIV 또는 DPIV-유사 활성체는 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 1-11a를 절단하여 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a를 형성한다 (도 7). 세 번째 위치의 잔기는 이러한 절단에 의해 노출되고 따라서 다른 효소들, 즉, QC에 의해 변경될 수 있게 접근 가능해진다. 예상되는 바, 촉매 작용은 Val-Pyrr에 의해 완전히 방지될 수 있다 (도 8).

2. 뇌하수체 분쇄물에서의 QC의 촉매작용에 의한 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11로부터의 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11 형성 및 1,10-페난트롤린에 의한 방지

돼지 뇌하수체의 분쇄물에 있는 글루타미닐 사이클라제는 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11의 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a로의 전환을 촉매한다 (도 9). [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a 형성은 1,10-페난트롤린 첨가로 저해되었다 (도 10).

3. [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a 형성을 결과하는 DPIV 및 QC의 연속적 촉매작용 및 Val-Pyrr 및 1,10-페난트롤린에 의한 방지

[Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 1-11a로부터 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a 형성은, 돼지 신장에서 얻은 DPIV가 첨가된 돼지 뇌하수체의 분쇄물에서 측정되는 바와 같이, DP IV 및 QC의 연속 촉매작용 후에 일어난다 (도 11). [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a는 QC-억제제 1,10-페난트롤린 (도 12) 또는 DP IV-억제제 Val-Pyrr (도 13)이 첨가될 때 형성되지 않았다. [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a의 약한 출현은, [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 2-11a의 형성으로 나타난 바와 같이, 아미노펩티다제 절단 및 후속적인 글루타민 잔기의 고리화에 의한 것이다.

4. 미정제 뇌하수체 분쇄물에서 아미노펩티다제(들)의 촉매작용에 의한 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a의 형성

DPIV 촉매작용에 의존되지 않는 [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a으로 인하여, DPIV를 첨가하지 않고, 미정제 뇌하수체 분쇄물에서 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 1-11a의 분해를 조사하였다 (도 14). 섹션 4의 데이터에서 예상되는 바와 같이, [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a 형성이 관측되었다. 이 데이터는 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 1-11a 분해가 또한 아미노펩티다제(들)에 의해 촉매될 수 있고, [pGlu<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a을 형성하는 결과를 낳는다는 것을 알려준다. 따라서, 그 결과는 이러한 조직에서, 피로글루타미드 형성이 N-말단 펩타이드 분해의 중점이라는 것을 나타내며, 플라크 형성에서의 QC의 역할을 지지하고 있다.

실시에 9: 재조합 사람 QC에 의한 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a; 3-21a 및 3-40의 턴오버

시험된 모든 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$  유도 펩타이드는 사람 QC에 의해 상응하는 피로글루타미드 형태로 효과적으로 전환되었다 (표 8). [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-21a 및 [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-40이 수성 용액에서 용해도가 낮기 때문에, 1% DMSO 존재하에서 결정이 이뤄졌다. 그러나, [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-11a의 더 나은 용해도 때문에, DMSO의 존재 및 무존재 하에서 QC-촉매 턴오버의 동적 분석이 가능했

다 (표 8). 종합하면, 8, 18 및 37개 아미노산의 사슬길이를 가진 QC-기질로서 AD 펩타이드를 조사한 결과(참조 표 8)는 사람 QC-활성은 기질의 길이와 같이 증가한다는 관측을 확증하였다. 따라서,  $\text{Gln}^1$ -가스트린,  $\text{Gln}^1$ -뉴로텐신, 및  $\text{Gln}^1$ -GnRH은, 특이성 상수를 고려할 때, 최고의 QC-기질들이다. 유사하게, 지금까지 조사된 가장 큰 QC-기질인  $[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -40 및 글루카곤은 1% DMSO의 존재하에서 초차 높은 이차 차수 속도 상수를 보인다 (각각,  $449 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  및  $526 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (표 8).

흥미롭게는, 조사된 아밀로이드 펩타이드의 전환에 대한 동적 변수가 커지는 크기에 대해 급격히 변화하지 않으며, 이는 QC 촉매작용에 대한 AD의 C-말단 부분의 온건한 효과를 제시하고 있다. 그러므로, 더 나은 용해도 및 실험 취급성으로 인해, 이러한 펩타이드들의 N-말단 아미노펩티다제 프로세싱에 관하여  $\text{A}\beta$ 의 더 작은 단편물,  $[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 1$ -11a,  $[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -11a 및  $\text{A}\beta 3$ -11a을 사용하여 조사하였다.

**[표 8]**

1 % DMSO 펩타이드 함유 완충액 용액에서 재조합 사람 QC에 의한 N-말단 Gln-포함 펩타이드의 전환에 대한 동적 변수

펩타이드	$K_M (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$
$[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -11a	$87 \pm 3^{\#}$	$55 \pm 1^{\#}$	$632 \pm 10^{\#}$
$[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -11a	$155 \pm 4$	$41.4 \pm 0.4$	$267 \pm 4$
$[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -21a	$162 \pm 12$	$62 \pm 3$	$383 \pm 10$
$[\text{Gln}^3]\text{A}\beta 3$ -40	$89 \pm 10$	$40 \pm 2$	$449 \pm 28$
글루카곤(3-29)	$19 \pm 1$	$10.0 \pm 0.2$	$526 \pm 17$

<sup>#</sup>DMSO 부재에서 측정됨

실시예 10: 재조합 사람 QC에 의한  $\text{A}\beta 3$ -11a 및  $\text{A}\beta 3$ -21a의 턴오버

QC 존재하에서  $\text{A}\beta 3$ -11a 및  $\text{A}\beta 3$ -21a의 항온처리로, 이전의 결과와는 달리, 글루타메이트-포함 펩타이드들이 QC-기질로서 또한 작용한다는 것이 밝혀졌다 (도 15C 및 D). QC-촉매하  $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta 3$ -11a 및  $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta 3$ -21a의 형성을 각각 pH 5.2 및 6.5에서 조사하였다. QC 첨가로 분석시작 전, 용액에 QC-억제제 벤즈이미다졸이 첨가되면,  $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta 3$ -11a 또는  $[\text{pGlu}^3]\text{A}\beta 3$ -21a를 결과로 낳는 기질 전환은 억제되었다 (도 15E 및 F). QC가 첨가전에 가열처리되면, pGlu-펩타이드 형성은 무시될 수 있을 정도이다(도 15A 및 B).

실시예 11: 파파야 QC-촉매하 Gln- $\beta$ NA 및 Glu- $\beta$ NA의 고리화의 pH-의존성

파파야 QC는 미카엘리스-멘텐 역학에 따라 Glu- $\beta$ NA를 최대 2 mM의 농도로 (이것은 기질 용해도에 의해 제한된다) 전환시켰다 (도 16). pH 6.1 및 8.5 사이에서 연구된, QC-촉매하 Glu- $\beta$ NA의 전환에 대한 턴오버 대 기질농도 그래프를 연구한 결과, 이러한 Glu-기질에 대해서, 두 가지 변수,  $K_M$  및  $k_{\text{cat}}$ 는 pH-의존적 방식으로 변화한다는 것이 나타났다 (도 16). 이것은,  $K_M$ 에서의 변화는 주어진 pH 범위에 걸쳐 관측된다는 이전에 설명된 QC-촉매하 글루타민 고리화와는 상반되는 것이다 (Gololobov, M. Y., Song, I., Wang, W., 및 Bateman, R. C. (1994) Arch Biochem Biophys 309,300-307).

후속적으로, Glu- 및 Gln-고리화 동안 양성자 농도의 충격을 연구하기 위해, 일차 차수 속도 법칙 조건 (즉  $K_M$  값 훨씬 아래의 기질 농도)하에서 Glu- $\beta$ NA 및 Gln- $\beta$ NA의 고리화의 pH-의존성을 조사하였다 (도 17). 글루타민의 고리화는 pH 8.0에서 pH-최적성을 가지며, 이는 pH 6.0에서 pH 최적성을 보이는 글루탐산의 고리화와는 상반된다. 각각의 최적 pH에서의 특이성 상수가 약 80,000 배 차이가 나는 반면, pH 6.0 근처에서의 QC 대 EC 활성의 비는 고작 약 8,000이다.

Gln-βNA로부터의 비효소성 pGlu 형성이 pH 6.0에서 조사되었고, 4 주간 후 일차 차수 속도 상수가  $1.2 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 임이 밝혀졌다. 그러나, 동일 기간동안 Glu-βNA로부터 어떠한 pGlu-βNA도 형성되지 않았고, 이는 턴오버에 대한 제한 속도 상수가  $1.0 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ 임을 추정할 수 있다.

실시에 12: 효소 불활성화/재활성화 과정

사람 QC의 분배물 (0.1-0.5 mg, 1 mg/ml)을 5 mM 1,10-페난트롤린 또는 5 mM dipicolinic acid 함유 0.05 M Bis-Tris/HCl, pH 6.8의 3000 배 용량에 대해 투석함으로 불활성화 시켰다. 후속적으로, 불활성화 제제를 1 mM EDTA를 함유한 0.05 M Bis-Tris/HCl, pH 6.8에 대하여 샘플을 투석시킴으로써 (3 회, 2000 배 초과용량) 조심스럽게 제거하였다.  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^{+}$  및  $\text{Co}^{++}$  이온들을, 0.5 mM EDTA를 함유한 0.025 M Bis-Tris, pH 6.8에서, 1.0, 0.5, 0.25 mM의 농도로 사용하여, 재활성 실험을 실온에서 15분간 실시하였다. 완충액 용액에 존재하는 미량 금속 이온들에 의한 빠른 활성화를 방지하기 위해, QC 활성 분석을 2 mM EDTA 함유 0.05 M Tris/HCl, pH 8.0에서 실시하였다.

1,10-페난트롤린에 의한 돼지 QC의 저해작용은 이미 설명되어 있다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J. 등. 2001 Biochemistry 40). 그러나, EDTA가 QC 촉매작용에 활성화 효과를 가진다고 나타난 사실은 페난트롤린에 의한 저해작용이 금속 킬레이션에 의한 것이 아니라는 것을 제시하고 있다 (Busby, W. H. J. 등. 1987 J Biol Chem 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J. 등. 2001 Biochemistry 40). 또한, 사람 QC 촉매하 기질 고리화가 1,10-페난트롤린에 의해 저해될 뿐 아니라, 금속효소의 다른 억제제인 디피콜린 산 및 8-하이드록시퀴놀린 존재하에서 폐지된다. 이러한 킬레이터들은 경쟁적 및 시간-의존성 방식으로 QC를 저해한다, 즉, 이미 경쟁적으로 저해된 초기 활성은 상기 화합물과 오래 항온처리한 후에 더 감소된다는 것이 나타났다 (도 18, 19). 흥미로운 것은, EDTA 항온처리 시간에 없이 또는 다른 조건하에서 현저한 저해작용을 보이지 않는다는 것이다.

사람 QC는 5 mM 1,10-페난트롤린 또는 5 mM 디피콜린 산에 대하여 막대한 양으로 투석한 후에는 거의 완전히 불활성화 되었다. 킬레이터가 없는 완충액 용액에 대해 밤새 반복적으로 투석하면, QC 활성은 부분적으로 최대 50-60%까지 재활성화되었다. 그러나, 1 mM EDTA 함유 완충액에 투석시, 아무런 재활성화가 관측되지 않았다.

디피콜린산 또는 1,10-페난트롤린에 의한 불활성화후 QC 활성의 거의 전면적인 복구가 상기 단백질을 0.5 mM EDTA 존재하에서 0.5 mM  $\text{ZnSO}_4$ 와 10분간 항온처리함으로써 달성되었다(도 20). 유사하게, QC 활성의 부분 복구는 재활성화를 위해  $\text{Co}^{++}$  및  $\text{Mn}^{++}$  이온을 사용함으로써 달성되었다. 심지어 0.25 mM  $\text{Zn}^{++}$  존재하에서도, 원래 활성의 25% 까지 재활성화가 가능하였다.  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  또는  $\text{K}^{+}$  이온들을 적용시 재활성화가 관측되지 않았다. 유사하게, 이러한 이온들과 완전히 활성인 QC와 항온처리하면 효소 활성에 영향이 없다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

c) 생체 내에서 글루타미닐 사이클라제(QC)의 활성을 조절하여 치료될 수 있는 포유동물의 질병의 치료 또는

d) QC 활성의 조절로 인한 pGlu-포함 펩타이드의 작용에 기초한, 생리학적 과정의 조절용 의약품 제조에 사용되는 글루타미닐 사이클라제 (QC) 이펙터의 용도.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, Aβ3-40/42, [Gln<sup>3</sup>]Aβ3-40/42, [Glu<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>1</sup>]가스트린류 (17 및 34), [Gln<sup>1</sup>]뉴로텐신, [Gln<sup>1</sup>]FPP, [Gln<sup>1</sup>]TRH, [Gln<sup>1</sup>]GnRH, [Gln<sup>1</sup>]CCL 2, [Gln<sup>1</sup>]CCL 7, [Gln<sup>1</sup>]CCL 8, [Gln<sup>1</sup>]CCL 16, [Gln<sup>1</sup>]CCL 18, [Gln<sup>1</sup>]ELA, [Gln<sup>1</sup>]프랙탈킨(Fractalkine), [Gln<sup>1</sup>]오렉신(Orexin) A, [Gln<sup>3</sup>]글루카곤 3-29 및 [Gln<sup>5</sup>]서브스탄스(Substance) P5-11로부터 선택된 하나 이상의 QC 기질에서 N-말단 글루탐산 또는 글루타민 잔기를 피로글루탐산 잔기로 전환하는 것을 변경하는데 사용되는 것인 용도.

**청구항 3.**

제 1 항에 있어서, 알츠하이머병 또는 다운 증후군의 치료에 사용되는 것인 용도.

**청구항 4.**

제 1 항에 있어서, 남성 생식능력 억제 및/또는 조절에 사용되는 것인 용도.

**청구항 5.**

제 1 항에 있어서, 헬리코박터 과일로리 감염에 의한 또는 무관한 궤양 질환 및 위암, 병원성 정신질환, 정신분열증, 불임 증, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 악성 전이, 흑색종, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로부터 선택되는 질병의 치료에 사용되는 것인 용도.

**청구항 6.**

제 1 항에 있어서, 위장관계 세포 증식의 자극, 위장 점막 세포인 상피 세포증식의 자극, 급성 산 분비의 자극과, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 세포를 분화시키는데 사용되는 것인 용도.

**청구항 7.**

제 1 항에 있어서, 골수성 모세포 증식을 억제하는데 사용되는 것인 용도.

**청구항 8.**

제 1 항에 있어서, 헌팅턴씨병 및 케네디씨병(Kennedy's disease)에서 선택되는 질병의 치료에 사용되는 것인 용도.

**청구항 9.**

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 QC 이펙터가 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제 및/또는 아미노펩티다제-억제제와 병용하여 투여되는 것인 용도.

**청구항 10.**

제 9 항에 있어서, DP IV-유사 효소의 H-isoAsp-Ala-OH 생성 활성이 차단되는 것인 용도.

**청구항 11.**

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서, 상기 DP IV-유사 효소가 DP II인 것인 용도.

**청구항 12.**

하나 이상의 QC 이펙터를, 임의로 통상적인 담체 및/또는 부형제와 조합하여 포함하는 것을 특징으로 하는 장관 외, 장관 내 또는 경구 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 13.**

하나 이상의 QC 이펙터를 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 하나 이상의 억제제 및/또는 하나 이상의 아미노펩티다제-억제제와 조합하여 포함하고, 임의로 통상적인 담체 및/또는 부형제와 조합하여 포함하는 것을 특징으로 하는 장관 외, 장관 내 또는 경구 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 14.**

QC, 및/또는 DP IV 및 DP IV-유사 효소, 및/또는 아미노펩티다제의 효소 활성을 생체 내에서 조절하는데 사용되는 것인 제 12 항 또는 제 13 항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

**청구항 15.**

제 14 항에 있어서, DP IV-유사 효소의 H-isoAsp-Ala-OH 생성 활성이 차단되는 것인 용도.

**청구항 16.**

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 상기 DP IV-유사 효소가 DP II인 것인 용도.

**청구항 17.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, A $\beta$ 3-40/42, [Gln<sup>3</sup>]A $\beta$ 3-40/42, [Glu<sup>11</sup>]A $\beta$ 11-40/42, [Gln<sup>11</sup>]A $\beta$ 11-40/42, [Gln<sup>1</sup>]가스트린류 (17 및 34), [Gln<sup>1</sup>]뉴로텐신, [Gln<sup>1</sup>]FPP, [Gln<sup>1</sup>]TRH, [Gln<sup>1</sup>]GnRH, [Gln<sup>1</sup>]CCL 2, [Gln<sup>1</sup>]CCL 7, [Gln<sup>1</sup>]CCL 8, [Gln<sup>1</sup>]CCL 16, [Gln<sup>1</sup>]CCL 18, [Gln<sup>1</sup>]ELA, [Gln<sup>1</sup>]프랙탈킨, [Gln<sup>1</sup>]오렉신 A로부터 선택된 하나 이상의 QC 기질에서 N-말단 글루탐산 또는 글루타민 잔기를 피로글루타미드 (5-옥소-프롤릴) 잔기로 전환하는 것을 변경하는데 사용되는 것인 용도.

**청구항 18.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 알츠하이머병 또는 다운 증후군을 치료하는 것인 용도.

**청구항 19.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, QC 이펙터를 투여하여 남성 생식능력을 조절하는 것인 용도.

**청구항 20.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 또는 무관한 궤양 질환 및 위암, 병원성 정신질환, 정신분열증, 불임증, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 악성 전이, 흑색종, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로 이루어지는 군으로부터 선택된 질병을 치료하는 것인 용도.

**청구항 21.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 위장관계 세포 증식의 자극, 위장 점막 세포인 상피 세포 증식의 자극, 급성 산 분비의 자극, 및 산 생성 제강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 세포를 분화시키는 것인 용도.

**청구항 22.**

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 골수성 모세포 증식을 억제하는 것인 용도.

**청구항 23.**

- a) 임의의 화합물과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 임의로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 QC의 활성 변경 이펙터를 확인하는 단계를 포함하는, QC 이펙터를 확인 및 선택하는 스크리닝 방법.

**청구항 24.**

- a) 임의의 화합물과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 임의로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 QC의 활성 변경 이펙터를 확인하는 단계를 포함하는, QC의 활성부위 결합 이온과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 이펙터를 확인 및 선택하는 스크리닝 방법.

**청구항 25.**

제 23 항 또는 제 24 항의 스크리닝 방법에 의해 확인된 QC 이펙터.

**청구항 26.**

하나 이상의 글루타미닐 사이클라제(QC) 이펙터의 치료학적으로 유효한 양을 포유동물에게 투여하여 Gln 또는 Glu 펩타이드 상에서 QC 활성을 조절하는 것을 포함하는,

a) 생체 내에서, QC 활성의 조절에 의해서, 또는

b) QC 활성의 조절로 유발되는 pGlu-포함 펩타이드의 작용에 기초한, 생리학적 과정의 조절에 의해 치료될 수 있는 포유 동물의 질병을 치료하는 방법.

### 청구항 27.

제 26 항에 있어서, Aβ3-40/42, [Gln<sup>3</sup>]Aβ3-40/42, [Glu<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>1</sup>]가스트린류 (17 및 34), [Gln<sup>1</sup>]뉴로텐신, [Gln<sup>1</sup>]FPP, [Gln<sup>1</sup>]TRH, [Gln<sup>1</sup>]GnRH, [Gln<sup>1</sup>]CCL 2, [Gln<sup>1</sup>]CCL 7, [Gln<sup>1</sup>]CCL 8, [Gln<sup>1</sup>]CCL 16, [Gln<sup>1</sup>]CCL 18, [Gln<sup>1</sup>]ELA, [Gln<sup>1</sup>]프랙탈킨, [Gln<sup>1</sup>]오렉신 A, [Gln<sup>3</sup>]글루카곤3-29 및 [Gln<sup>5</sup>]서브스 탄스(Substance) P5-11로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 QC 기질에서 N-말단 글루탐산 또는 글루타민 잔기가 피로글루탐산 잔기로 전환되는 것을 변경하는 것인 방법.

### 청구항 28.

제 26 항에 있어서, 알츠하이머병 또는 다운 증후군을 치료하는 것인 방법.

### 청구항 29.

제 26 항에 있어서, 상기 QC 활성의 조절이 남성 생식능력의 억제 및/또는 조절을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 30.

제 26 항에 있어서, 상기 질병이 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 또는 무관한 궤양 질환 및 위암, 병원성 정신질환, 정신 분열증, 불임증, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 악성 전이, 흑색종, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액 성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 31.

제 26 항에 있어서, 상기 치료가 위장관계 세포 증식의 자극, 위장 점막 세포인 상피세포 증식의 자극, 및 급성 산 분비의 자극과, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 세포의 분화를 일으키는 것인 방법.

### 청구항 32.

제 26 항에 있어서, 상기 치료가 골수성 모세포 증식을 억제하는 것인 방법.

### 청구항 33.

제 26 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 QC 이펙터가 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제 및/또는 아미노 펩티다제-억제제와 병용하여 투여되는 것인 방법.

**청구항 34.**

제 33 항에 있어서, DP IV-유사 효소의 H-isoAsp-Ala-OH 생성 활성이 차단되는 것인 방법.

**청구항 35.**

제 34 항에 있어서, 상기 DP IV-유사 효소가 DP II인 것인 방법.

**청구항 36.**

하나 이상의 QC 이펙터를 임의로 치료학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제와 조합하여 포함하는, 장관 외, 장관 내 또는 경구 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 37.**

제 36 항에 있어서, 추가로 하나 이상의 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제 및/또는 하나 이상의 아미노펩티다제-억제제를 포함하여서 되는 것인 약제학적 조성물.

**청구항 38.**

제 36 항 또는 제 37 항에 따른 약제학적 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는,

a) 생체 내에서 QC 활성의 조절에 의해서, 및/또는

b) 생체 내에서 QC 활성 및/또는 DP IV 및 DP IV-유사 효소의 활성 및/또는 아미노펩티다제 활성의 조절로 유발되는 pGlu-포함 펩타이드의 작용에 기초한, 생리학적 과정의 조절에 의해 치료될 수 있는 상기 포유동물의 질병을 치료하는 방법.

**청구항 39.**

제 38 항에 있어서, Aβ3-40/42, [Gln<sup>3</sup>]Aβ3-40/42, [Glu<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>11</sup>]Aβ11-40/42, [Gln<sup>1</sup>]가스트린류 (17 및 34), [Gln<sup>1</sup>]뉴로텐신, [Gln<sup>1</sup>]FPP, [Gln<sup>1</sup>]TRH, [Gln<sup>1</sup>]GnRH, [Gln<sup>1</sup>]CCL 2, [Gln<sup>1</sup>]CCL 7, [Gln<sup>1</sup>]CCL 8, [Gln<sup>1</sup>]CCL 16, [Gln<sup>1</sup>]CCL 18, [Gln<sup>1</sup>]ELA, [Gln<sup>1</sup>]프랙탈킨, [Gln<sup>1</sup>]오렉신 A로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 QC 기질에서 N-말단 글루탐산 또는 글루타민 잔기를 피로글루타밀 (5-옥소-프롤릴) 잔기로 전환하는 것을 변경하는 것인 방법.

**청구항 40.**

제 38 항에 있어서, 알츠하이머병 또는 다운 증후군을 치료하는 것인 방법.

**청구항 41.**

제 38 항에 있어서, 남성 생식 능력을 조절하는 것인 방법.

#### 청구항 42.

제 38 항에 있어서, 케양 질환, 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 또는 무관한 위암, 병원성 정신질환, 정신분열증, 불임증, 신생물 형성, 염증성 숙주 반응, 암, 악성 전이, 흑색종, 건선, 류마티스 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 체액성 및 세포-매개성 면역반응 장애, 내피조직으로의 백혈구 흡착 및 이동 과정, 음식 섭취 장애, 수면-각성 상태, 에너지 대사의 항상성 조절 장애, 자율신경 기능 장애, 호르몬 균형 장애 및 체액 조절 장애로 이루어지는 군으로부터 선택된 질병을 치료하는 것인 방법.

#### 청구항 43.

제 38 항에 있어서, 위장관계 세포 증식을 자극하고, 위장 점막 세포인 상피 세포의 증식과 급성 산 분비 증식을 자극하고, 산 생성 체강벽 세포 및 히스타민-분비 장크롬친화성-유사 세포의 분화를 자극하는 것인 방법.

#### 청구항 44.

제 38 항에 있어서, 골수성 모세포 증식을 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 45.

- a) 임의의 화합물과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 임의로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 QC의 활성 변경 이펙터를 확인하는 단계를 포함하는, QC의 활성 이펙터를 확인 및 선택하는 스크리닝 방법.

#### 청구항 46.

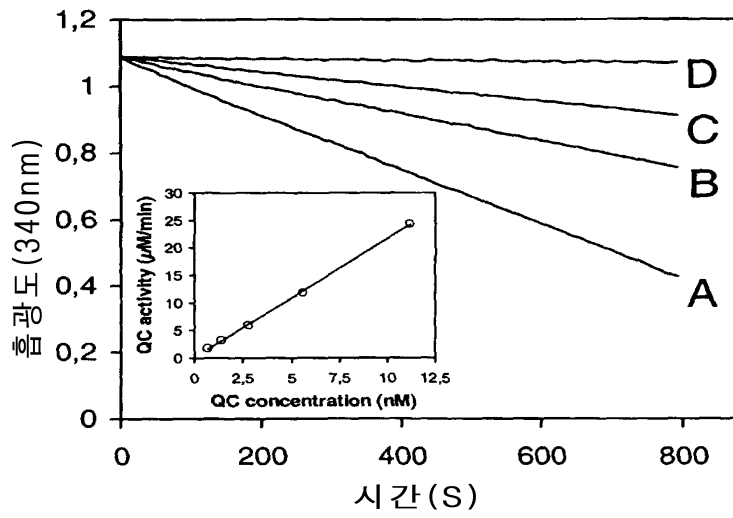
- a) 임의의 화합물과 QC를 이들 간에 결합을 허용할 수 있는 조건 하에서 접촉시키고;
- b) QC에 의해 전환되는 QC의 기질을 첨가하고;
- c) 기질의 전환을 관측하거나 또는 임의로 잔류 QC 활성을 측정하고;
- d) 기질 전환 및/또는 QC의 효소 활성에서의 변화를 계산하여 변화가 QC의 활성 변경 이펙터를 확인하는 데 사용하는 단계를 포함하는, QC의 활성부위 결합 금속이온과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 이펙터를 확인 및 선택하는 스크리닝 방법.

#### 청구항 47.

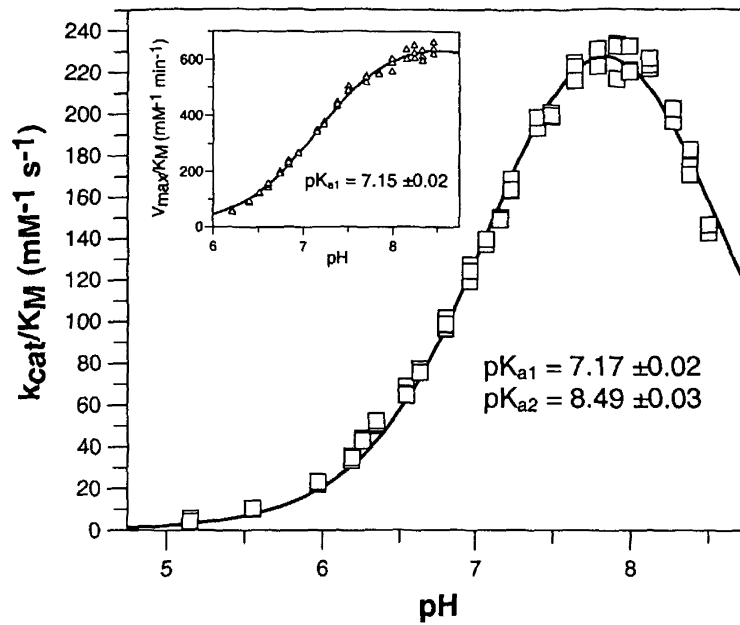
제 45 항 또는 제 46 항의 스크리닝 방법에 의해 확인된 QC의 이펙터.

도면

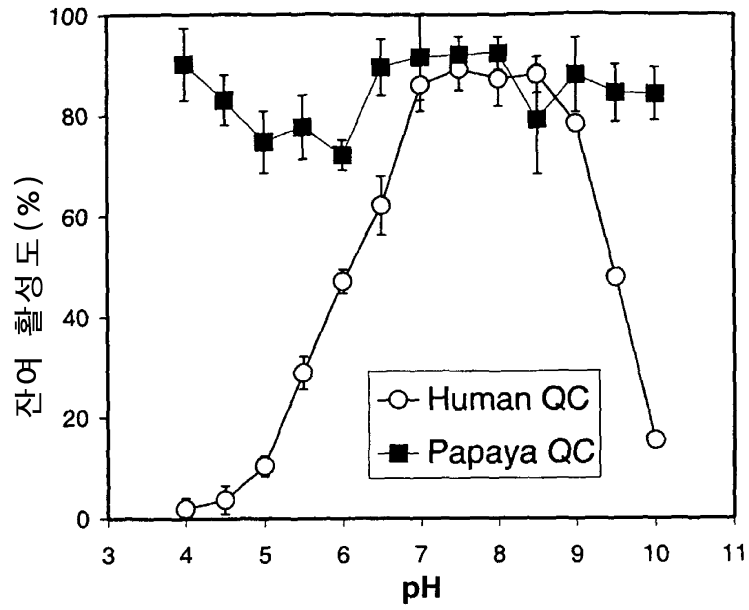
도면1



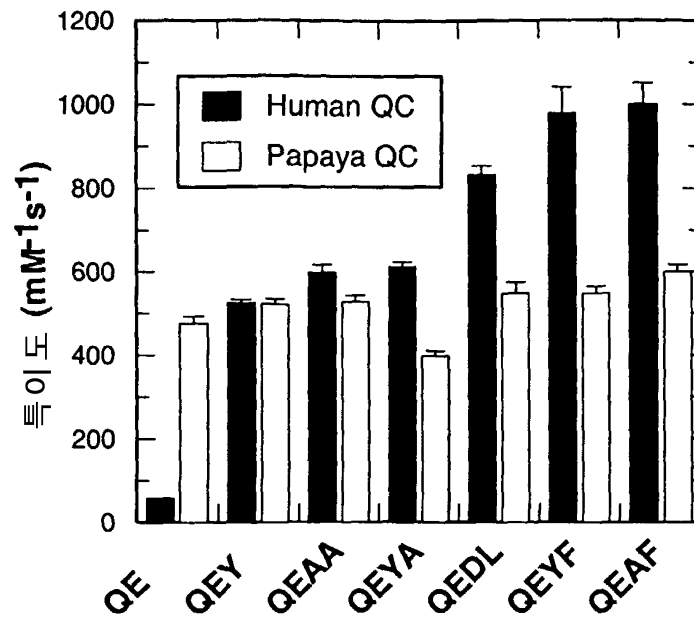
도면2



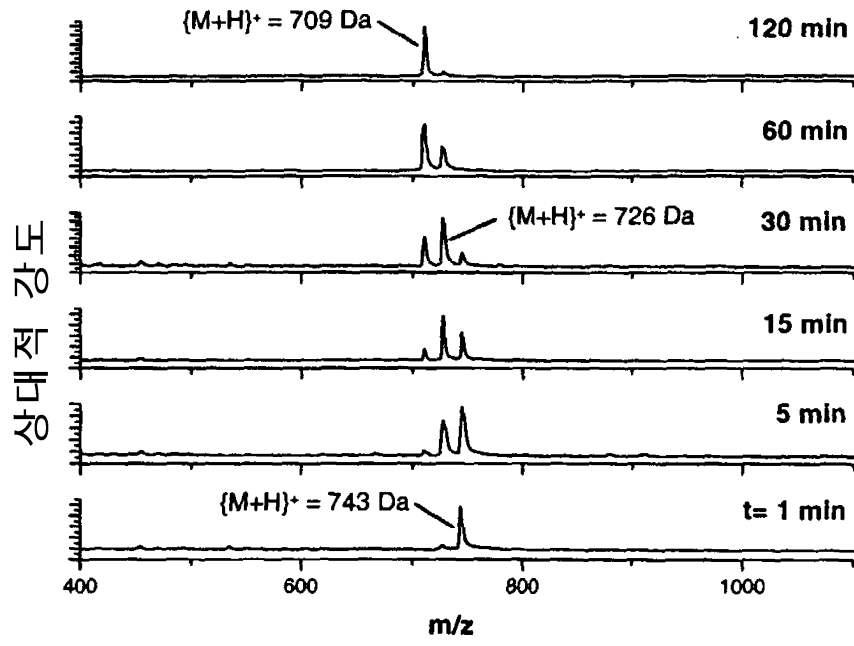
도면3



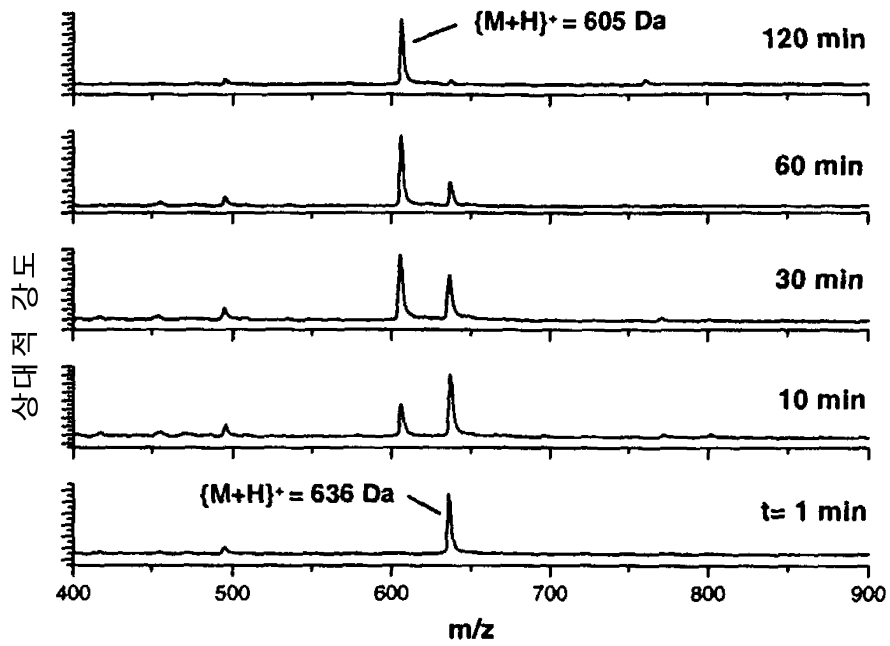
도면4



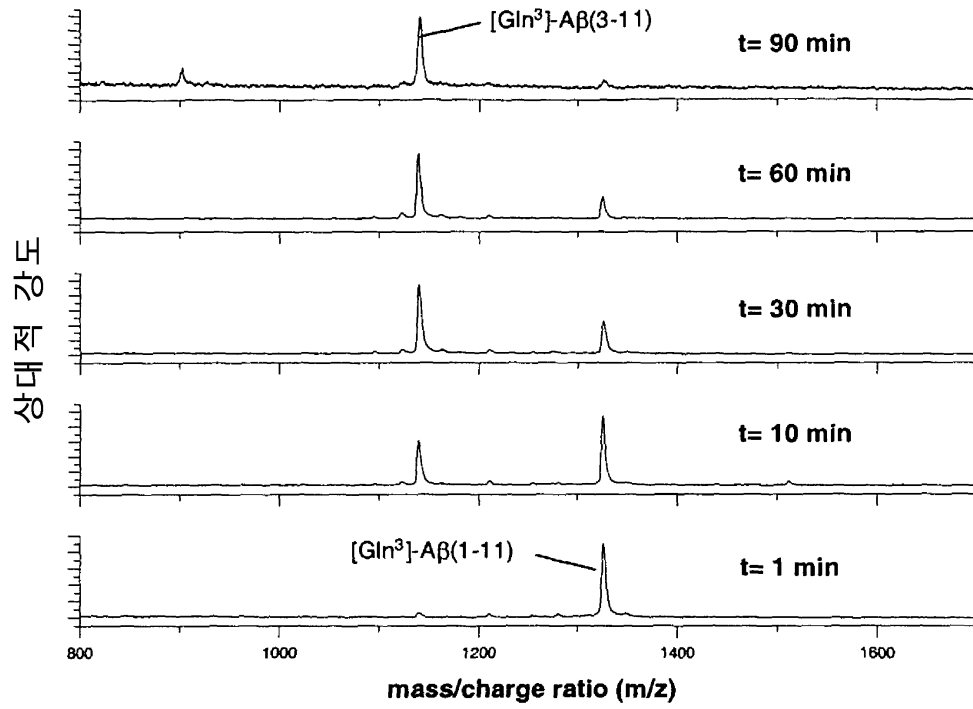
도면5



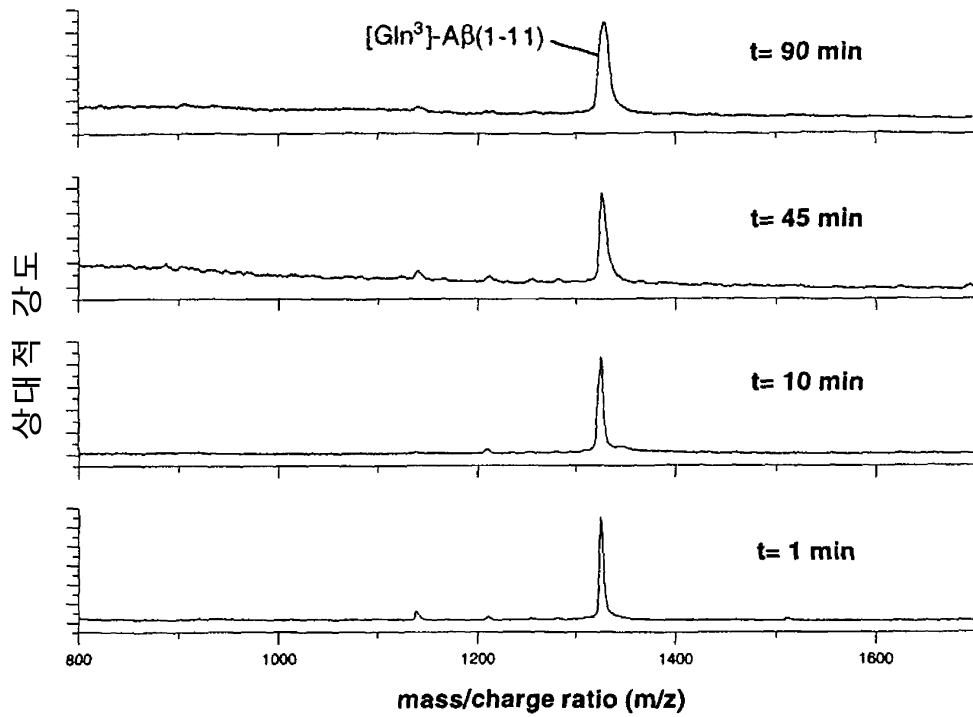
도면6



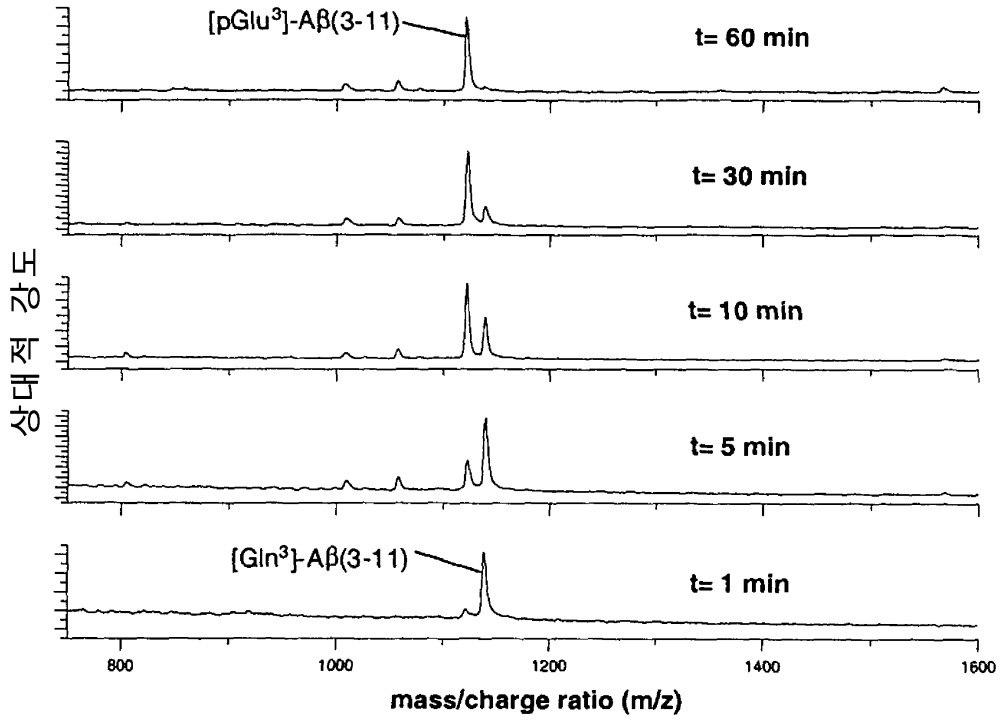
도면7



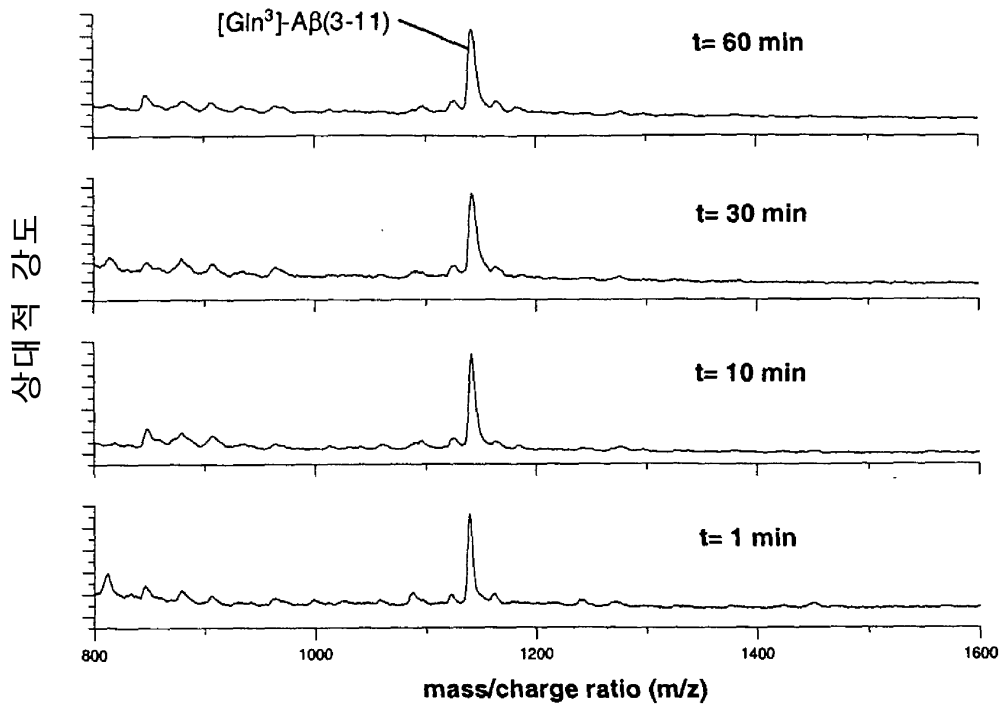
도면8



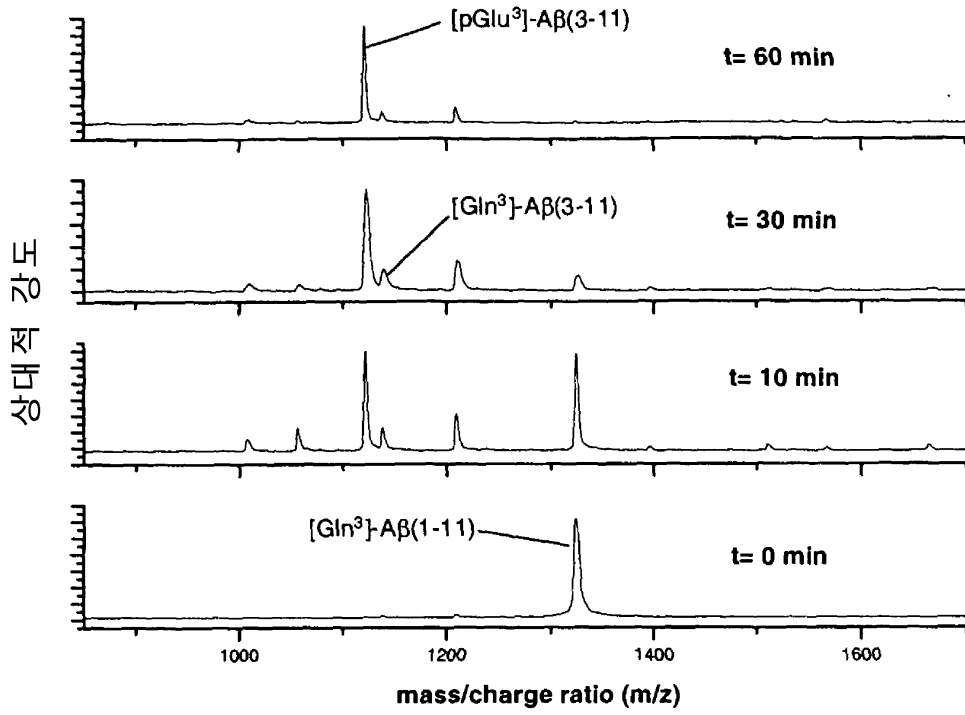
도면9



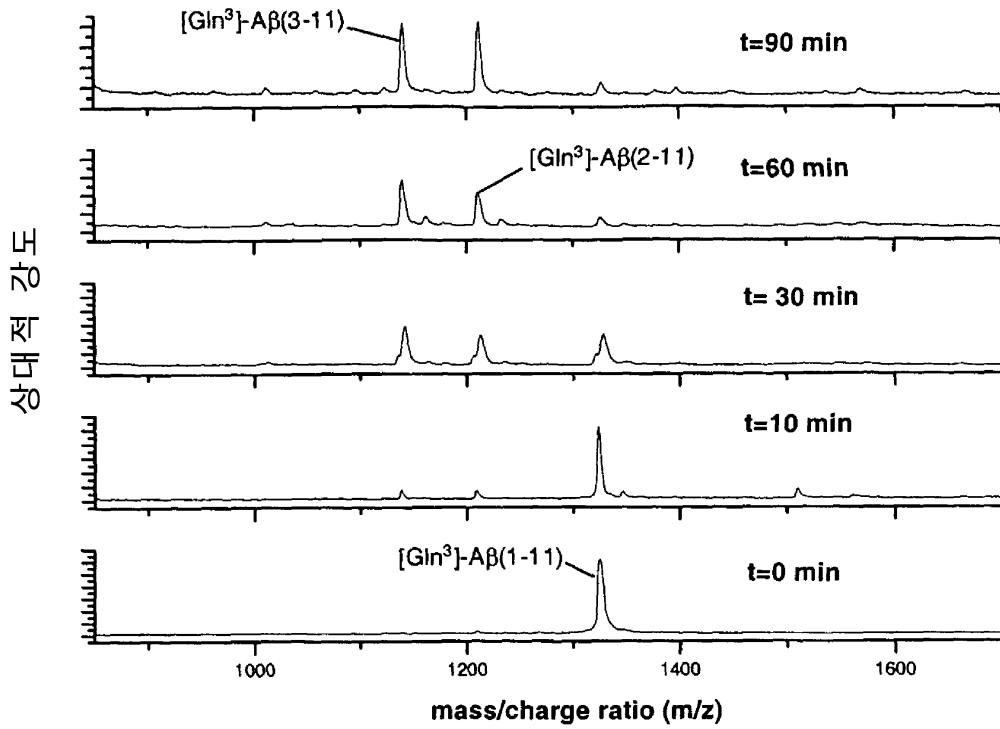
도면10



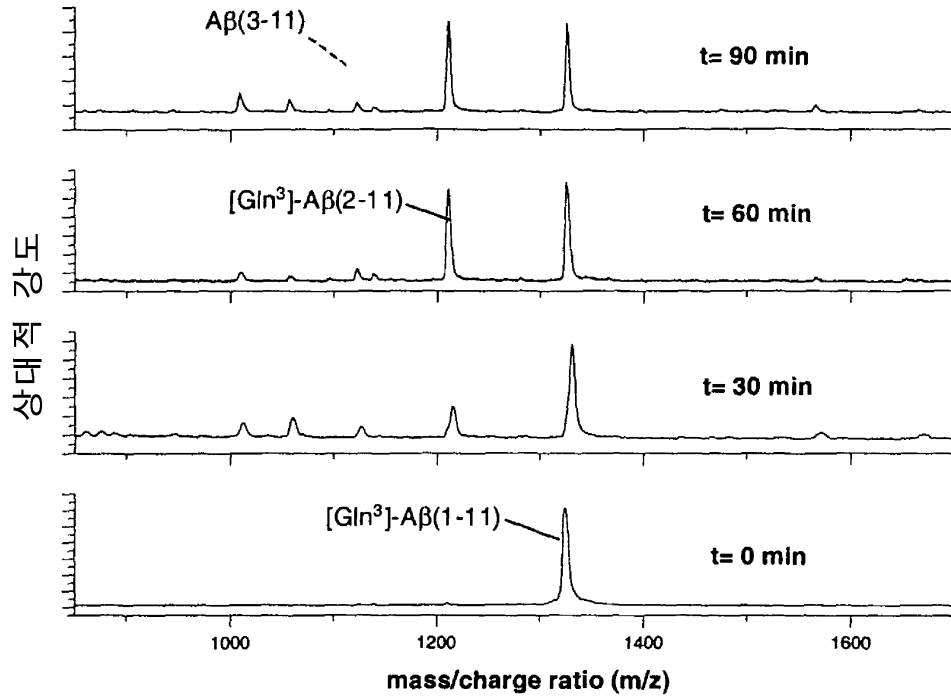
도면11



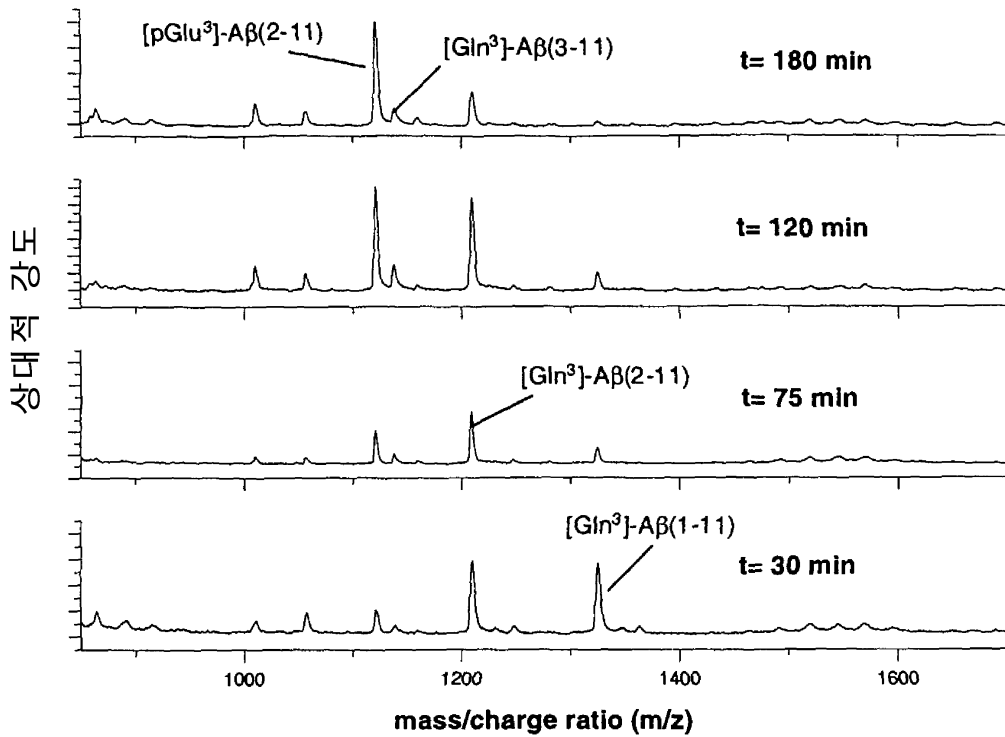
도면12



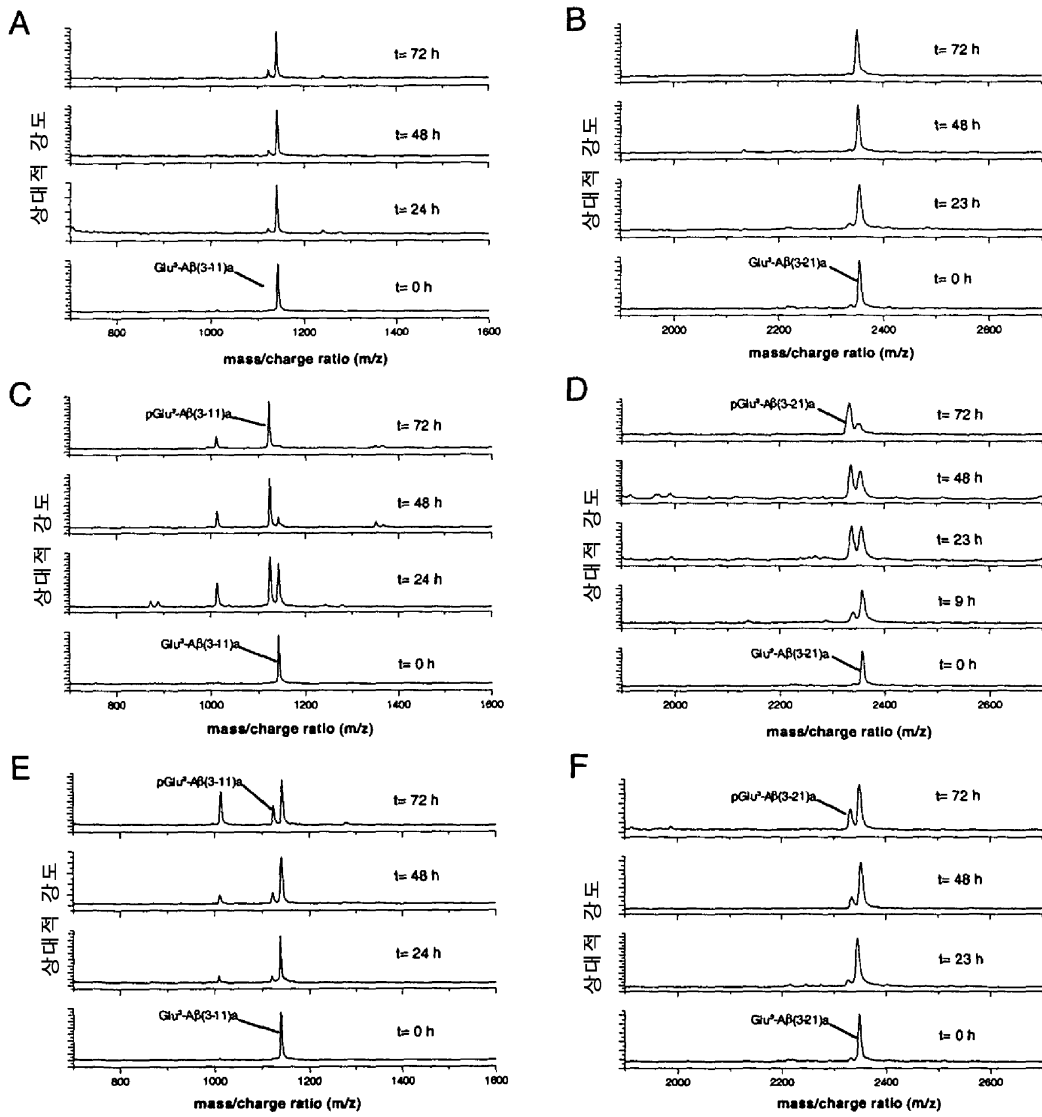
도면13



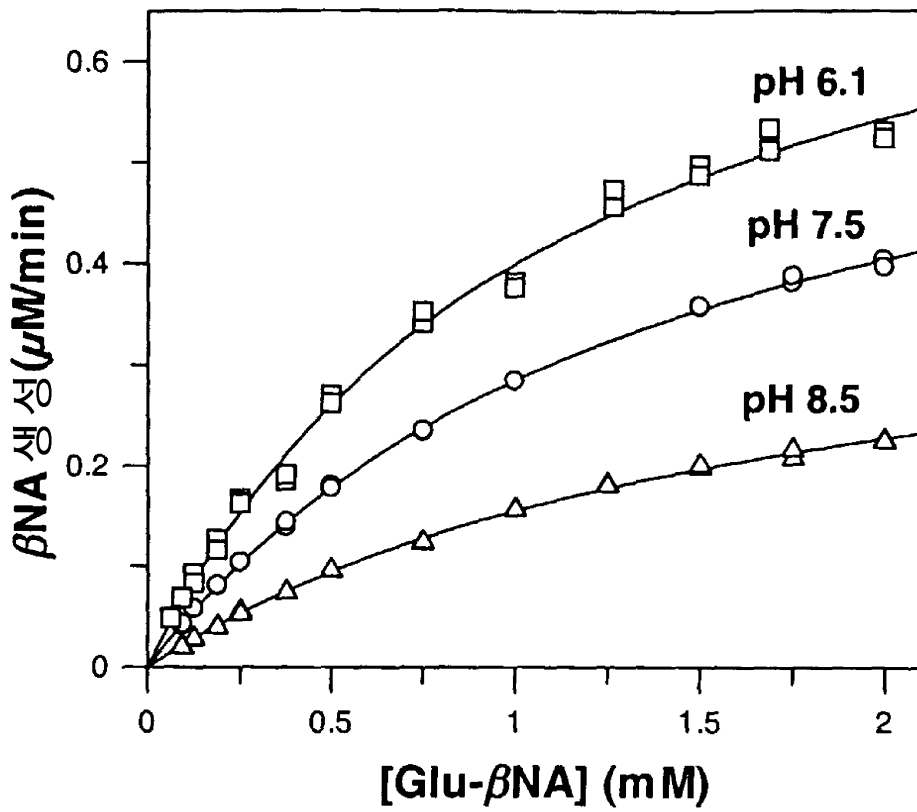
도면14



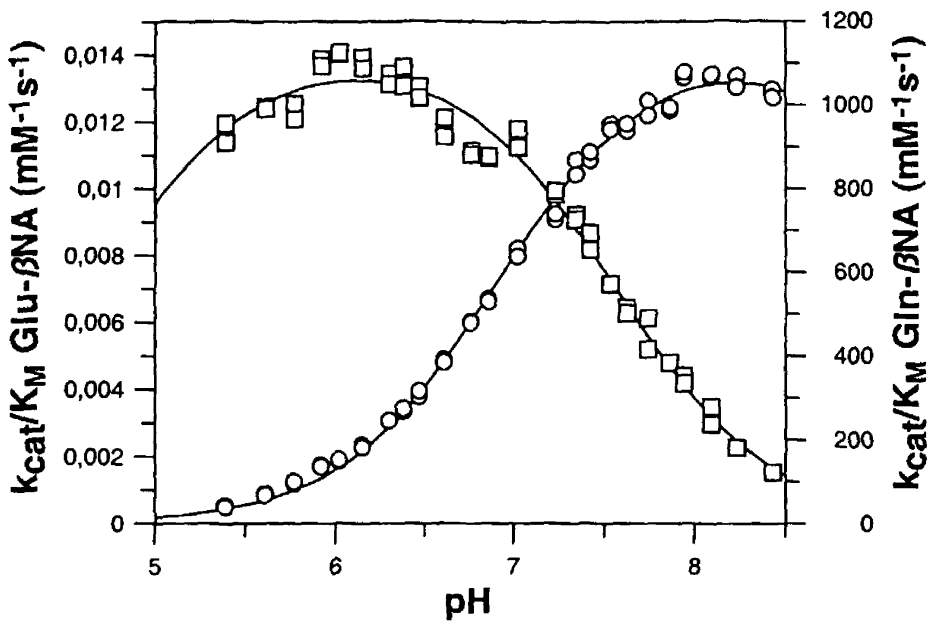
도면15



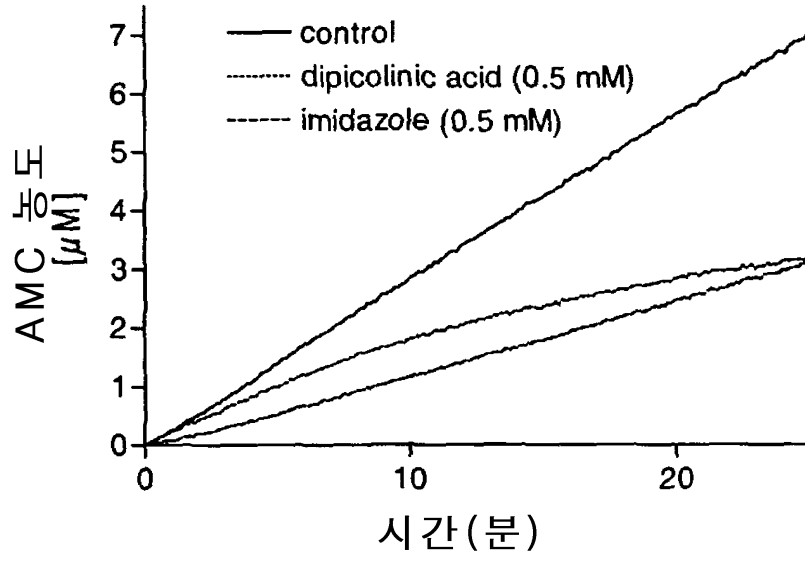
도면16



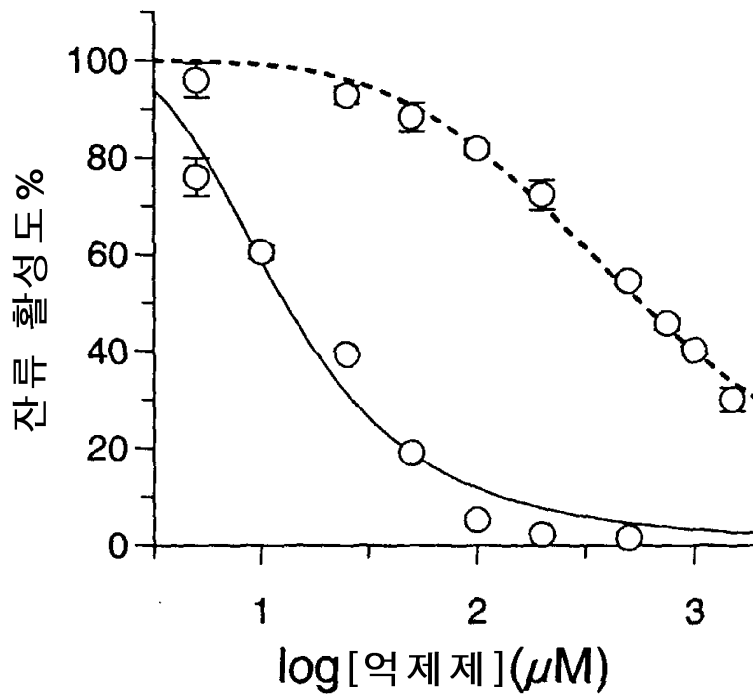
도면17



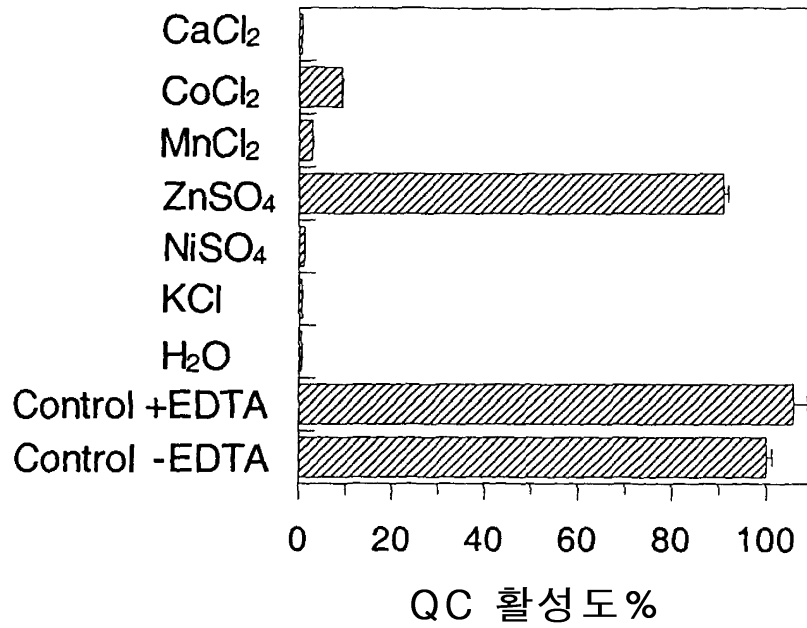
도면18



도면19



도면20



도면21

```

hQC      MAGGRHRRVVGTLHLLLLVAALPWASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAILNSSALRQIAEGT
SGAP     -----APDIPLANVKAHLTQLS
hgCp II  -----ANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQ-K
                * *                : :

hQC      SISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSAARQHIMQRIQLQADWVLEIDTFLSQTPTYGYRSF
SGAP     TIAAN--NGGN-----RAHGRPGYKASVDYVKAKLD--AAGYTTLQQFPTSGGATGYNLI
hgCp II  LLEKM--GGSAP---PDSWRGSLKVPYVVGPGFTGNFSTQVKMHIHSTNEVTRIYNVI
                :   ..           . . . :           : . . . * . :

hQC      SNII STLNPTAKRHLVLACHYDSKYF SHWNNRVFVGATDSAVPCAMMLELAR---ALDKK
SGAP     ANWPG-GDP--NKVLMAGAHLDL--VSSG-----AGINDNGSGSAAVLETAL---AVSRA
hgCp II  GTLRGAVEP--DRYVILGGHRDS-----W-----VFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKE
                . . . : * : : : . * * *           * * * . * : * . : : :

hQC      LLSLKTVSDSKPDLSQLIFFDGEAEFLHWSPQDSLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQ
SGAP     GY--Q-----PDKHLRFAWWGAEEELGLIGS---KPY-----VNNLPSADR--SK
hgCp II  GW--R-----PRRTILFASWDAEEFGLLGS---TEW-----AEENSR--LLQ
                :   * : : : . * * * * * . :           * :

hQC      LHGM DLLVLLDLIGAPNPTFPNFF--PNSARWFERLQAIHEHLH---ELGLLKDHSLEGR
SGAP     LAG---YLNFDMIGSPNPGYFVYDDDPVIEKTFKNYFAGLNVPT---EIETEGDGRSDHA
hgCp II  ERG-VAYINADSSIEGNYTLRV DCT-PLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKS
                * : * * * * * . . . : * :

hQC      Y---FQNYSY---G-G-----VIQDD-HIPFLRRGVP-VLHLIPSPFPEVWHTMDDNEE
SGAP     P---FKNVGVP--VG-G-----LFTGAGYTKSAAQAQK-WGGTAGQAFDRCYHSSCDSLS
hgCp II  PSPEFSGMPRIKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGY-P-LYHSVYETYE
                * . . * * . :           :           . : : * : : .

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

서열목록

<110> Probiodrug AG

<120> Use of effectors of Glutaminyl and Glutamate Cyclases

<150> PCT/EP2004/004778

<151> 2004-05-05

<150> US60/468,043

<151> 2003-05-05

<150> US60/468,014

<151> 2003-05-05

<150> US60/512,038

<151> 2003-10-15

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
 35 40

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 35 40

<210> 4

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val  
 35

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> AMIDATION

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu  
 1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)

<223> AMIDATION

<400> 6

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu

1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> AMIDATION

<400> 7

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

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala

20

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> AMIDATION

<400> 8  
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala

<210> 9  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 9  
 Gln Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val  
 35

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)  
 <223> AMIDATION

<400> 10  
 Gln Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)  
 <223> AMIDATION

<400> 11  
 Asp Ala Gln Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)  
 <223> AMIDATION

<400> 12  
 Gln Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu  
 1 5

<210> 13  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic peptide

<400> 13  
 Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser



<400> 16  
 Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser  
 1 5 10 15

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile  
 20 25 30

<210> 17  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 17  
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val Ile  
 35

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)  
 <223> AMIDATION

<400> 18  
 Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp  
 1 5 10 15

Phe

<210> 19

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19  
 Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)  
 <223> AMIDATION

<400> 20  
 Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Gln Pro Lys Val Pro Glu Trp Val Asn Thr Pro Ser Thr Cys Cys Leu  
 1 5 10 15

Lys Tyr Tyr Glu Lys Val Leu Pro Arg Arg Leu Val Val Gly Tyr Arg  
 20 25 30

Lys Ala Leu Asn Cys His Leu Pro Ala Ile Ile Phe Val Thr Lys Arg  
 35 40 45

Asn Arg Glu Val Cys Thr Asn Pro Asn Asp Asp Trp Val Gln Glu Tyr  
 50 55 60

Ile Lys Asp Pro Asn Leu Pro Leu Leu Pro Thr Arg Asn Leu Ser Thr  
 65 70 75 80

Val Lys Ile Ile Thr Ala Lys Asn Gly Gln Pro Gln Leu Leu Asn Ser  
 85 90 95

Gln

<210> 22  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile  
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr  
 20 25 30

Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly  
 35 40 45

Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met  
 50 55 60

Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro  
 65 70 75

<210> 23  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
 20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met  
 50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
 65 70 75

<210> 24  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Gln Val Gly Thr Asn Lys Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp



165 170 175

Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser  
 180 185 190

Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser  
 195 200 205

Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp  
 210 215 220

Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro  
 245 250 255

Gly Ser Met Ala His Val Ser Val Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr  
 260 265 270

Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu  
 275 280 285

Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile  
 290 295 300

Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala Ala Thr Arg Arg Gln Ala Val Gly  
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Phe Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Gly Val Ala Met Phe  
 325 330 335

Thr Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Cys Pro Arg Lys Met Ala Gly Glu Met  
 340 345 350

Ala Glu Gly Leu Arg Tyr Ile Pro Arg Ser Cys Gly Ser Asn Ser Tyr  
 355 360 365

Val Leu Val Pro Val  
 370

<210> 26  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr

20

25

30

Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met  
 50 55 60

Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
 65 70 75

<210> 27  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 Gln Pro Leu Pro Asp Cys Cys Arg Gln Lys Thr Cys Ser Cys Arg Leu  
 1 5 10 15

Tyr Glu Leu Leu His Gly Ala Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr  
 20 25 30

Leu

<210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28  
 Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5 10