



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101903038 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 200880106098.1

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2008.07.10

代理人 赵苏林 郭文洁

(30) 优先权数据

60/948976 2007.07.10 US

60/987661 2007.11.13 US

(51) Int. Cl.

A61K 38/46(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/069659 2008.07.10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/009669 EN 2009.01.15

(71) 申请人 纽约市哥伦比亚大学信托人

地址 美国纽约

申请人 密执安大学评议会

(72) 发明人 J·H·伍德 D·兰德里 J·麦唐纳

M·N·斯托亚诺维克

R·K·苏纳哈拉 D·纳拉辛罕

J·J·G·特斯默 R·L·布赖姆

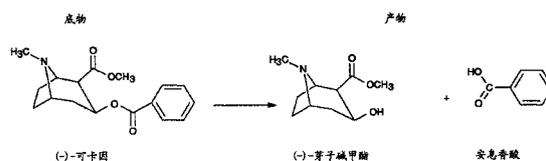
权利要求书 9 页 说明书 39 页 附图 36 页

(54) 发明名称

蛋白的热稳定化

(57) 摘要

本发明提供包括可卡因酯酶(CocE)和热稳定化CocE的化合物的组合物。还提供热稳定化可卡因酯酶的方法。此外还提供治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法。还提供确定化合物是否是蛋白热稳定剂的方法。另外提供上述组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。还提供编码具有取代L169K和G173Q的CocE多肽的分离的核酸,和由该核酸编码的CocE多肽,及其药物组合物。还提供该组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物和治疗可卡因诱导状况中的用途。



1. 一种包括可卡因酯酶 (CocE) 和化合物的组合物, 其中所述化合物存在条件下的 CocE 比所述化合物不存在条件下的 CocE 更加热稳定。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中 CocE 包括与 SEQ ID NO :1 至少 90% 相同的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 的组合物, 其中 CocE 包括与 SEQ ID NO :1 至少 95% 相同的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 的组合物, 其中 CocE 包括与 SEQ ID NO :1 至少 99% 相同的氨基酸序列。

5. 权利要求 1 的组合物, 其中 CocE 包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

6. 权利要求 1 的组合物, 其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体, 所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

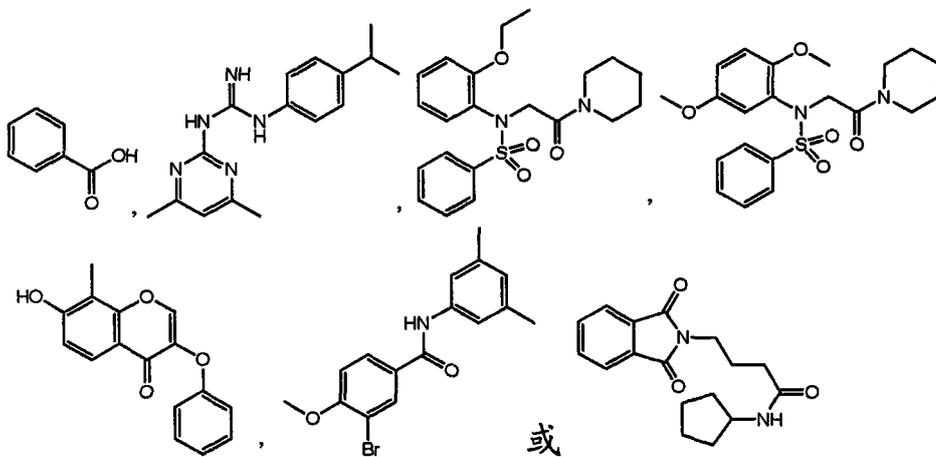
7. 权利要求 6 的组合物, 其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, 或 A194K, 或其任意组合之外。

8. 权利要求 6 的组合物, 其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

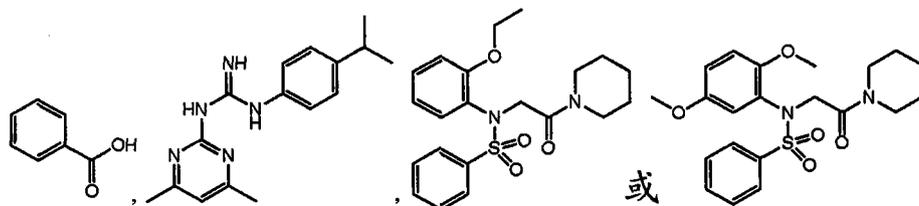
9. 权利要求 6 的组合物, 其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 L169K/G173Q 之外。

10. 权利要求 1-9 中任意一项的组合物, 其中 CocE 是聚乙二醇化的。

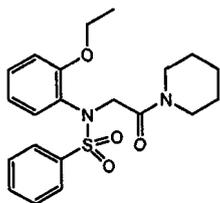
11. 权利要求 1-10 中任意一项的组合物, 其中所述化合物是



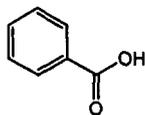
12. 权利要求 11 的组合物, 其中所述化合物是



13. 权利要求 11 的组合物, 其中所述化合物是



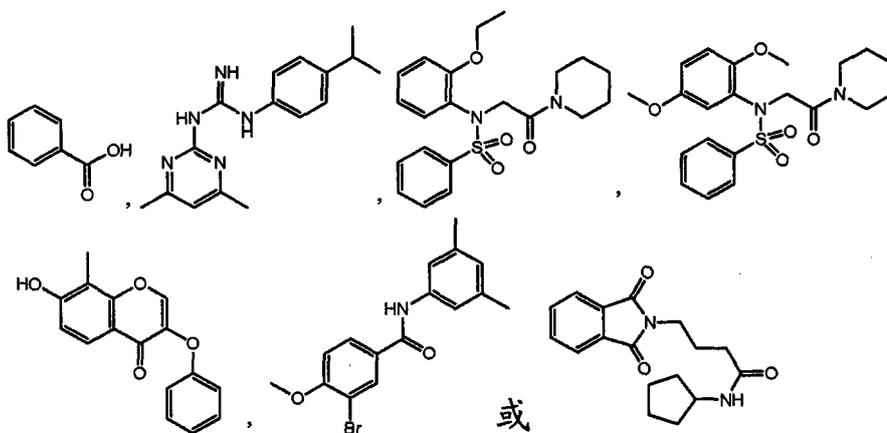
14. 权利要求 11 的组合物,其中所述化合物是



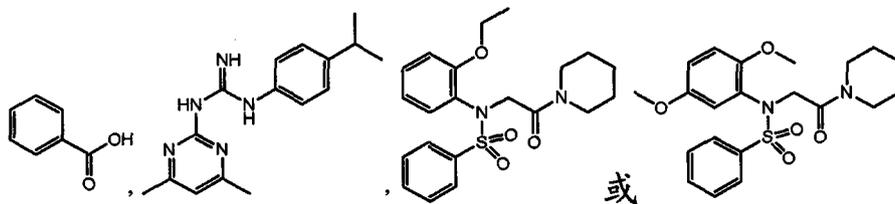
15. 权利要求 11 的组合物,其包括所述化合物中的不止一种。

16. 权利要求 1-15 中任意一项的组合物,其位于药学上可接受的载体中。

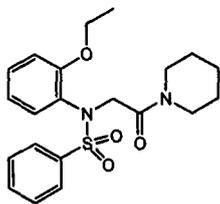
17. 一种热稳定化可卡因酯酶 (CocE) 的方法,所述方法包括将 CocE 与下列化合物组合



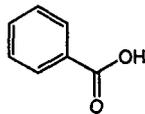
18. 权利要求 17 的方法,其中所述化合物是



19. 权利要求 17 的方法,其中所述化合物是



20. 权利要求 17 的方法,其中所述化合物是



21. 权利要求 17 的方法,其中 CocE 与所述化合物中的不止一种组合。

22. 权利要求 17-21 中任意一项的方法,其中 CocE 包括与 SEQID NO :1 至少 90% 相同的氨基酸序列。

23. 权利要求 17-21 中任意一项的方法,其中 CocE 包括与 SEQID NO :1 至少 95%相同的氨基酸序列。

24. 权利要求 17-21 中任意一项的方法,其中 CocE 包括与 SEQID NO :1 至少 99%相同的氨基酸序列。

25. 权利要求 17-21 中任意一项的方法,其中 CocE 包括 SEQ IDNO :1 的氨基酸序列。

26. 权利要求 17-24 中任意一项的方法,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

27. 权利要求 26 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

28. 权利要求 26 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

29. 权利要求 17-28 中任意一项的方法,其中 CocE 位于体外。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述化合物在 CocE 纯化期间与 CocE 组合。

31. 权利要求 29 的方法,其中所述化合物在 CocE 保存期间与 CocE 组合。

32. 权利要求 17-27 中任意一项的方法,其中 CocE 位于活的哺乳动物中。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述哺乳动物是人。

34. 一种治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法,所述方法包括以足以降低所述可卡因诱导状况对哺乳动物影响的方式给所述哺乳动物施用权利要求 16 的组合物。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述哺乳动物是人。

36. 权利要求 34 或 35 的方法,其中所述可卡因诱导状况是服用可卡因过量,可卡因毒性,可卡因成瘾,或可卡因依赖。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述哺乳动物对可卡因成瘾。

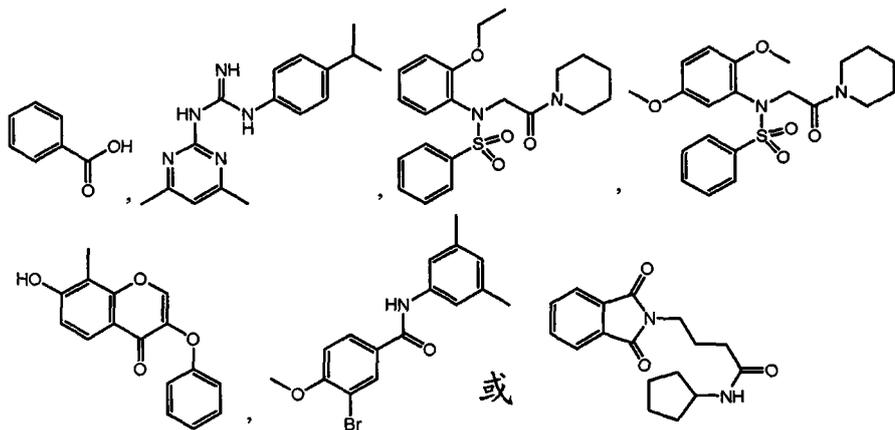
38. 权利要求 36 的方法,其中所述哺乳动物服用可卡因过量。

39. 权利要求 34-38 中任意一项的方法,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

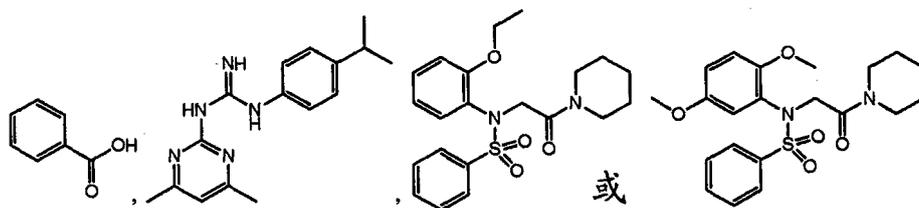
40. 权利要求 39 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

41. 权利要求 39 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

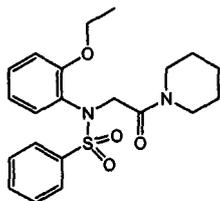
42. 权利要求 34-41 中任意一项的方法,其中所述化合物是



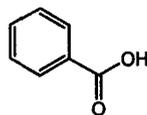
43. 权利要求 42 的方法,其中所述化合物是



44. 权利要求 42 的方法,其中所述化合物是



45. 权利要求 42 的方法,其中所述化合物是



46. 权利要求 42 的方法,其中所述组合物包括所述化合物中的不止一种。

47. 一种治疗服用可卡因过量的哺乳动物的方法,所述方法包括以足以降低所述可卡因对哺乳动物影响的方式给所述哺乳动物施用权利要求 16 的组合物。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述哺乳动物是人。

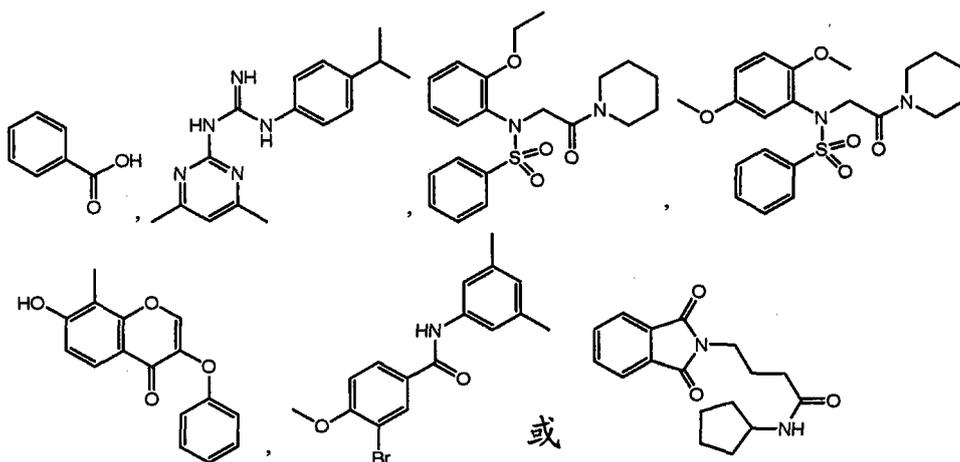
49. 权利要求 47 或者 48 的方法,其中将所述组合物给哺乳动物静脉内施用。

50. 权利要求 47-49 中任意一项的方法,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

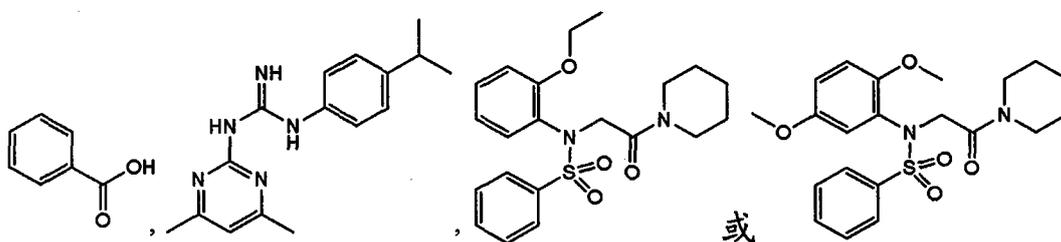
51. 权利要求 50 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

52. 权利要求 50 的方法,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

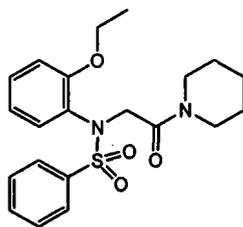
53. 权利要求 47-52 中任意一项的方法,其中所述化合物是



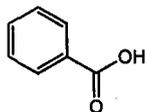
54. 权利要求 53 的方法,其中所述化合物是



55. 权利要求 53 的方法,其中所述化合物是



56. 权利要求 53 的方法,其中所述化合物是



57. 权利要求 53 的方法,其中所述组合物包括所述化合物中的不止一种。

58. 一种治疗患有可卡因依赖的哺乳动物的方法,所述方法包括以足以降低所述可卡因依赖对哺乳动物影响的方式给所述哺乳动物施用权利要求 16 的组合物。

59. 权利要求 58 的方法,其中所述哺乳动物是人。

60. 权利要求 58 或者 59 的方法,其中将所述组合物给哺乳动物静脉内施用。

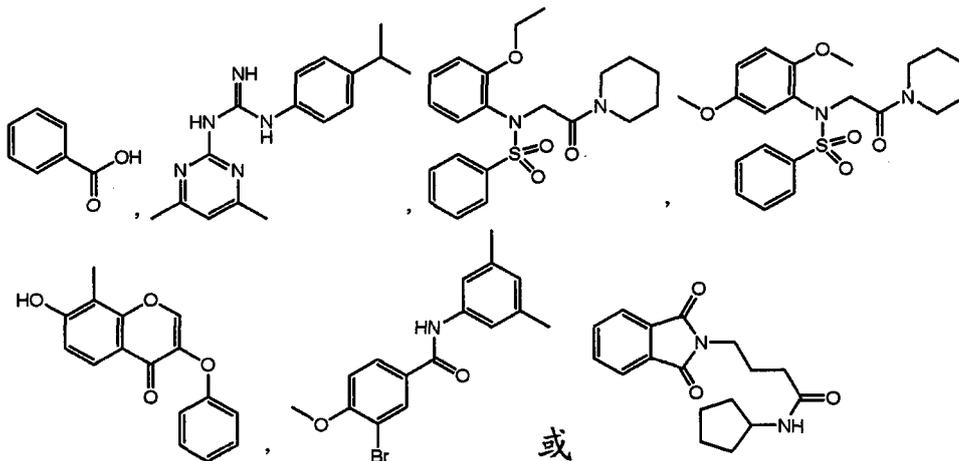
61. 权利要求 60 的方法,其中通过小输液泵施用所述组合物。

62. 权利要求 58-61 中任意一项的方法,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

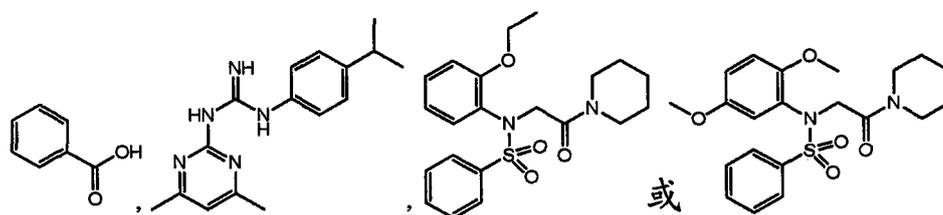
63. 权利要求 58-62 中任意一项的方法,其中 CocE 具有 SEQ IDNO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q 或 T172R/G173Q 之外。

64. 权利要求 58-62 中任意一项的方法,其中 CocE 具有 SEQ IDNO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

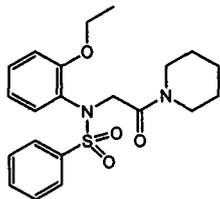
65. 权利要求 58-64 中任意一项的方法,其中所述化合物是



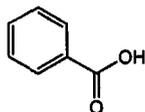
66. 权利要求 65 的方法,其中所述化合物是



67. 权利要求 65 的方法,其中所述化合物是



68. 权利要求 65 的方法,其中所述化合物是



69. 权利要求 65 的方法,其中所述组合物包括所述化合物中的不止一种。

70. 一种确定化合物是否是蛋白热稳定剂的方法,所述方法包括在有和没有所述化合物的条件下检测蛋白的热稳定性,其中使蛋白热稳定性更高的化合物是该蛋白的热稳定剂。

71. 权利要求 70 的方法,其中所述蛋白是酶。

72. 权利要求 70 的方法,其中所述蛋白是蛋白酶。

73. 权利要求 70 的方法,其中所述蛋白是酯酶。

74. 权利要求 70 的方法,其中所述蛋白是可卡因酯酶。

75. 权利要求 70-74 中任意一项的方法,其中存在于组合物中的所述化合物的浓度低于约 1mM。

76. 权利要求 70-75 中任意一项的方法,其中存在于组合物中的所述化合物的浓度低于约 0.1mM。

77. 权利要求 70-77 中任意一项的方法,其中存在于组合物中的所述化合物的浓度低于约 0.025mM。

78. 权利要求 70-77 中任意一项的方法,其中在所述化合物存在和不存在的条件下通过测量低温和高温下的蛋白功能来检测热稳定性,

其中低温接近于蛋白功能的最适温度,和

其中该蛋白在高温下要比在低温下更不稳定。

79. 权利要求 78 的方法,其中所述蛋白功能是酶活性。

80. 权利要求 78 的方法,其中所述蛋白功能是配体结合。

81. 权利要求 78 的方法,其中所述高温是约 37°C。

82. 权利要求 78 的方法,其中所述高温是大于约 50°C。

83. 权利要求 78 的方法,其中所述高温是大于约 95°C。

84. 权利要求 78 的方法,其中所述蛋白是酯酶,所述高温是约 37°C。

85. 权利要求 84 的方法,其中所述酯酶是可卡因酯酶。

86. 权利要求 16 的组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途。

87. 权利要求 86 的用途,其中所述可卡因诱导状况是服用可卡因过量,可卡因毒性,可卡因成瘾,或可卡因依赖。

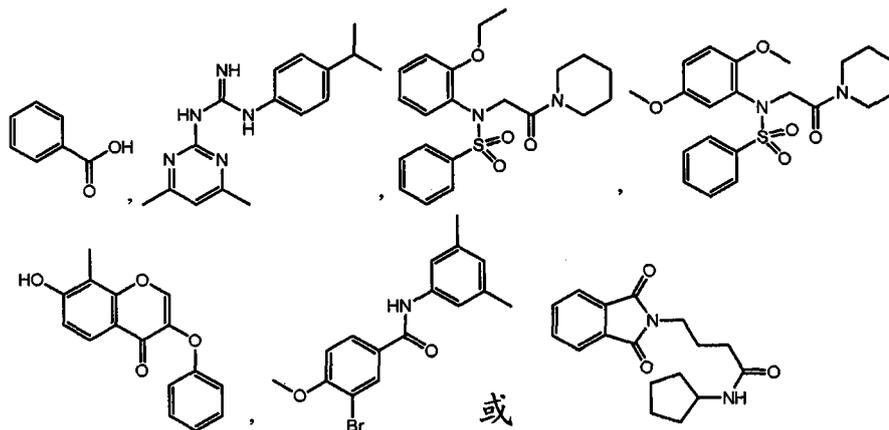
88. 权利要求 86 的用途,其中所述可卡因诱导状况是服用可卡因过量。

89. 权利要求 86-88 中任意一项的用途,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

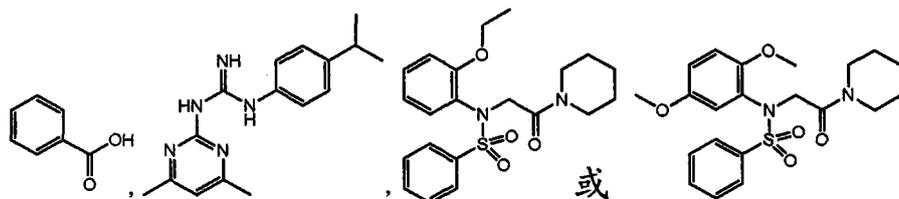
90. 权利要求 89 的用途,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

91. 权利要求 89 的用途,其中 CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

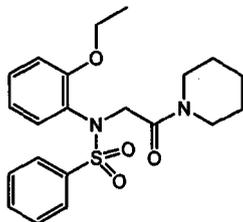
92. 权利要求 86-91 中任意一项的用途,其中所述化合物是



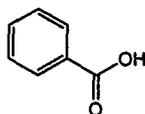
93. 权利要求 92 的用途,其中所述化合物是



94. 权利要求 92 的用途,其中所述化合物是



95. 权利要求 92 的用途,其中所述化合物是



96. 权利要求 92 的用途,其中所述组合物包括所述化合物中的不止一种。

97. 权利要求 16 的组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。

98. 权利要求 97 的用途,其中所述可卡因诱导状况是服用可卡因过量,可卡因毒性,可卡因成瘾,或可卡因依赖。

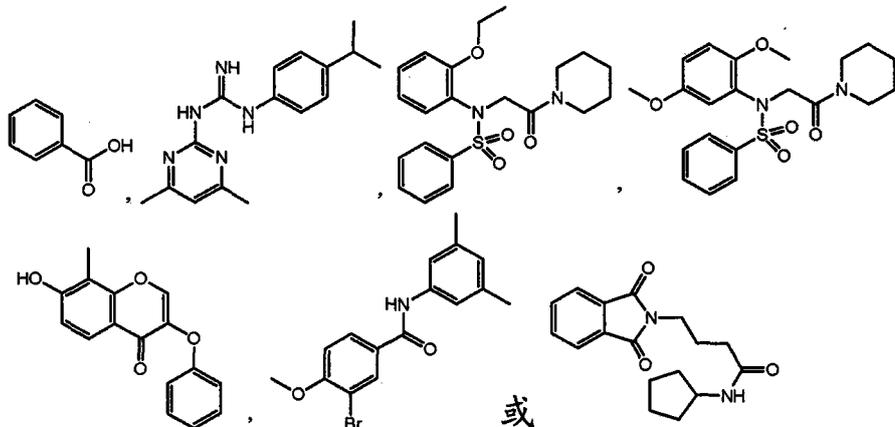
99. 权利要求 97 的用途,其中所述可卡因诱导状况是服用可卡因过量。

100. 权利要求 97-99 中任意一项的用途,其中 CocE 是野生型 CocE 的热稳定突变体,所述野生型 CocE 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

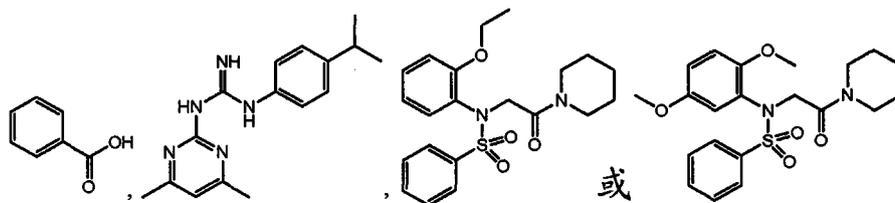
101. 权利要求 100 的用途,其中 CocE 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。

102. 权利要求 100 的用途,其中 CocE 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。

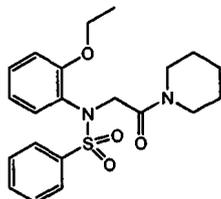
103. 权利要求 97-102 中任意一项的用途,其中所述化合物是



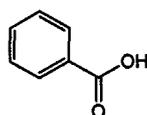
104. 权利要求 100 的用途,其中所述化合物是



105. 权利要求 100 的用途,其中所述化合物是



106. 权利要求 94 的用途,其中所述化合物是



107. 权利要求 99 的用途,其中所述化合物中的不止一种位于组合物中。

108. 一种编码 CocE 多肽的分离的核酸,所述 CocE 多肽包括与 SEQ ID NO :1 的多肽具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列,其中所述编码的 CocE 多肽具有

- (a) 取代 L169K 和 G173Q, 和
- (b) 与野生型 CocE 相比在 37°C 热稳定性增加的酯酶活性。

109. 权利要求 108 的分离的核酸,其中所述氨基酸序列与 SEQID NO :1 的多肽具有至少 90% 的序列同一性。

110. 权利要求 108 的分离的核酸,其中所述氨基酸序列与 SEQID NO :1 的多肽具有至少 95% 的序列同一性。

111. 权利要求 108 的分离的核酸,其中所述氨基酸序列与 SEQID NO :1 的多肽具有至少 99% 的序列同一性。

112. 权利要求 108 的分离核酸,其编码除了取代 L169K 和 G173Q 之外具有 SEQ ID NO : 1 的序列的 CocE 多肽。

113. 由权利要求 108-112 中任意一项的核酸编码的 CocE 多肽。

114. 一种包括权利要求 113 的 CocE 多肽的组合物,其位于药学上可接受的载体中。

115. 一种治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法,所述方法包括以足以降低所述可卡因诱导状况对哺乳动物影响的方式给所述哺乳动物施用权利要求 114 的组合物。

116. 权利要求 114 的组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途。

117. 权利要求 114 的组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。

蛋白的热稳定化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有 2007 年 7 月 10 日提交的美国临时申请号 60/948,976 和 2007 年 11 月 13 日提交的美国临时申请号 60/987,661 的权益,这两份申请在此完整通过援引并入。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院给予的资助号 DA021416-01 和国家科学基金会给予的资助号 IIS-0324845 的政府支持下完成的。政府对本发明享有一些权利。

技术领域

[0005] 本申请一般地涉及抗可卡因治疗。

背景技术

[0006] 可卡因的滥用是棘手的社会和医疗问题,其难于通过药物治疗进行补救。可卡因阻断单胺、多巴胺、去甲肾上腺素和血清素的重摄取,从而延长并增强这些神经递质在中枢神经系统中的作用 (Benowitz,1993)。可卡因毒性表现为惊厥和心脏功能障碍(例如,心肌梗死,心脏心律不齐,血压增加,中风或壁间动脉瘤,和心肌需氧量增加),这归因于对神经递质系统和心肌钠通道阻断的作用 (Bauman and DiDomenico,2002;Wilson and Shelat,2003;Knuepfer,2003)。因为可卡因具有轻易穿越血脑屏障的能力并且其作用广泛分布于中枢和外周神经系统,过度剂量可能导致猝死(综述参见 Bauman and DiDomenico,2002)。

[0007] 尽管已经完全清楚可卡因的作用机制,但该信息还没有促成开发出可在滥用和过度剂量情况下使用的有效的可卡因拮抗剂。可卡因快速和多效作用为急性可卡因毒性的治疗提出了一个复杂的问题 (Carroll and Kuhar,1999)。现有的治疗阿片样物质滥用的两类疗法,拮抗法(例如,纳曲酮)和替代法(例如,美沙酮),与可卡因的情况不具有相似之处,尽管正在考虑对后者的尝试(例如,Grabowski et al,2004)。一种方法是通过施用内源性酯酶、可卡因特异抗体或催化抗体来阻止或减少可卡因到达作用位点。

[0008] 天然存在的可卡因是通过血清丁酰胆碱酯酶 (BChE) 水解苯甲酰酯产生无毒的芽子碱甲酯和安息香酸。在肝脏中,羧酸酯酶 hCE-2 水解甲酯产生苯甲酰芽子碱和甲醇。血液中可卡因的清除半衰期范围为 0.5 到 1.5 小时 (Inaba,1989)。曾经有数次尝试使用天然存在的 BChE 或遗传改造的 BChE 来增加可卡因降解(参见,例如,Carmona et al,2000;Xie et al,1999;Sun et al,2002a;Sun et al,2002b;Duysen et al,2002;Gao and Brimijoin S,2004;Gao et al,2005)。其他研究人员使用单克隆抗体 Mab 15A10 作为可卡因的催化抗体(参见例如,Landry et al,1993;Mets et al,1998),而其他人探究了可卡因疫苗的使用(参见例如,Kosten et al,2002)。

[0009] 古柯植物周围土壤中固有的一种细菌,红球菌属物种 MB 1 (*Rhodococcus* sp. MB 1),已经进化出利用可卡因作为其唯一碳和氮源的能力。该细菌表达与 BChE 作用类似的可卡因酯酶 (CocE),其水解可卡因的苯甲酰酯,产生芽子碱甲酯和安息香酸(图 1) (Bresler et al,2000;Turner et al,2002;Larsen et al,2002)。已经分离并克隆出 CocE 的基因

的方法。所述方法包括在有和没有所述化合物的条件下检测蛋白的热稳定性。利用这些方法,使蛋白热稳定性更高的化合物是该蛋白的热稳定剂。

[0022] 本申请还涉及上述组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途。

[0023] 本申请还涉及上述组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。

[0024] 还发现 CocE 突变体 L169K/G173Q 具有意料之外的高度热稳定性。参见实施例 5。

[0025] 因此,本申请还涉及编码 CocE 多肽的分离的核酸,所述 CocE 多肽包括与 SEQ ID NO :1 的多肽具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列,其中编码的 CocE 多肽具有 (a) 取代 L169K 和 G173Q,和 (b) 与野生型 CocE 相比,在 37°C 具有热稳定性增加的酯酶活性。

[0026] 本申请还涉及包括与 SEQ ID NO :1 的多肽具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列的 CocE 多肽,其中编码的 CocE 多肽具有取代 L169K 和 G173Q,以及与野生型 CocE 相比在 37°C 热稳定性增加的酯酶活性。还提供位于药学上可接受的载体中的包括所述多肽的组合物。

[0027] 在其他实施方案中,本申请涉及治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法。所述方法包括以足以降低所述可卡因诱导状况对哺乳动物的影响的方式给所述哺乳动物施用刚在上文描述的组合物。还提供所述组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途,以及所述组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示红球菌属可卡因酯酶 (CocE) 催化的可卡因代谢。

[0030] 图 2 是存在和不存在 CocE 的条件下可卡因随时间变性的图示。

[0031] 图 3 显示 CocE 催化的 4- 硝基苯基乙酸酯 (4NPA) 代谢以及存在和不存在 CocE 的条件下 4NPA 随时间变性的图示。

[0032] 图 4 是非变性凝胶的照片,显示在各种条件下温育 1 小时后以及存在或不存在底物或产物的情况下 CocE 的聚集。

[0033] 图 5 是存在各种浓度可卡因的条件下,4NPA 切割期间对可卡因稳定化进行分光光度分析的图示。

[0034] 图 6 显示 CocE 的安息香酸、芽子碱甲酯或乙酸钠稳定化作用的动力学分光光度分析。

[0035] 图 7 显示化学结构,酶促反应的示意图,以及显示苯基硼酸 (PBA) 对 CocE 热稳定化作用的非变性凝胶的照片。

[0036] 图 8 显示 CocE 的安息香酸热稳定化作用。

[0037] 图 9 显示针对热稳定化 CocE 的能力对 40 种化合物进行筛选的结果,以及最有效化合物的化学结构。

[0038] 图 10 显示针对化合物 6031818 抑制 CocE 的能力进行研究的結果,以及该化合物的结构。

[0039] 图 11 显示使用 4NPA 或可卡因作为底物时,化合物 6031818 热稳定化 CocE 的能力,以及该化合物的结构。

[0040] 图 12 显示针对化合物 6169221 抑制 CocE 的能力进行研究的結果,以及该化合物的结构。

[0041] 图 13 显示使用 4NPA 或可卡因作为底物时,化合物 6169221 热稳定化 CocE 的能力,

以及该化合物的结构。

[0042] 图 14 显示针对化合物 5804236 抑制 CocE 的能力进行研究的結果,以及该化合物的结构。

[0043] 图 15 显示使用 4NPA 或可卡因作为底物时,化合物 5804236 热稳定化 CocE 的能力,以及该化合物的结构。

[0044] 图 16 显示通过圆二色性进一步表征野生型 CocE 和突变体 T172R 的稳定性。

[0045] 图 17 显示通过圆二色性进一步表征存在安息香酸或苯基硼酸条件下,野生型 CocE 的稳定性。

[0046] 图 18 显示通过圆二色性进一步表征不存在或存在苯基硼酸条件下, CocE 突变体 L169K 的稳定性。

[0047] 图 19 显示通过圆二色性进一步表征存在或不存在化合物 6031818 条件下,野生型 CocE 的稳定性。

[0048] 图 20 是非变性凝胶的照片,显示存在各种小分子的情况下在 37°C 温育各个时间点后野生型 CocE 和 CocE 突变体 L169K 的分析结果。

[0049] 图 21 是显示对图 20 所示凝胶进行点光密度半衰期分析的结果的图和表格。

[0050] 图 22 是显示可卡因酯酶结构的示意图。栏 A. 可卡因酯酶由分开的 3 个不同结构域组成。栏 B. 将通过计算方法预测的点突变叠加到 wt-CocE 的晶体结构上。坐标来自 RCSB 数据库 (pdb:1JU4),由 Larsen 等人 (2002) 提供。结构模型用 PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA) 产生和提供。

[0051] 图 23 显示 37°C CocE 活性的衰减。将 50ng/ml 野生型 CocE 和突变体在 37°C 温育,并随时间检测活性 (Xie et al,1999)。根据所获曲线计算半衰期。野生型 CocE, T172R, L169K 和 T172R/G173Q 分别显示 12 分钟,46 分钟,274 分钟和 326 分钟的半衰期。

[0052] 图 24 显示 DTT 以浓度依赖性方式抑制 wt-CocE,其 IC_{50} 为 $\sim 390 \mu M$ 。

[0053] 图 25 显示 DTT (10mM) 的存在缩短 wt-CocE 的体外 τ_{inact} 。

[0054] 图 26 显示酯酶活性温度依赖性的衰减。将 50ng/ml 野生型 CocE 和突变体在指定温度 (°C) 预温育 30 分钟,并检测活性 (Xie et al,1999)。显示预温育后各种突变体剩余的活性 (作为最大活性 V_{max} (无预温育) 的百分比)。野生型 CocE (空心柱图) 看起来在 30-35°C 之间灭活,而 T172R/G173Q (阴影柱图) 和 L169K (实心) 均显示增强热稳定性 (在 40-45°C 灭活)。

[0055] 图 27 显示 CocE 抗可卡因诱导毒性的保护作用。在施用可卡因 (mg/kg, i. p.) 前 1 分钟静脉内施用 CocE (1mg)。绘制存在或不存在 CocE 或突变体条件下可卡因诱导致死性的剂量反应曲线。每个数据点代表显示可卡因诱导致死率的小鼠 (每种给药条件 $n = 6$) 百分比。

[0056] 图 28 显示 CocE 抗可卡因毒性的保护作用的时程。每个数据点代表显示可卡因诱导致死性的小鼠 (每种给药条件 $n = 6$) 百分比。在施用可卡因 (180mg/kg, i. p.) 前不同的时间点施用 CocE 或突变体 (0.1mg, 0.3mg, 1mg i. v.)。

[0057] 图 29 显示 50%致死率的估算保护持续时间。根据图 28 的数据计算 CocE 和各种突变体达到 50%致死率所需时间,并对剂量作图。

[0058] 图 30 是显示 CocE 和热稳定化突变概貌的示意图。CocE 的 H2 和 H3 螺旋用线圈

表示, CocE 的其余部分作为分子表面。观察到结合于我们的晶体结构的 DTT 分子指示活性位点相对位置,在接近于 H2 螺旋的腔中。显示 3 种鉴定的稳定化突变。T172R 突变导致 R172(H2 螺旋)和 F189(H3 螺旋)之间的范德华相互作用。G173Q 突变利用新的氢键(虚线)桥连活性位点裂隙。L169K 突变影响活性位点。在这种晶体结构的活性位点中观察到 DTT 和甘油,其中 K169 显示多种构象并与甘油形成氢键。注意到在天然结构中 L169 晶序较差。K169 与 Y44 形成另外的直接接触。甘油在可卡因的托烷环预期结合的位置结合,而 DTT 占据苯甲基部分的结合位点。结构模型用 PyMol(DeLanoScientific, Palo Alto, CA)产生和提供。

[0059] 图 31 显示热稳定突变体的结构示意图。将 T172R(B)、G173Q(D)和 L169K(F)的高分辨晶体结构与 wt-CocE(分别为 A,C 和 C)进行比较。突变体的整体作用看起来源自结构域 II 的螺旋 1 和 2(R172 和 F189)之间的相互作用增强或结构域间相互作用(Q173 与 P44 和 K169 与活性位点)。显示活性位点存在 2-氧代-二氧戊环丁酰碳酸酯(DBC)的条件下与 wt-CocE 比较的 L169K 结构,其增强赖氨酸残基与水与活性位点的相互作用。 1σ 的电子密度被勾画。

[0060] 图 32 显示 R172 稳定化结构域 II 中的 H1-H2 环。通过增强与 F189 的相互作用,精氨酸取代残基 172 的苏氨酸稳定化螺旋 1 和螺旋 2。尽管在 wt-CocE 中发现“in”(暗)和“out”(亮)构象,但在 T172R 中只发现“out”构象。

[0061] 图 33 显示 wt-CocE 的活性位点中 DBC 与苯基硼酸的比较。发现 DBC 与晶体(从利用 DTT 分离的蛋白生长而成)的活性位点 117 的丝氨酸共价结合。DBC 分子的 omit 图(左)显示位于 5σ 的碳密度,位于 12σ 的氧密度,和位于 20σ 的硫密度。右栏显示先前报道的过渡态类似物苯基硼酸的结合位点(pdb:1JU3),其类似于 DBC 结合位点。显示 L169K 突变体的 omit 图密度,其配位了与 DBC 环形成氢键的水分子。

[0062] 图 34 是显示 wt-CocE 和两种双突变体催化参数的图和表格。

[0063] 图 35 显示 wt-CocE、两种 CocE 突变体(T172R 和 L169K)以及组合两种单突变的双突变体的体外活性损失。

[0064] 图 36 显示 CocE L169K/G173Q 突变体保护小鼠免受致命可卡因剂量的伤害。

[0065] 图 37 显示 CocE L169K/G173Q 突变体保护小鼠免受致命可卡因剂量的伤害的时程。

[0066] 详细说明

[0067] 本发明人发现一些化合物热稳定化野生型 CocE,并且进一步热稳定化 CocE 突变体(它们比野生型 CocE 的热稳定性更高)。参见实施例 1-3。

[0068] 因此,本申请涉及包括可卡因酯酶(CocE)和化合物的组合物,其中所述化合物存在条件下的 CocE 比所述化合物不存在条件下的 CocE 更加热稳定。

[0069] 所述化合物存在条件下 CocE 热稳定性的所获增加延长酶在 37°C 的半衰期至少约 5 分钟,优选的至少约 10,15,20,25,30,35 或 40 分钟,或更长。

[0070] 指定多肽的热稳定性可以通过本领域已知的各种方法进行评价,包括例如测量圆二色性(CD)光谱法(例如下文的实施例 2 中)或差示扫描量热计。还可参见 PCT 专利申请 PCT/US2007/015762,公开为 WO/2008/008358,通过援引并入。优选的,在有和没有所述化合物的条件下通过随时间测量低温和高温下的酶活性来确定热稳定性,以确定相对于没

有所述化合物的情况,该化合物在更高的温度下是否导致酶维持酶活性以及维持到何种程度。优选的低温是室温(即,~25°C);优选的高温是37°C。但是,可以使用任何温度范围。技术人员无需过度实验就可以确定针对任意具体应用的最佳温度范围。

[0071] 如本文使用的,CocE是具有与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列的酶,能够特异性催化将可卡因裂解为芽子碱甲酯和安息香酸。优选的,CocE具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列,更优选的,95%,甚至更优选的99%。在一些优选的实施方案中,CocE具有与SEQ ID NO:1相同的氨基酸序列。

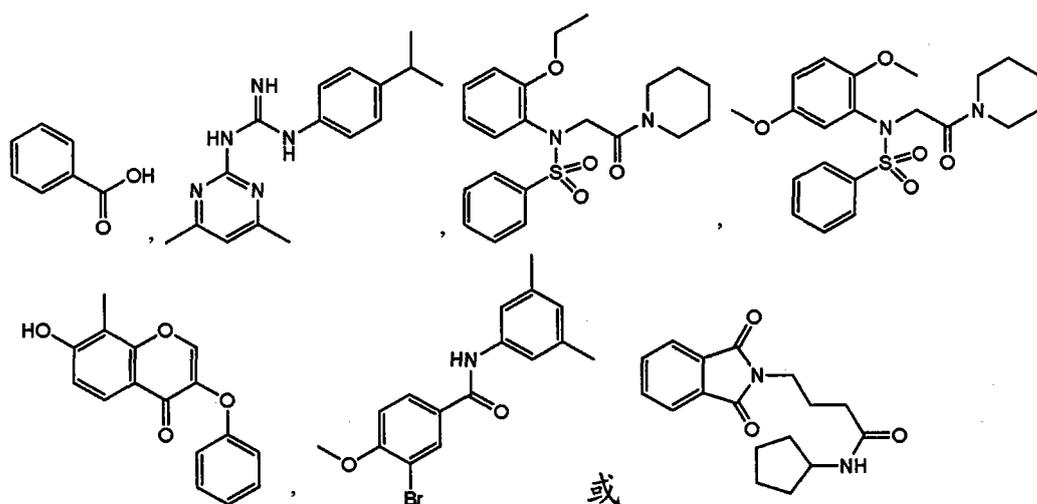
[0072] 在其他实施方案中,CocE具有突变,诸如描述于PCT专利申请PCT/US2007/015762中的那些,包括相对于野生型(SEQ ID NO:1)热稳定性增加的突变体以及热稳定性不增加的突变体。优选的突变体是除了以下取代外CocE具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的那些突变体:L163V,V225I,I218L,A310D,A149S,S159A,S265A,S56G,W220A,S140A,F189L,A193D,T254R,N42V,V262L,L508G,Y152H,V160A,T172R,Y532F,T74S,W285T,L146P,D533S,A194R,G173Q,C477T,K531A,R41I,L119A,K46A,F84Y,T172R/G173Q,L169K,F189A,N197K,R182K,F189K,V190K,Q191K,或A194K,或这些突变氨基酸残基的任意组合。在一些实施方案中,CocE具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,除了取代T172R,S159A,N197K,L169K,F189K,G173Q,或T172R/G173Q之外。在这些实施方案的另外一些中,CocE具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,除了取代L169K/G173Q之外。

[0073] 属于这些实施方案范围的化合物可以增加如上所述的野生型或突变CocE的热稳定性。

[0074] CocE还可以被聚乙二醇化或另外处理以增加作用持续时间、热稳定性和/或降低免疫原性。聚乙二醇化可以进一步增强CocE-化合物组合物的热稳定性和,当体内使用时,通过降低肾清除率、蛋白水解、巨噬细胞摄取和免疫应答增加血清半衰期。

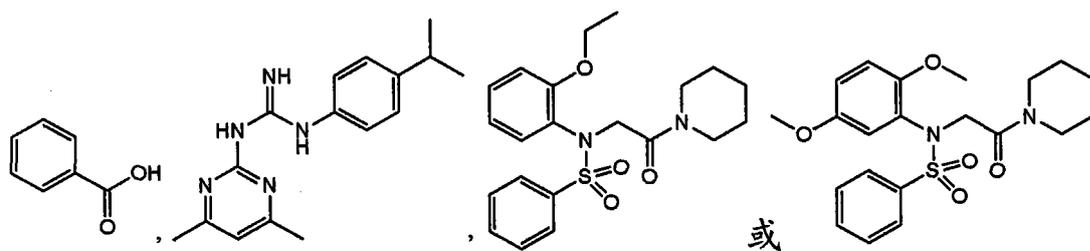
[0075] CocE-化合物组合物可以被包裹入红细胞(RBC)以便增加作用的持续时间和热稳定性,并降低免疫原性。在优选的组合物中,所述化合物是:

[0076]



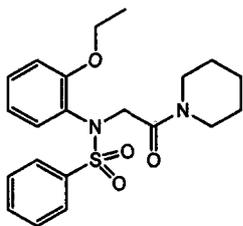
[0077] 更优选的,所述化合物是

[0078]



[0079] 甚至更优选的,所述化合物是

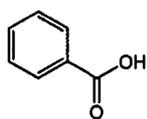
[0080]



(6031818)。

[0081] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是

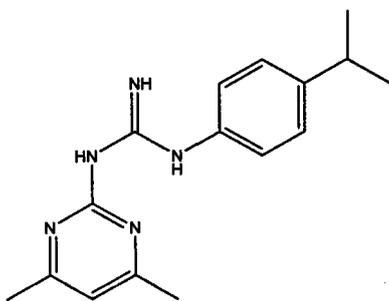
[0082]



(安息香酸)。

[0083] 化合物也可以是

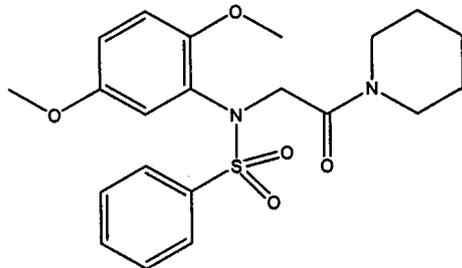
[0084]



(5804236)。

[0085] 化合物还可以是

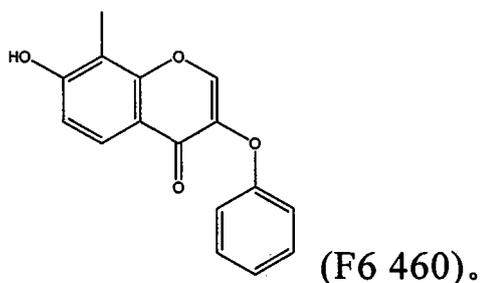
[0086]



(6169221)。

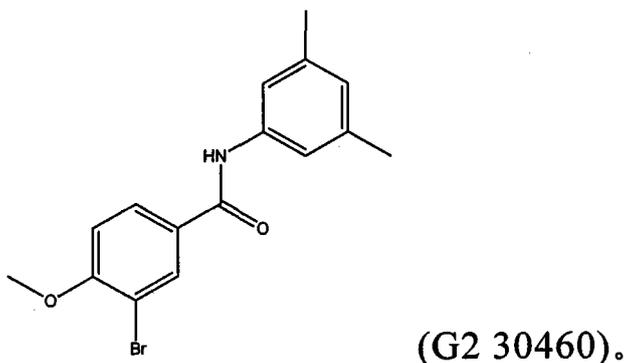
[0087] 此外,化合物可以是

[0088]



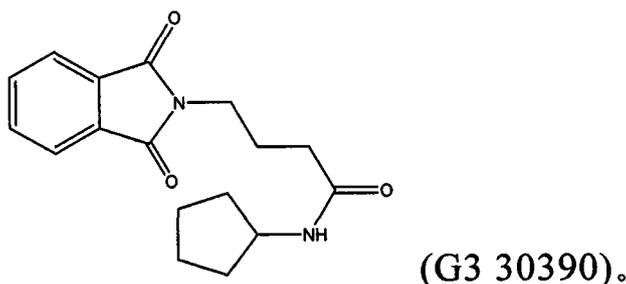
[0089] 另外,化合物可以是

[0090]



[0091] 化合物也可以是

[0092]



[0093] 本发明的组合物可以包括上述鉴定的热稳定化 CocE 的任意化合物中的不止一种。

[0094] 在这些组合物的一些实施方案中,尤其是当它们用于治疗目的时,所述组合物位于药学上可接受的载体中。

[0095] 可以使用一种或更多种药学上可接受的载体和 / 或赋形剂 (参见例如, Gennaro(2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736) 通过任意常规方法配制本文描述的 CocE- 化合物组合物。这类制剂将包含治疗有效量的 CocE- 化合物组合物 (优选的以纯化形式), 以及合适量的载体以便提供用于给受试者正确施用的形式。所述制剂应当适合施用的方式。可以通过已知的方法配制用于本申请的 CocE- 化合物组合物, 以便使用数种途径给受试者施用, 所述途径包括但不限于, 肠胃外, 肺, 口服, 局部, 皮内, 肌内, 腹膜内, 静脉内, 皮下, 鼻内, 硬膜外, 眼, 口腔, 和直肠。CocE- 化合物组合物还可以与本文公开的一种或更多种其他药剂联合施用和 / 或与其他生物活性剂或生物惰性剂一起施用。这类生物活性剂或惰性剂可以与所述药剂产生流体或机械联系, 或通过离子、共价、范德华、疏水、亲水或其他物理力与所述药剂连接。

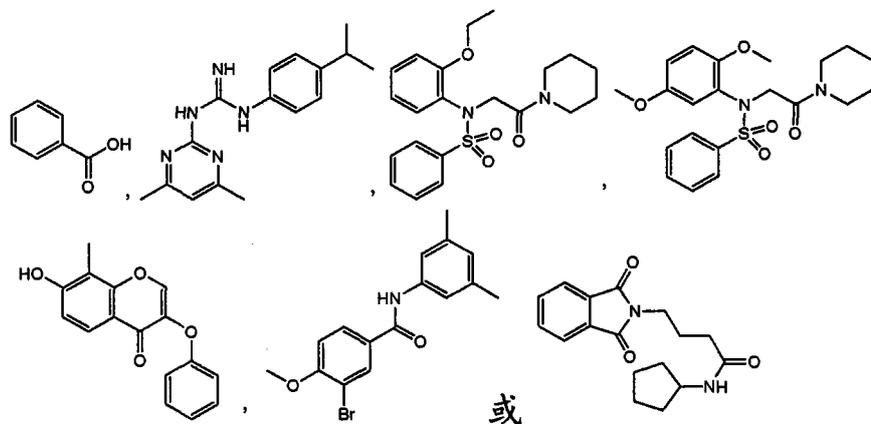
[0096] 本文描述的 CocE- 化合物组合物可以肠胃外施用,包括通过静脉内、肌内、皮下或腹膜内注射。生物分子制剂还可包括通常用于小药物分子的肠胃外输送的赋形剂,其包括溶解增强剂,渗透剂,缓冲剂和防腐剂。当配制和输送生物分子时包括抗聚集剂和抗吸附剂,诸如表面活性剂和白蛋白,可以增加稳定性和降低活性生物分子与界面相互作用的风险(这有可能导致解折叠,聚集和/或沉淀)。可以将 CocE- 化合物组合物冻干以增加保存期间的稳定性,然后在肠胃外施用前再处理。

[0097] 还预期 CocE- 化合物组合物的肺部输送。此外,可以配制控释(或缓释)制剂以延长突变 CocE 多肽的活性并减少给药频率,就如本领域已知的一样。

[0098] 可以将 CocE- 化合物组合物包入胶囊,并在各种载体输送系统中施用。用于本文描述的突变 CocE 多肽的载体输送系统的实例包括微球(参见例如,Varde&Pack(2004)Expert Opin. Biol. 4(1)35-51),水凝胶(一般地参见,Sakiyama et al(2001)FASEB J. 15,1300-1302),聚合植入物(一般地参见,Teng et al(2002)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99,3024-3029),智能(smart)聚合载体(一般地参见,Stayton et al(2005)Orthod Craniofacial Res 8,219-225;Wu et al(2005)Nature Biotech(2005)23(9),1137-1146),和脂质体(参见例如,Galovic et al(2002)Eur. J. Pharm. Sci. 15,441-448;Wagner et al(2002)J. Liposome Res. 12,259-270)。

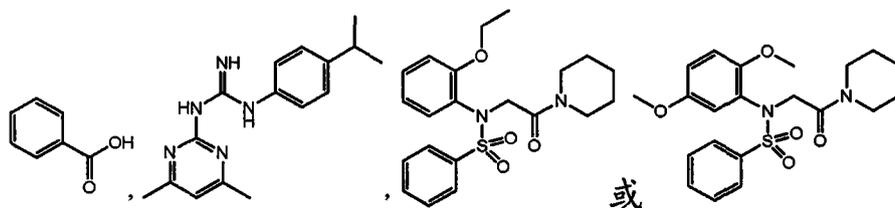
[0099] 本申请还涉及热稳定化可卡因酯酶(CocE)的方法。所述方法包括将 CocE 与下列化合物组合

[0100]



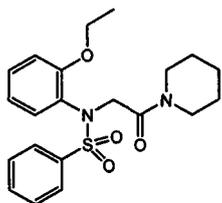
[0101] 优选的,所述化合物是

[0102]



[0103] 更优选的,所述化合物是

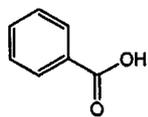
[0104]



(6031818)。

[0105] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是

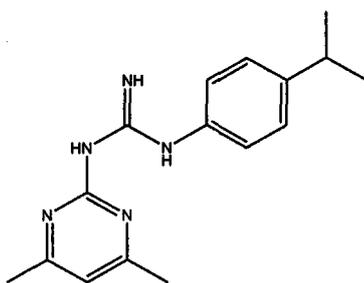
[0106]



(安息香酸)。

[0107] 所述化合物也可以是

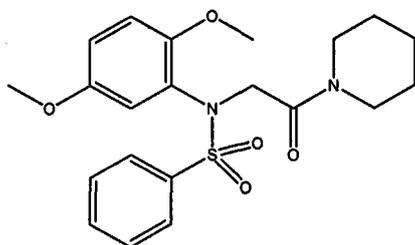
[0108]



(5804236)。

[0109] 所述化合物还可以是

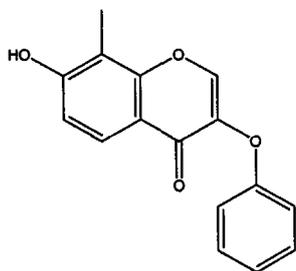
[0110]



(6169221)。

[0111] 此外,所述化合物可以是

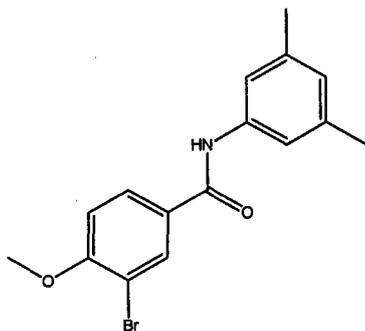
[0112]



(F6 460)。

[0113] 另外,所述化合物可以是

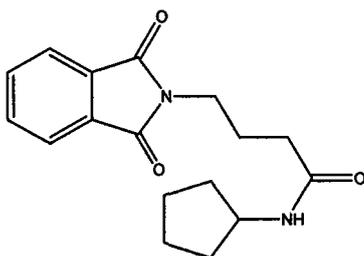
[0114]



(G2 30460)。

[0115] 所述化合物也可以是

[0116]



(G3 30390)。

[0117] 在这些方法中, CocE 可以与不止一种热稳定化 (thermostabilizing) 化合物组合, 例如如上所述化合物中的一种, 或与任意其他化合物组合。

[0118] 优选的, CocE 包括与 SEQ ID NO :1 至少 90% 相同的氨基酸序列; 更优选的, 与 SEQ ID NO :1 至少 95% 相同, 甚至更优选的与 SEQ ID NO :1 至少 99% 相同。在其他优选的实施方案中, CocE 包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。在另外的实施方案中, CocE 是具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的野生型 CocE 的热稳定突变体。这类热稳定突变体的优选实例是具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 CocE, 除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q 或 T172R/G173Q 之外。此外, CocE 可以具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 L169K/G173Q 之外。

[0119] 当 CocE 位于体外时, 可以进行这些实施方案的方法例如在纯化时或保存期间热稳定化 CocE。但是, 优选的, CocE 位于活的哺乳动物中。针对所述实施方案, 本申请的一方面涉及抗可卡因治疗的催化降解方法。提供可卡因诱导状况的预防性和治疗性疗法, 通过给需要其的受试者施用热稳定的、具有酯酶活性的 CocE- 化合物组合物。由热稳定化化合物 (其使得对可卡因毒性症状的应答快得多和有效得多) 提供的热稳定性增加使得如上所述的 CocE- 化合物组合物不同于其他治疗选择。

[0120] 本申请还涉及治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法。所述方法包括以足以降低所述可卡因诱导状况对哺乳动物的影响的方式给所述哺乳动物施用上述 CocE- 化合物组合物。

[0121] 治疗需要的确定通常通过符合可卡因诱导状况的病史和身体检查来评价。预期可以使用本方法治疗任意可卡因诱导状况, 包括但不限于, 服用可卡因过量, 可卡因毒性, 以及可卡因依赖和 / 或成瘾。这类状况的诊断属于本领域的技能范围内。例如, 可卡因毒性的诊断可包括评价惊厥, 癫痫大发作, 心动停止, 心肌梗死, 心脏心律不齐, 血压增加, 中风, 药物诱导的精神病, 壁间动脉瘤, 和心肌需氧量增加。作为另一实例, 就可卡因依赖和 / 或

成瘾来说,戒断症状包括轻度到重度烦躁不安、抑郁、焦虑或过敏(irritability)的主观感觉。被确定需要治疗的受试者包括以下那些:患有确诊的可卡因诱导状况,具有可卡因诱导状况的症状,以及已经接受、正在接受或将要接受针对可卡因诱导状况的治疗的受试者。这些方法可用于治疗任意哺乳动物,包括但不限于,啮齿类动物,兔,豚鼠,马,牛,狗,猫,羊和猪,和最优选的是人。

[0122] 本文描述的 CocE- 化合物组合物的有效量通常是能够降低可卡因毒性或可卡因诱导状况的严重性的量。严重性的减轻包括,例如,症状、生理指标、生化标记物或代谢指标的停滞或降低。当用于本发明的方法时,治疗有效量的本文所述 CocE- 化合物组合物可以使用纯化形式或当存在这种形式时采用药学上可接受的盐形式并且包含或不包含药学上可接受的赋形剂。例如, CocE- 化合物组合物可以适用于任意医学治疗的合理利益/风险比例进行施用,采用足以实质上降低受试者血液和/或组织中可卡因浓度的量。

[0123] 可以通过细胞培养物和/或实验动物中测定 LD50(导致 50%群体死亡的剂量)和 ED50(在 50%群体中治疗有效的剂量)的标准药理学步骤来确定 CocE- 化合物组合物的毒性和治疗效率,

[0124] 与药学上可接受的载体组合产生单剂型的 CocE- 化合物组合物的量将根据接受治疗的宿主和具体的施用方式而变化。本领域技术人员将理解,每种剂型的单独剂量包含的药剂单位含量无需自身构成治疗有效量,因为可以通过施用若干单独剂量达到必需的治疗有效量。CocE- 化合物组合物的施用可以作为单个事件发生,或随着治疗的时程发生。例如, CocE- 化合物组合物可以是每天,每周,每两周,或每月施用。对于一些状况来说,治疗可以持续数周到数月或甚至一年或更长。

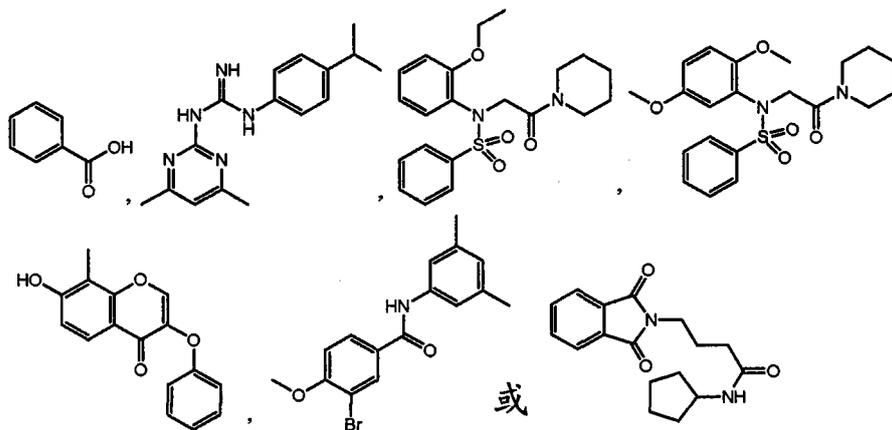
[0125] 对于任意具体受试者来说,特定的治疗有效量水平将取决于各种因素,包括正接受治疗的可卡因诱导状况和所述可卡因诱导状况的严重性;使用的突变 CocE 多肽的活性;使用的具体组成;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用时间;施途径;突变 CocE 多肽的血浆半衰期;使用的突变 CocE 多肽的排泄率;治疗持续时间;与所用突变 CocE 多肽组合或同时使用的药物;以及医药领域公知的类似因素(参见例如, Koda-Kimble et al(2004) *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*, Lippincott Williams&Wilkins, ISBN 0781748453; Winter(2003) *Basic Clinical Pharmacokinetics*, 4th ed., Lippincott Williams&Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel(2004) *Applied Biopharmaceutics&Pharmacokinetics*, McGraw-Hill/Appleton&Lange, ISBN 0071375503)。有经验的医师应当知道,主治医师在合理医学判断范围内无需过度实验就能够确定用于本文公开的本发明实施方案的 CocE- 化合物组合物的每日总用量。

[0126] 本文描述的 CocE- 化合物组合物还可以与其他治疗形式联用。因此,除了本文描述的疗法外,还可以给受试者提供已知对具体的可卡因诱导状况有效的其他疗法。

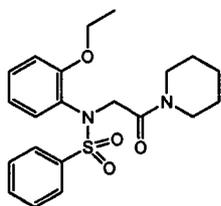
[0127] 因此,在这些方法的一些实施方案中,哺乳动物对可卡因成瘾。在其他实施方式中,哺乳动物服用可卡因过量。

[0128] 用于这些方法的 CocE 可以是具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的野生型 CocE 的热稳定突变体。优选的这类突变体具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, T172R/G173Q, 或 L169K/G173Q 之外。具有不止一种突变,优选的不止一种热稳定化突变的 CocE 突变体,也可用于这些治疗方法。

[0129] 这些方法不限于使用任意具体的热稳定化合物。优选的,所述化合物是
[0130]

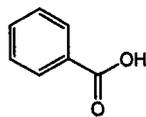


[0131] 更优选的,所述化合物是
[0132]



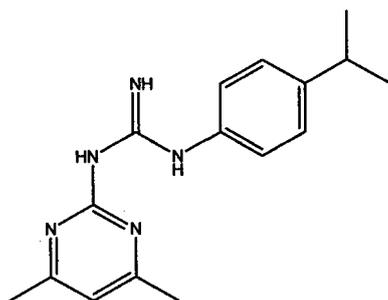
(6031818).

[0133] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是
[0134]



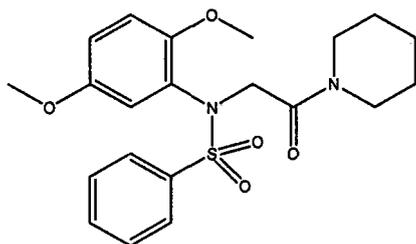
(安息香酸).

[0135] 所述化合物也可以是
[0136]



(5804236).

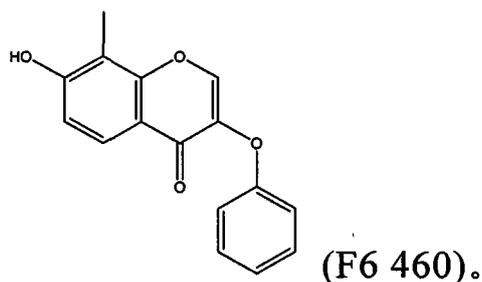
[0137] 所述化合物还可以是
[0138]



(6169221).

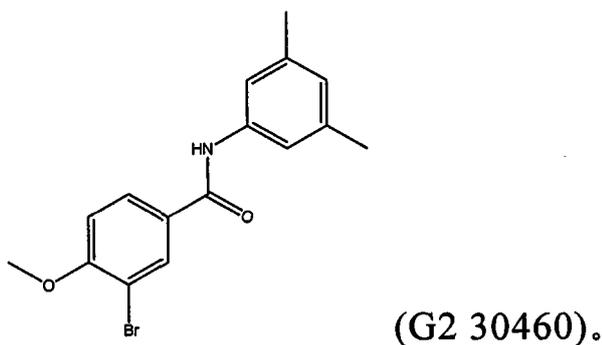
[0139] 另外,所述化合物可以是

[0140]



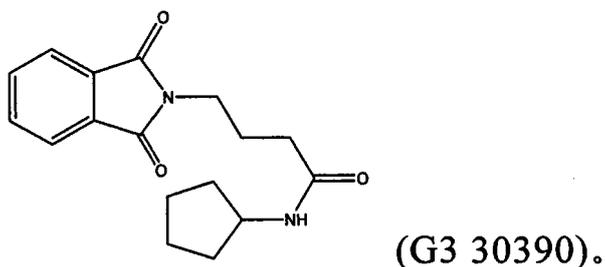
[0141] 此外,所述化合物可以是

[0142]



[0143] 所述化合物也可以是

[0144]



[0145] 在这些方法中, CocE 可以与不止一种热稳定化化合物组合,例如如上所述化合物中的一种,或与任意其他化合物组合。

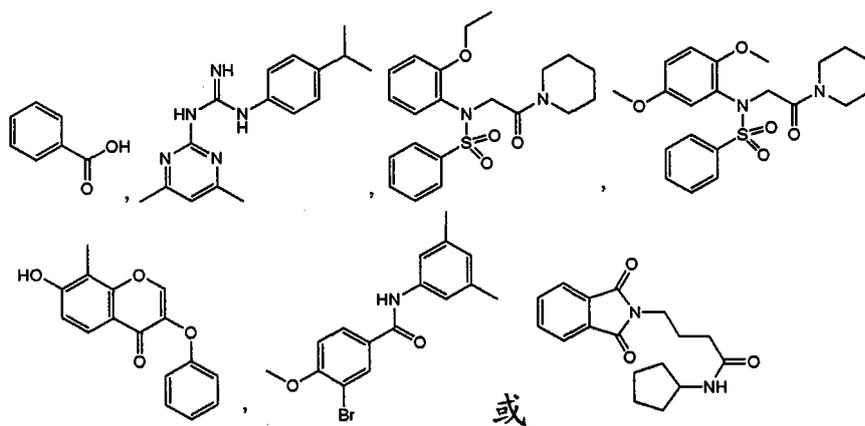
[0146] 此外,本申请还涉及治疗服用可卡因过量的哺乳动物的方法。所述方法包括以足以降低所述可卡因对哺乳动物的影响的方式给所述哺乳动物施用上述组合物。

[0147] 这些方法可用于治疗任意哺乳动物,包括但不限于,啮齿类动物,兔,豚鼠,马,牛,狗,猫,羊和猪,和最优选的是人。

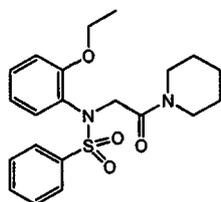
[0148] 就像如上所述的治疗方法一样,所述组合物可以通过本领域已知的任意方法施用。技术人员无需过度实验就可以确定针对任意特定个体的最佳施用方式。在一些优选的实施方案中,给哺乳动物静脉内施用 CocE- 化合物组合物。

[0149] 用于这些方法的 CocE 可以是具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的野生型 CocE 的热稳定突变体。优选的这类突变体具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。在另一热稳定突变体中, CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。具有不止一种突变,优选的不止一种热稳定化突变的 CocE 突变体,也可用于这些治疗方法。

[0150] 这些方法不限于使用任意具体的热稳定化合物。优选的,所述化合物是
 [0151]

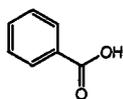


[0152] 更优选的,所述化合物是
 [0153]



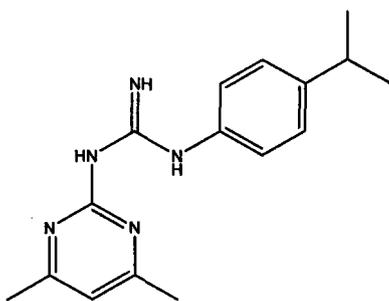
(6031818)。

[0154] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是
 [0155]



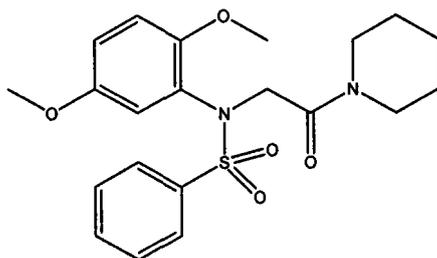
(安息香酸)。

[0156] 所述化合物也可以是
 [0157]



(5804236)。

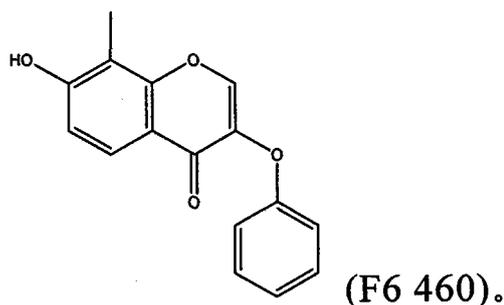
[0158] 所述化合物还可以是
 [0159]



(6169221)。

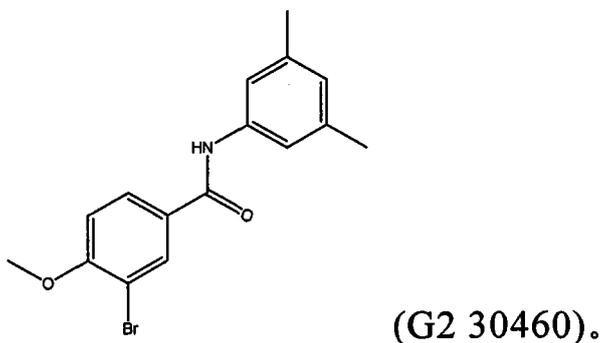
[0160] 另外,所述化合物可以是

[0161]



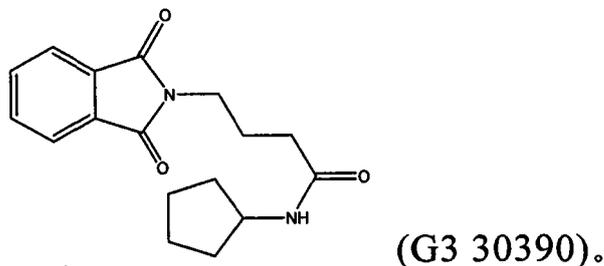
[0162] 此外,所述化合物可以是

[0163]



[0164] 所述化合物也可以是

[0165]



[0166] 在这些方法中, CocE 可以与不止一种热稳定化合物组合,例如如上所述化合物中的一种,或与任意其他化合物组合。

[0167] 本发明进一步涉及治疗患有可卡因依赖的哺乳动物的方法。所述方法包括以足以降低所述可卡因依赖对哺乳动物的影响的方式给所述哺乳动物施用上述组合物。

[0168] 这些方法可用于治疗任意哺乳动物,包括但不限于,啮齿类动物,兔,豚鼠,马,牛,狗,猫,羊和猪,和最优选的是人。

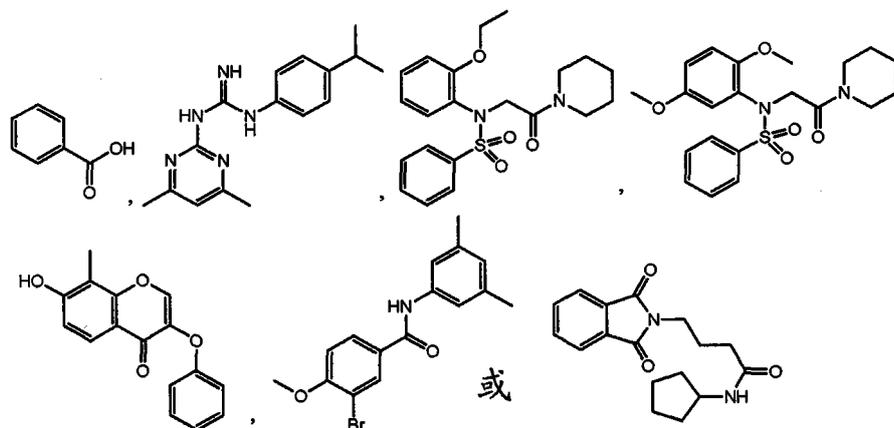
[0169] 就像如上所述的治疗方法一样,所述组合物可以通过本领域已知的任意方法施用。技术人员无需过度实验就可以确定针对任意特定个体的最佳施用方式。在一些优选的实施方案中,给哺乳动物静脉内施用 CocE- 化合物组合物。

[0170] 用于这些方法的 CocE 可以是具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的野生型 CocE 的热稳定突变体。优选的这类突变体具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。在另一热稳定突变体中, CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了取代 L169K/G173Q 之外。具有不止一种突变,优选的不止一种

热稳定化突变的 CocE 突变体,也可用于这些治疗方法。

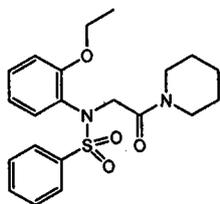
[0171] 这些方法不限于使用任意具体的热稳定化化合物。优选的,所述化合物是

[0172]



[0173] 更优选的,所述化合物是

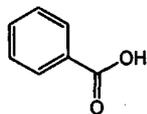
[0174]



(6031818)。

[0175] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是

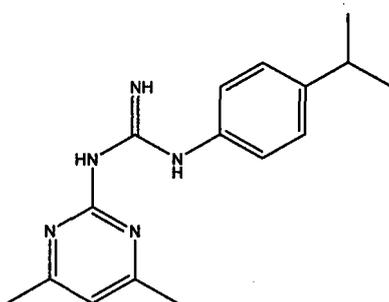
[0176]



(安息香酸)。

[0177] 所述化合物也可以是

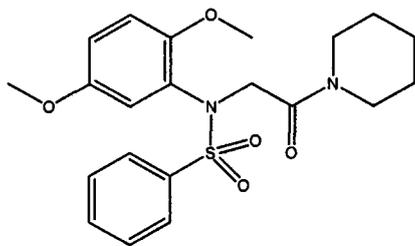
[0178]



(5804236)。

[0179] 所述化合物还可以是

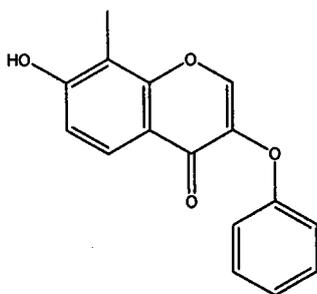
[0180]



(6169221).

[0181] 另外,所述化合物可以是

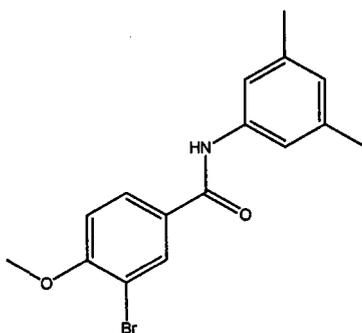
[0182]



(F6 460).

[0183] 此外,所述化合物可以是

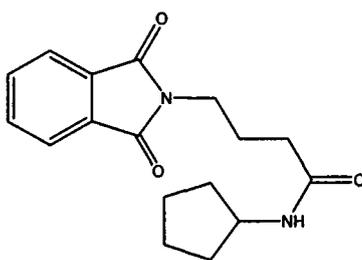
[0184]



(G2 30460).

[0185] 所述化合物也可以是

[0186]



(G3 30390).

[0187] 在这些方法中, CocE 可以与不止一种热稳定化化合物组合,例如如上所述化合物中的一种,或与任意其他化合物组合。

[0188] 此外,本申请涉及确定化合物是否是蛋白热稳定剂的方法。所述方法包括在有和没有所述化合物的条件下检测蛋白的热稳定性。利用这些方法,使蛋白热稳定性更高的化合物是该蛋白的热稳定剂。优选的,所述蛋白是 CocE。

[0189] 利用这些方法,可以分离(即,在活细胞外的试管中)蛋白或通过培养或体内的细胞产生蛋白用于热稳定性测定。

[0190] 可以在一个或更多个温度下测量有和没有化合物情况下分离的蛋白的活性,以确

定所述化合物给予该蛋白的热稳定性。进行活性分析的温度决定热稳定性检测的程度。因此,起始筛选可以例如在 30°C 进行,在起始化合物挑选后,可以逐渐升高温度(例如,34°C,37°C,40°C,42.5°C,45°C,等等)进行筛选,直至获得具有合适热稳定性的化合物。在该过程中温度的递增通过经验确定,这受特定温度时的命中(hit)数以及确定的起始化合物 T_m 的影响。

[0191] 当所述蛋白是 CocE 时,可以使用各种方法进行酯酶活性的检测,其中底物通常与特异性检测系统偶联。用于测定酯酶活性的合适底物可以包括可卡因,氚化(^3H)可卡因,可卡因底物衍生物诸如硫-可卡因衍生物,和/或报告一般性酯酶活性的底物诸如 4-硝基苯基乙酸酯。所述检测系统可以直接偶联底物的特异性,例如:未修饰可卡因的裂解可以通过以下方法检测,监测 240nm 处可卡因吸光度的变化,或监测源于酸性安息香酸产物积聚的 pH 变化,或使用可卡因适体(参见例如,Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) *J Am Chem Soc* 123, 4928-4931; Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) *J Am Chem Soc* 124, 9678-9679), 监测可卡因降解时荧光的变化;氚化(^3H)可卡因的裂解可以通过层析分离的氚化安息香酸产物的酸化和检测进行测定;可卡因衍生物诸如硫-可卡因的裂解可以通过活性巯基的检测进行监测,通过添加 Ellman's 试剂并测定 412nm 处的吸光度变化,或通过添加导致巯基沉淀的反应性重金属并将其显影;4-硝基苯基乙酸酯的裂解可以通过监测 420nm 处的吸光度变化进行检测(参见例如,Halgasova, N. et al (1994) *Biochem J* 298Pt 3, 751-755; O'Conner, C. J. & Manuel, R. D. (1993) *J Dairy Sci.* 76, 3674-3682)。还可参见 PCT 公开 W0/2008/008358 对上述内容的进一步详细描述。

[0192] 可以使用在本文以及 PCT 公开 W0/2008/008358 中描述的体外步骤进一步评价通过上述步骤或类似的高通量分析鉴定的蛋白-化合物组合物(例如, K_{cat} 和 K_m 值, 37°C 的稳定性, 熔解温度 (T_m), 内毒素水平, 在血浆中降解底物的能力)。当恰当的使用本文以及 PCT 公开 W0/2008/008358 中描述的体内步骤时,可以进一步评价相对于蛋白本身显示热稳定性的蛋白-化合物组合物(例如,功效,作用的持续时间,重复给药的效果,和/或免疫鉴定)。

[0193] 因此,对于这些筛选方法来说,所述蛋白优选的是酶。更优选的,所述蛋白是蛋白酶。甚至更优选的,所述蛋白是酯酶。最优选的,蛋白是可卡因酯酶(CocE),其具有与 SEQ ID NO:1 至少 80% 相同的氨基酸序列,能够特异性催化将可卡因裂解为芽子碱甲酯和安息香酸。优选的, CocE 具有与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同的氨基酸序列,更优选的, 95%, 甚至更优选的 99%。在一些优选的实施方案中, CocE 具有与 SEQ ID NO:1 相同的氨基酸序列。

[0194] 因为希望热稳定化合物在低浓度也有效,所以优选的在这些筛选方法中,存在于所述组合物中的化合物浓度低于约 1mM。更优选的,存在于所述组合物中的化合物浓度低于约 0.1mM。最优选的,存在于所述组合物中的化合物浓度低于约 0.025mM。

[0195] 优选的在这些筛选方法中,在所述化合物存在和不存在的条件下通过测量低温和高温下的蛋白功能来检测热稳定性,其中低温接近于蛋白功能的最适温度,并且蛋白在高温下要比在低温下更不稳定。优选的,高温是约 37°C,尤其当蛋白是 CocE 时。但是,对于其他酶来说,高温可以是大于约 40°C,大于约 50°C,大于约 60°C,大于约 70°C,大于约 80°C,大于约 90°C,大于约 95°C,或甚至大于约 98°C,例如,对于用于 PCR 的热稳定聚合酶来说。

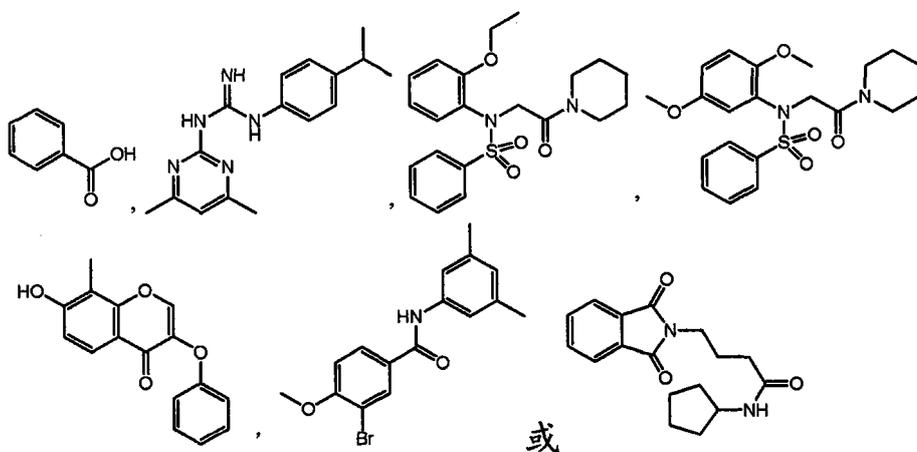
[0196] 可以检测蛋白功能的任意方面以确定有和没有化合物条件下的热稳定性。用于该目的蛋白功能优选实例是酶活性和配体结合。

[0197] 本申请还涉及上述组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途。优选的,可卡因诱导状况是服用可卡因过量,可卡因毒性,可卡因成瘾,或可卡因依赖。最优选的,可卡因诱导状况是服用可卡因过量。

[0198] 用于这些用途的CocE可以是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型CocE的热稳定突变体。优选的这类突变体具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,除了取代T172R,S159A,N197K,L169K,F189K,G173Q,或T172R/G173Q之外。在另一热稳定突变体中,CocE具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,除了取代L169K/G173Q之外。具有不止一种突变,优选的不止一种热稳定化突变的CocE突变体,也可用于这些治疗方法。

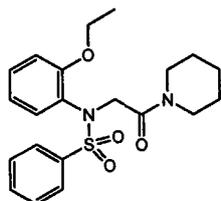
[0199] 这些用途不限于使用任意具体的热稳定化化合物。优选的,所述化合物是

[0200]



[0201] 更优选的,所述化合物是

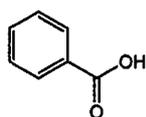
[0202]



(6031818).

[0203] 在其他优选的实施方案中,所述化合物是

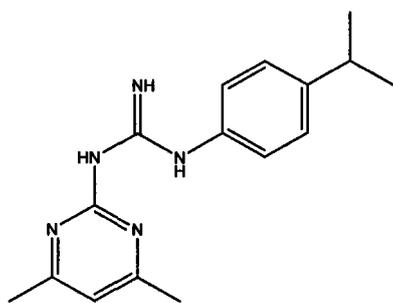
[0204]



(安息香酸)。

[0205] 所述化合物也可以是

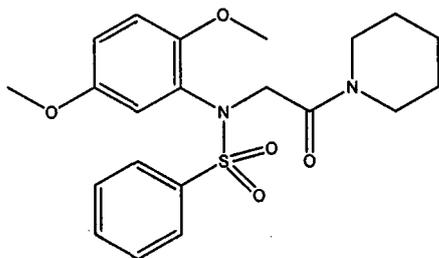
[0206]



(5804236).

[0207] 所述化合物还可以是

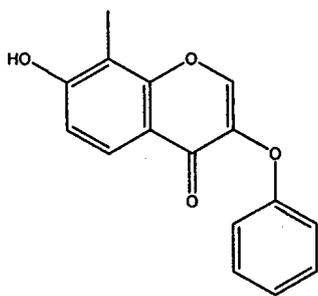
[0208]



(6169221).

[0209] 另外,所述化合物可以是

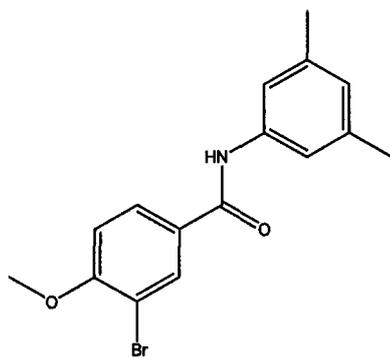
[0210]



(F6 460).

[0211] 此外,所述化合物可以是

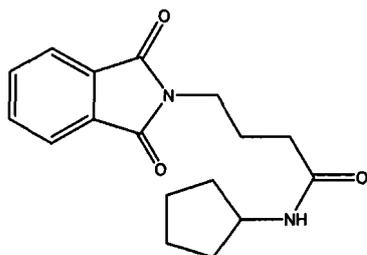
[0212]



(G2 30460).

[0213] 所述化合物也可以是

[0214]



(G3 30390)。

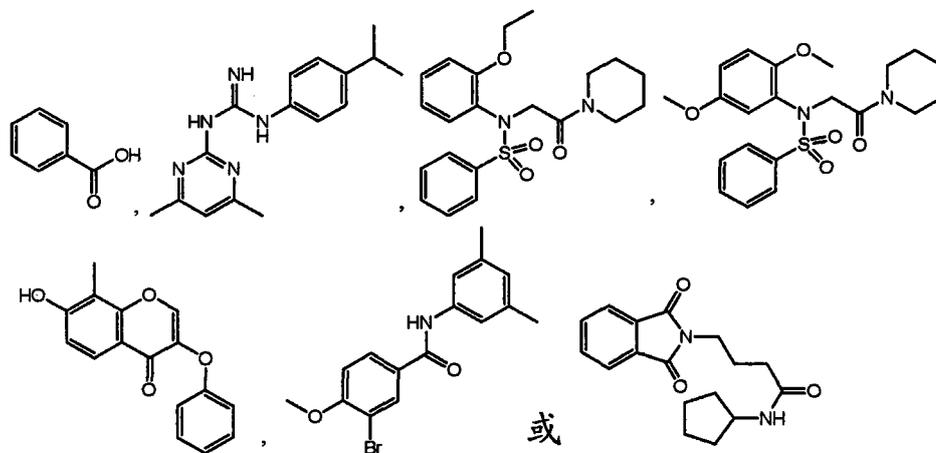
[0215] 在这些用途中, CocE 可以与不止一种热稳定化化合物组合, 例如如上所述化合物中的一种, 或与任意其他化合物组合。

[0216] 本申请还涉及上述组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。优选的, 可卡因诱导状况是服用可卡因过量, 可卡因毒性, 可卡因成瘾, 或可卡因依赖。最优选的, 可卡因诱导状况是服用可卡因过量。

[0217] 用于这些用途的 CocE 可以是具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的野生型 CocE 的热稳定突变体。优选的这类突变体具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, 或 T172R/G173Q 之外。在另一热稳定突变体中, CocE 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列, 除了取代 L169K/G173Q 之外。具有不止一种突变, 优选的不止一种热稳定化突变的 CocE 突变体, 也可用于这些治疗方法。

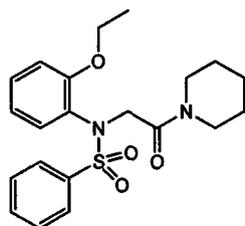
[0218] 这些用途不限于使用任意具体的热稳定化化合物。优选的, 所述化合物是

[0219]



[0220] 更优选的, 所述化合物是

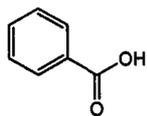
[0221]



(6031818)。

[0222] 在其他优选的实施方案中, 所述化合物是

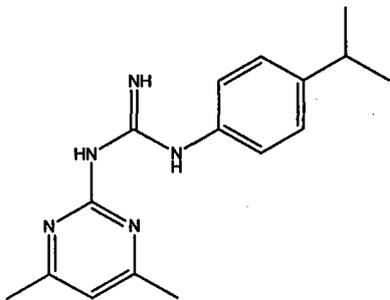
[0223]



(安息香酸)。

[0224] 所述化合物也可以是

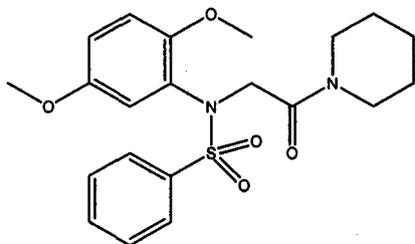
[0225]



(5804236)。

[0226] 所述化合物还可以是

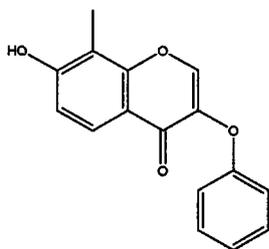
[0227]



(6169221)。

[0228] 另外,所述化合物可以是

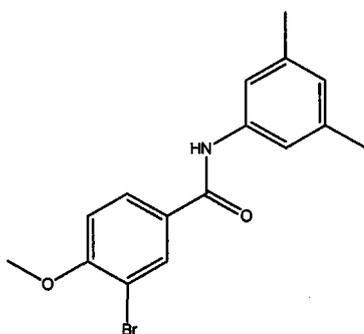
[0229]



(F6 460)。

[0230] 此外,所述化合物可以是

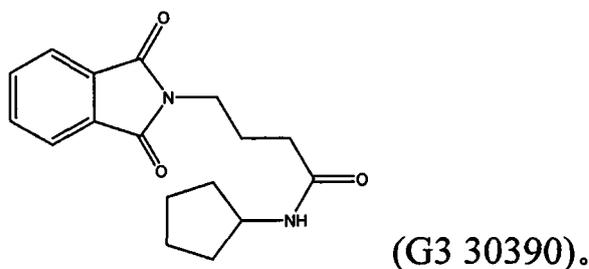
[0231]



(G2 30460)。

[0232] 所述化合物也可以是

[0233]



[0234] 在这些用途中, CocE 可以与不止一种热稳定化合物组合,例如如上所述化合物中的一种,或与任意其他化合物组合。

[0235] 本申请还涉及一种编码 CocE 多肽的分离的核酸,所述 CocE 多肽包括与 SEQ ID NO :1 的多肽具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。在这些实施方案中,编码的 CocE 多肽具有 (a) 取代 L169K 和 G173Q, 和 (b) 与野生型 CocE 相比,在 37°C 热稳定性增加的酯酶活性。参见实施例 5, 确认这种多肽在 37°C 的半衰期为约 72 小时,这是具有 SEQ IDNO :1 的序列的野生型酶的 300×。优选的,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO :1 的多肽至少 90% 序列同一性。更优选的,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO :1 的多肽至少 95% 序列同一性。甚至更优选的,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO :1 的多肽至少 99% 序列同一性。在最优选的实施方案中,核酸编码 CocE 多肽,所述 CocE 多肽具有 SEQID NO :1 的序列,除了取代 L169K 和 G173Q 之外。

[0236] 本申请还涉及由上述编码具有 L169K 和 G173Q 取代的 CocE 多肽的核酸中任意一种编码的 CocE 多肽。在一些实施方案中, CocE 多肽位于药学上可接受的载体中。

[0237] 在其他实施方案中,本申请涉及治疗患有可卡因诱导状况的哺乳动物的方法。所述方法包括以足以降低所述可卡因诱导状况对哺乳动物的影响的方式给所述哺乳动物施用上述包括具有 L169K 和 G173Q 取代的 CocE 多肽的组合物。

[0238] 此外,本申请涉及上述包括具有 L169K 和 G173Q 取代的 CocE 多肽的组合物在制备用于治疗可卡因诱导状况的药物中的用途。

[0239] 本申请还涉及上述包括具有 L169K 和 G173Q 的 CocE 多肽的组合物用于治疗可卡因诱导状况的用途。

[0240] 本发明的优选实施方案在下面实施例中进行描述。根据此处公开的本发明的说明或实践,本领域技术人员将很清楚属于本文权利要求范围内的其他实施方案。应理解说明以及实施例只是作为示例,本发明的范围和精神由实施例后的权利要求确定。

[0241] 实施例 1. 热稳定化 CocE 的化合物。

[0242] 可卡因酯酶是一种细菌表达的蛋白,其催化将可卡因裂解为两种无活性的副产物:芽子碱甲酯和安息香酸。该蛋白理论上可用于可卡因服用过量和成瘾的体内治疗,但是野生型蛋白在 37°C 是不稳定的。

[0243] 利用可卡因的光谱特性(其在 240nm 波长处吸收光最大)分析 CocE 对可卡因裂解的作用。通过监测 A240 处信号的减弱,使用各种浓度的可卡因并确定减弱的初速度,测量 CocE 活性。根据这些值可以确定酶的 V_{max} 。在监测活性前将酶在 37°C 预温育不同时间,可以计算 CocE 在 37°C 的半衰期。

[0244] 在正在进行的提高 CocE 热稳定性的尝试中,制备该蛋白的数种突变体并检测其体外半衰期。凝胶电泳的后续分析显示,自然条件下在 37°C 预温育不同时间后观察到蛋白

发生聚集 (PCT 公开 WO/2008/008358)。初始产物的消失可以通过光密度分析来检测,这种分析支持以下光谱数据:所述突变体的体外半衰期相对于 WT 和 S167A 突变体被延长。

[0245] 尽管预温育不同时间显示 WT CocE 在 37°C 的半衰期较短 (5 分钟),还注意到如果分光光度测定在 37°C 进行,则 CocE WT 将继续以线性速率裂解超过 60 分钟 (图 2, 中间) 或直至可卡因底物被耗尽 (图 2, 底部)。这表明在可卡因或其副产物存在的条件下 WT 酶被稳定化。

[0246] CocE 还能裂解另一底物, 4- 硝基苯基乙酸酯 (图 3)。通过检测 4- 硝基苯酚反应产物 (其在 400nm 处吸收光) 的出现监测裂解。对该底物在 37°C 的裂解分析显示, 所述产物最初很快产生, 但反应随着时间减慢 (图 3, 中间和底部)。这提示 4- 硝基苯基乙酸酯和产物有可能不稳定化酶, 或至少达不到可卡因反应的程度。

[0247] 为了分析底物和产物对 CocE WT 的稳定化作用, 在 37°C 温育 1 小时后检测每种化合物抑制 CocE 蛋白聚集体形成的能力。可卡因和安息香酸在一些浓度下抑制聚集体的形成, 但芽子碱甲酯和乙酸钠无法抑制 (图 4)。

[0248] 进一步对可卡因稳定化作用进行分光光度分析, 通过在各种浓度的可卡因存在条件下, 在 37°C 预温育不同时间后, 分析 CocE 裂解 4- 硝基苯基乙酸酯的能力。发现可卡因是更高浓度下 (62.5 和 125 μ M) 4- 硝基苯基乙酸酯裂解的抑制剂 (图 5)。发现比这低的浓度在 37°C 不是稳定化的。但是, 在 37°C 将更高浓度的 CocE 预温育不同时间显示, 该酶被足够稳定化, 能够裂解 4- 硝基苯基底物 (图 5)。

[0249] 安息香酸、芽子碱甲酯和乙酸钠对 CocE 稳定化作用的动力学分光光度分析未显示低于 125 μ M 的任何稳定化作用 (图 6)。但是发现在更高的浓度安息香酸既起抑制作用又起稳定化作用。

[0250] 为了进一步研究小分子对 CocE 的稳定化作用, 考虑了 CocE 裂解反应的其他抑制剂。苯基硼酸 (CocE 的不可逆抑制剂), 能够在 37°C 将 CocE WT 聚集作用稳定化 1 小时, 其 50% 稳定化浓度为大约 0.2 μ M (图 7)。

[0251] 上述数据表明, 可以通过添加酶的底物、产物或抑制剂来稳定化野生型 CocE。但是所有这些小分子都将酶活性抑制到一定程度。将鉴定是否存在小分子, 其能够阻止 CocE 聚集, 但不抑制酶活性。这类分子在体外 (例如, 酶制备期间) 和体内可以用做稳定剂。设计一种能够针对 CocE 的稳定化作用筛选 20,000 个小分子的文库的分析法。在这种分析法中, 将酶与化合物在 96 孔板中混合, 然后在 37°C 温育 1 小时。该分析法的对照通常是化合物稀释剂 (例如, DMSO), 未加热的酶, 以及与 2000 μ M 安息香酸混合的酶。在 37°C 温育后, 检测酶 / 化合物混合物裂解 4- 硝基苯基乙酸酯的能力 (图 8)。在这种温育后只有被稳定化的化合物能够裂解。

[0252] 首先检测 40 种化合物。利用合适的对照将所述化合物重复分析两次。利用复板 (duplicate plate) (不含酶) 作为阴性对照, 以检查在没有 CocE 的条件下化合物是否造成 400nm 吸光度的增加。发现数种化合物也增加 400nm 处的吸光度。一些会在没有 CocE 的条件下增加吸光度。将这些作为假阳性舍去。

[0253] 图 9 是在去除“无酶”裂解背景后, 全部化合物的 4- 硝基苯基乙酸酯裂解的初始速率图。具有显著活性 (高于只有 DMSO 的对照 2 个标准偏差) 的化合物用星号标记, 并显示这些化合物的化学结构。

[0254] 该分析法中最有效的化合物是化合物 6031818(图 10)。该化合物是 4-硝基苯基乙酸酯裂解的弱抑制剂(16 μ M;图 10,左图),并且完全不抑制可卡因裂解(图 10,右图)。

[0255] 高酶浓度条件下的稳定化分析显示,在 37°C 60 分钟后酶活性开始降低(图 11)。这个时间之后,6031818 能够稳定化野生型酶半衰期,在 20 μ M 使得半衰期从 12-14 分钟增加到 60-70 分钟。

[0256] 另一有效的化合物,6169221,具有与 6031818 非常类似的结构。该化合物也不抑制 4-硝基苯基乙酸酯或可卡因底物的裂解(图 12)。6169221 化合物稳定化酶的作用较弱,将半衰期从 7-12 分钟增加到 13-17 分钟。

[0257] 另一热稳定化化合物是 5804238。该化合物也不抑制 4-硝基苯基乙酸酯或可卡因的裂解(图 14)。5804238 稳定化酶的作用较弱,将半衰期从 9-10 分钟增加到 22-25 分钟(图 15)。

[0258] 实施例 2. 野生型和突变 CocE 的圆二色性。

[0259] 野生型(WT)CocE 和热稳定突变体的稳定性的进一步表征通过圆二色性进行,其检测蛋白构象和结构的微小变化。通过递增温度下重复 CD 检测的分析法能够分析蛋白的热力学和熔解温度(T_m),只要熔解是可逆的(即冷却时蛋白恢复其初始构象)。令人遗憾地,CocE WT 的熔解不是可逆的,所以无法确定真实的热力学。但是 CD 在确定解折叠的温度中仍是有价值的。在这些分析法中,CocE WT(图 16,顶部)在大约 39°C 熔解,而 T172R 突变体(图 16,底部)在 ~ 42°C 熔解,显示该突变体在 37°C 提供的热稳定性归因于比 WT 高 2-3 度的熔解温度。

[0260] 过量安息香酸存在条件下的 WT CocE(图 17,顶部)将 CocE 的熔解温度增加到 53°C,比 T172R 突变体高整整 10 度。这种浓度的安息香酸分子稍微具有光谱性,影响蛋白的光谱,但不影响熔解的光谱。5 \times 摩尔浓度苯基硼酸存在条件下的 WT CocE 分析(图 17,底部)增加熔解温度到 73°C,也就是说,比 WT 和 T172R 突变体高超过 30 度。

[0261] 另一 CocE 突变体 L169K 的 CD 分析,证实单独的熔解温度为 ~ 65°C,苯基硼酸存在条件下的熔解温度为 ~ 85°C(图 18),即苯基硼酸为 L169K 已经较高的初始熔解温度再增加 20°C 的熔解温度。

[0262] 6031818 存在条件下的 CocE WT 的 CD 分析证实其熔解温度为 ~ 42°C,类似于 T172R 突变体。

[0263] 实施例 3. 各种化合物与野生型和突变 CocE 的热稳定性分析。

[0264] 在 37°C 各种小分子存在的条件下将野生型 CocE 或 CocE 突变体 L169K 温育不同的时间点,然后在非变性凝胶上进行电泳。结果显示于图 20。使用点光密度法分析凝胶以确定这些条件下的 CocE 酶半衰期。参见图 21。苯基硼酸增加 CocE 的半衰期最多,其次是安息香酸。化合物 6041818 增加野生型酶的半衰期约 50%。

[0265] 实施例 4. 通过基于结构的分析鉴定 CocE 热稳定突变体

[0266] 实施例概述

[0267] 尽管在开发以多巴胺转运蛋白作为靶标的治疗中取得进展,但是在鉴定抗击可卡因滥用和服用过量的疗法中却收获较少。抗可卡因滥用和服用过量的治疗发展的更传统方法具有固有的挑战,即结合转运蛋白的可卡因竞争和变构抑制剂显示与可卡因类似的性能功效:抑制多巴胺的摄取。可卡因酯酶已经被开发用做抗可卡因诱导致死性的保护性疗

法。通过外源添加可卡因酯酶加速酶介导的全身性可卡因消化代表了可卡因滥用疗法的显著模式变化。此处报道了使用计算方法设计和产生显著更稳定的酶制剂。提供来自体外和体内研究的证据来表明,与野生型酶相比,改造的酶显示延长的半衰期(最高至30倍)和提高的热稳定性。此外已经获得X射线结晶证据,这提供了酶稳定性提高的结构原理。

[0268] 介绍

[0269] 使用基于结构的和计算学方法来产生在37°C稳定性增加的CocE突变体。使用CocE的晶体结构(Larsen et al,2002)以及利用RosettaDesign程序(Kirjiegian et al,2005;Kuhlman and Baker,2000)和AMBER程序(Case et al,2004)的分子建模、能量最低化和分子动力学(MD)模拟的组合。使用体外分析法评价表达和纯化的突变体的内在稳定性的提高。重要地是,36种预测的取代中有3种显示酶半衰期的显著提高,这通过体外分析法和体内保护免于可卡因诱导致死性来评价。确定这些突变体的X射线晶体结构以便研究热稳定性提高的结构基础。在每种情况下,取代增加酶的结构域间接触。突变CocE在体内稳定性的显著提高显示这种实验性方法以及CocE在可卡因滥用和成瘾中使用的前途。

[0270] 材料和方法

[0271] 材料。可卡因购自Mallinckrodt Inc.,St.Louis,MO。所有其他试剂都是分析级的,获自Fisher Biosciences和Sigma-Aldrich Corp。

[0272] 热稳定突变的设计。基于细菌可卡因酯酶(CocE)的X射线晶体结构(PDB编号1JU3)(Larson et al,2002),利用AMBER程序(Case et al,2004)内嵌有的能量最低化和分子动力学(MD)模拟构建结合(-)-可卡因的CocE的完整3D模型。为了增加CocE的热稳定性,使用在RosettaDesign程序(Kuhlman and Baker,2000)中实施的算法,其能够预测指定折叠内的热稳定化突变,并且将可能结构性破坏活性位点结构或抑制其柔性的主链任意变化降到最低。RosettaDesign程序中实施的方法使用能量函数评价指定折叠的特定序列的拟合度,并使用Monte Carlo检索算法用于对序列空间进行取样。相同方法被其他研究人员成功用于增加酶的热稳定性并且不降低催化效率(Korkegian et al,2005;Kuhlman and Baker,2000)。使用RosettaDesign程序的计算建模能够预测可潜在降低能量从而增加CocE热稳定性的一组突变。作为合理设计的第一轮,简化算法,只考虑与可卡因相距6-25 Å的氨基酸残基上的可能突变。

[0273] 定点诱变。使用改进的QuickChange(Stratagene)诱变方案和单寡核苷酸引物,利用克隆入细菌表达载体pET-22b(+)的CocE cDNA作为模板产生点突变。为了产生双突变体,具有单个点突变的cDNAs被用作第二轮诱变的模板。双向测序所有突变体的完整编码区。野生型和CocE突变体在37°C生长的大肠杆菌BL-21Gold(DE3)细胞中表达为C端6×His标记的蛋白。在18°C用1mM异丙基-β-硫代半乳糖苷(IPTG,Fisher)诱导蛋白表达12小时。

[0274] 可卡因酯酶和突变体的纯化。沉淀细胞,将其重悬于含蛋白酶抑制剂(亮抑酶肽和利马豆或大豆胰蛋白酶抑制剂各3μg/ml)的50mMTris pH 8.0,150mM NaCl中,然后利用French press(Thermo FisherScientific Corp,USA)裂解。使用Talon金属亲和层析(ClontechLaboratories, Inc, Mountain View CA)富集野生型或突变的CocE,然后使用阴离子交换(Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ)层析进行纯化。利用包含20mM Hepes pH 8.0,2mM MgCl₂,1mM EDTA和1mM DTT的150-450mM NaCl线性梯度缓冲液

从 Q-Sepharose 柱洗脱 CocE。合并峰组分,通过 Centricon-30 (Millipore) 进行浓缩,迅速在液氮中冰冻,然后保存于 -80°C 。

[0275] 可卡因水解的 Michaelis-Menten 动力学。使用可卡因水解的分光光度法实时分析来监测可卡因的水解 (Landry et al,1993)。利用 SOFTmax Pro 软件 (Version 3.1.2),使用 SpectraMax Plus 384UV 板读数器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 通过跟踪 240nm 处可卡因内在吸光度的变化 (6700Mlcm^{-1}) (Xie et al,1999) 来确定 (衰变的) 初始速率。通过向 $100\ \mu\text{L}$ 2X 可卡因溶液 ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 酶, 100mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4 和 300mM NaCl) 中添加 $100\ \mu\text{L}$ 2X 酶溶液 (100mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4 和 300mM NaCl) 起始反应。所有进行的分析均用 $100\ \mu\text{M}$ DTT, 除非另作说明。最终可卡因浓度如下: $125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95,$ 和 $0.977\ \mu\text{M}$ 。利用 Prism (GraphPad Software, San Diego) 计算 V_{max} 和 K_{m} 值。对于稳定性测量,将野生型和突变的酶稀释到 $2\times$ 浓度,并在 37°C 温育指定的时间。在每个时间点结束时,取出等分试样,如上所列观察动力学特性。

[0276] 体内针对可卡因致死性的保护。雄性 NIH-Swiss 小鼠 (25-32g) 获自 Harlan Inc. (Indianapolis, IN), 按照每笼 6 只小鼠的组饲养。所有小鼠都能够任意获得食物和水,并按照 12 小时光照 - 黑暗循环饲养,早晨 6 点半开灯,室温保持在 $21-22^{\circ}\text{C}$ 。按照国立卫生研究院采用和颁布的实验动物管理和使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 进行实验。实验方案获得密歇根大学动物使用和管理大学委员会的批准。

[0277] 可卡因诱导毒性的特征表现为致死性的发生,如观察到的活动和呼吸的终止所定义。在药物施用前将小鼠分别置于 Plexiglas 观察室 ($16\times 28\times 20\text{cm}$ 高) 中使其习惯 15 分钟。在腹膜内 (i. p.) 施用可卡因后,立即分别将小鼠置于相同室中进行观察。在可卡因施用后记录致死性的有或无 60 分钟。将小鼠置于小的限制室 (外管直径: 30mm ; 内管直径: 24mm) 中,只暴露尾部。通过酒精擦拭将尾部净化,将 30G1/2 精密滑动针头 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 插入一条侧静脉用于输注。CocE 或 CocE 突变体的 i. v. 注射体积是 0.2mL 每只小鼠。使用消毒纱布按压注射部位止血。

[0278] 在 i. p. 施用数种剂量的可卡因 ($180, 320, 560,$ 和 $1000\text{mg}/\text{kg}$, $n = 8/\text{剂量}$) 前 1 分钟, i. v. 施用酶 (0.3 或 1mg) 后评价 CocE 突变体抗可卡因诱导毒性的保护功效。确定有或无单剂量酶条件下可卡因诱导致死率的剂量反应曲线,以显示 CocE 突变体的体内保护作用。

[0279] 通过监测 i. p. 施用可卡因 ($\text{LD}_{100}, 180\text{mg}/\text{kg}$) 前 i. v. 施用酶 ($0.1, 0.3$ 和 1mg) 后的致死率来评价 CocE 和 CocE 突变体提供的抗可卡因毒性的保护持续时间。在施用酶后 1, 5, 10, 或 30 分钟,或 1, 2, 3, 4, 5 小时注射后监测致死率。每次治疗使用 8 只小鼠评价在单个时间点用单剂量酯酶预治疗的小鼠的致死率百分比 (即, 保护)。

[0280] 在功效研究中,利用跨越 50% 致死率发生的剂量反应曲线的一部分,通过最小二乘回归法计算组 LD_{50} 值。使用这些值比较在有或无酶预治疗的条件下可卡因剂量反应曲线的右移程度。在时程研究中,通过穿过 50% 致死率发生的每个时程曲线估算保护 (即, 50% 的致死率) 持续时间的时间点。

[0281] 将盐酸可卡因 (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO) 溶于无菌水,按照 $0.01\text{mL}/\text{g}$ 的体积腹膜内施用。将 CocE 或 CocE 突变体用磷酸盐缓冲盐水稀释为不同的浓度,按照 $0.2\text{mL}/$ 小鼠的体积静脉内施用。

[0282] 结晶和结构确定。按照先前的描述 (Larsen et al. 2002), 利用悬滴蒸汽扩散法生长晶体。对于收集来说, 向每个悬滴中添加 2 μ L 冷冻保护剂 (5mM Tris pH 7.0, 1.5M 硫酸铵, 10mM HEPES pH 7.5, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 825mM NaCl, 25% 甘油和当标明的時候 1mM DTT), 然后将晶体转移到 100% 冷冻保护剂中, 在液氮中快速冰冻。在盘设置 (tray set-up) 后 3 天内收集晶体。

[0283] 在由 GM/CA- 和 LS-CAT 提供光束线的 Advanced Photon Source 中收集衍射强度, 然后利用 HKL2000 处理 (reduce) 和标定 (scale) (Otwinowski et al, 1997)。初相 (initial phases) 来自于利用先前公开的 CocE 结构的直接分子取代 (Larsen et al, 2002)。REFMAC5 用于最大似然完善和模型构建, 利用 O 和 COOT 进行水添加。提供所有的突变侧链的明确密度。收集总共 23 个数据集, 每个晶体类型都有多个数据组, 从而可以比较 H2-H3 环的特性。利用 PyMol [http://www.pymol.org] 作图。坐标和结构因子储存于 PDB, 登录号为 2QAY (T172R), 2QAX (G173Q), 2QAW (T172R/G173Q), 2QAV (L169K), 2QAT (无配体的野生型) 和 2QAU (具有 DTT 加合物的野生型)。

[0284] 结果

[0285] 热稳定突变的设计。可卡因酯酶包含 3 个不同的结构域。结构域 I (残基 1-144 和 241-354) 构成典型的 α/β -水解酶折叠。结构域 II (残基 145-240) 是插入结构域 I 的链 $\beta 6-\beta 7$ 之间的一系列 7 个 α -螺旋。结构域 III (355-574) 主要由 β -片层组成, 包括总的来说凝胶卷样拓扑结构 (图 22A)。进行计算机研究, 包括 MD 模拟以及后续的能量分析以鉴定围绕活性位点 6-25 Å 的壳内的将稳定化 CocE 的取代。这种基于结构和机理的 CocE 突变体设计组合了以下方法: 能量最低化和利用 AMBER (Case et al, 2004) 的 MD 模拟以及利用 Rosetta Design 程序的建模研究 (Kuhlman and Baker, 2000)。尽管 CocE 在溶液和晶体中是二聚体, 但建模是利用单体进行的。表 1 总结的数据表明, 下列突变可以在热力学上稳定化 CocE 结构: R41I, N42V, K46A, S56G, T74S, F84Y, L119A, V121D, T122A, Q123E, S140A, L146P, A149S, Y152H, S159A, L163V, V160A, S167A, T172R, G173Q, F189L, A193D, A194R, I218L, W220A, V225I, T254R, V262L, S265A, W285T, A310D, C477T, L508G, K531A, Y532F, 和 D533S。CocE 结构上的突变位置显示于图 22A。根据预测这些单突变中的每一种将稳定化 CocE 结构 2.1 到 4.5 kcal/mol, 表明该蛋白的半衰期时间在室温下将延长至约 30 到 1000 倍 (表 1)。为了检验这些预测, 在大肠杆菌中表达编码 CocE 中突变的 cDNAs, 然后通过动力学和稳定性分析表征所获蛋白。在检测的 36 种突变体中, 围绕结构域 II 的螺旋 2 聚集的 3 种突变看起来提高酶在 37°C 的稳定性, 并且没有显著降低催化效率, 如下所述。

[0286] 表 1. 显示在 37°C 温育后稳定性提高的突变 CocE。通过将酶在 37°C 预温育不同时间来确定 $\tau_{1/2}$ 。在 RT (25°C) 确定活性测量值。 $\tau_{1/2}$ 为 12 分钟 (即野生型 [wt] CocE 的 $\tau_{1/2}$) 或更短的突变酶被认为不是热稳定的。W0/2008/008358 中也有该表。

[0287]

突变体	稳定性 @37 ($t_{1/2}$)
-----	-----------------------

T122A	无
Q123E	无
S159A	无
S140A	无
S167A/W52L	无
T172R	~ 46 分钟
V121D	无
L163V	无
F189A	无
F189A/T172R	~ 40 分钟 (类似于 T172R)
C107S	无
W220A	无
F189L	无
A193D	无
T172R/A193D	~ 40 分钟 (类似于 T172R)
G173Q	~ 25 分钟
T254R	无
N42V	无
T172R/G173Q	~ 326 分钟
G171Q/T172R/G173Q	无
G171A	无
G173A	无
wt-I175-G-D185	无
wt-T176-G-G-D185	无
T172R/G173Q-I175-G-D185	
T172R/G173Q-I175-G-G-A186	~ 75 分钟
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	~ 75 分钟
S177Q	无
D45R	无
F47R	无
L169K	~ 274 分钟
L174R	无
A181K	无
S179R	无
F189K	25 分钟
V190K	无
A194K	无
R182K	无

[0288] 体外动力学分析。为了评价野生型和突变 CocE 的酶活性,利用分光光度分析法在 37°C 直接检测可卡因的水解 (Xie et al, 1999)。初始速率然后用于确定 Michaelis-Menten 参数。为了评价热稳定性,在测量剩余活性前,将酶制剂在 37°C 预温育不同的时长 (表 1 和图 23)。37°C 的灭活以时间依赖性的衰变方式发生。在没有 DTT 的情况下,wt-CocE 在 37°C

的预温育按照指数规律降低酶活性,灭活半衰期 (τ_{inact}) 大约为 25 分钟。36 种预测突变体中的 3 种增加 CocE 的酶稳定性:T172R ($\tau_{inact} = 46$ 分钟), G173Q ($\tau_{inact} = 35$ 分钟;数据未显示) 和 L169K ($\tau_{inact} \sim 274$ 分钟)。尽管 T172R 和 G173Q 突变体未显示对酶催化效率的不利影响 (k_{cat} 分别为 $\sim 1 \times 10^8$ 和 2×10^8), 但 L169K 的 k_{cat} 被降低, 很可能是其对于可卡因酯酶的 K_m 增加至 ~ 5 倍的结果 (表 2)。有趣的是, 看起来在 37°C 显示显著稳定性的突变体都位于结构域 II 的螺旋 2 (图 22B)。结构域 II 还接近活性位点, 很有可能, 至少就 L169K 来说, 导致对 k_{cat} 的影响。还值得注意的是观察到将酶与 DTT 温育看起来加速野生型酶的衰变, 但对 T172R/G173Q 和 L169K 没有作用 (图 24)。还确定了 DTT 可以采用看起来混合竞争和非竞争的方式 (未显示) 抑制可卡因水解, 其 K_i 为 ~ 380 mM (图 25)。当将所述突变组合看起来进一步增强酶在 37°C 的稳定性时, 未观察到 DTT 的作用 (未显示)。

[0289] 表 2. 野生型和重新设计 CocE 突变体的动力学特性。按照方法部分的描述, 检测 wt-CocE, T172R, T172R/G173Q 或 L169K 的纯化制品对可卡因的代谢作用。利用 Prism (Graphpad, San Diego, CA) 估算 Michaelis 常数, K_m 和 K_{cat} 。

[0290]

酶	$t_{1/2}$ (分钟)	K_{cat} ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_m (M)	催化效率, K_{cat}/K_m (s^{-1})
wt-CocE	12.2	2323	0.021	1.11E+08
T172R	46.8	2502	0.024	1.05E+08
T172R/G173Q	326	2247	0.024	9.40E+07
L169K	274	3104	0.105	2.90E+07

[0291] T172R/G173Q 的活性 (尽管仍然对 37°C 的温育敏感), 但显示增强的稳定性和衰变 $\tau_{inact} \sim 326$ 分钟。但是, 观察到的催化活性稳定化在其最大催化速率的大约 35% (即在 $t = 10$ 小时)。这种失活模式在性质和数量上不同于 T172R 和 G173Q 单突变体以及 wt-CocE 的表现, 但类似于 L169K 的表现。出人意料的是, 三突变体 (L169K/G173Q/T172R) 未显示增强的稳定化 (数据未显示)。

[0292] 为了检验 37°C 酶稳定性的提高是否表示蛋白折叠的热稳定性提高, 在逐渐增高的温度下评价 CocE 的能力 (图 26)。在大约 30-35°C 30 分钟后, wt CocE 的活性突然直降。L169K 和 T172R/G173Q 均在更高的温度 (40-45°C) 下失活。不同温度下比较 wt-CocE 和 T172R/G173Q 的圆二色性分析 (近 UV 分析) 具有与催化活性的损失一致的溶解温度。

[0293] 体内分析。在施用可卡因前 1 分钟用 wt-CocE、L169K、T172R 或 T172R-G173Q 预处理保护小鼠免于可卡因诱导的致死性 (图 27)。酶保护作用 (按照 0.3mg, 或 9mg/kg) 将 100mg/kg 可卡因的 LD_{50} 值 (对于载体治疗组来说) 改变为 560 和 670mg/kg (对于 wt-CocE、T172R 或 T172R-G173Q 来说) (图 28)。L169K 的功效稍低, 需要更大的剂量 (1mg, 或 30mg/kg) 来产生类似的可卡因剂量反应曲线向右迁移 6-7 倍, 与体外分析中观察到的催化效率降低吻合。

[0294] 尽管利用低剂量 (0.1mg) 的任一种酶的预处理 (大于 30 分钟) 不能有效抵抗可卡因的致死效应, 但是更大的剂量 (0.3mg 和 1mg) 看起来是有效的, 其持续时间取决于突变

(图 28, 并概述于图 29)。在试验的最大剂量 (1mg) 下, 对于 wt-CocE 来说保护至 50% 致死率所需的酶预处理时间 (LT_{50}) 是大约 14 分钟。对于 T172R ($LT_{50} \sim 1.8$ 小时)、L169K ($LT_{50} \sim 3.3$ 小时) 和 T172R-G173Q ($LT_{50} \sim 4.5$ 小时) 来说观察到显著更长的 LT_{50} s, 与体外数据一致。

[0295] 稳定化突变体的结构分析。测定 wt-CocE (1.5 Å), 以及热稳定突变体 L169K (1.6 Å)、T172R (2.0 Å)、G173Q (2.5 Å) 和 T172R/G173Q (2.0 Å) 的高分辨率 X 射线晶体结构。图 30 概述了一些结果。关于无配体 wt-CocE 的结构描述先前没有报道, 这是我们研究中用于比较所必需的。

[0296] L169K、T172R、G173Q 和 T172R/G173Q 的结构都显示对于它们突变侧链的有序密度 (图 31)。在所有情况下, 取代看起来增加 CocE 结构域之间接触 / 掩藏表面区域的数量。侧基烷基链的延伸和在 T172R 通过精氨酸取代添加胍盐部分产生与螺旋 H3 中 F189 芳香环的范德华接触以及胍盐部分与 F189 的主链氧之间的氢键 (图 31A, B)。胍盐侧链还对着二聚体相关亚单位提供的 I205 侧链堆积。G173Q 的侧链与结构域 I 中 P43 的主链羰基形成跨结构域的氢键, 以及与 Y44 (其羟基促成活性位点的氧阴离子洞) 的范德华接触 (图 31C, D)。L169K 取代还与结构域 I 中 Y44 的苯基环形成接触 (图 31E, F)。赖氨酸的更长侧链可以影响卡因托烷环的结合位点, 可能导致该突变体显示的更高 K_m 。

[0297] 在先前报道的结构 (1JU3 和 1JU4) 和我们的结构中, 对于包括 H2 和 H2-H3 环 C 端的区域 (残基 171-183, 如图 32 所示) 来说, 我们观察到多种不同的构象。这两种构象在溶液中有可能是平衡的, 但这两种状态的群看起来受 H2 内突变的影响。因为稳定化突变体发现于 H2 螺旋中, 所以假设突变体可能有助于降低该区域的构象柔性, 从而热保护酶的折叠。对于该分析来说, 该区域的“out”构象被定义为由 1JU3 苯基硼酸加合物晶体结构代表, 其中与“in”构象 (由 1JU4 安息香酸晶体结构代表) 相比, 该区域弯曲远离结构域 I 的 H5-H6 螺旋直至 3.3 Å。还观察到该环区的第三种构象, 其类似于 1JU4 的构象, 除了残基 178-181 具有独特的构象外。

[0298] H2-H3 的表观球状柔性控制每个螺旋内的独特侧链构象。例如, 在‘out’构象中, I175 向 H3 移动, 迫使 F189 离开 H2 和 H3 之间的疏水界面, 而‘in’构象允许 F189 在该界面的里或外。

[0299] T172R 突变体的结构显示 F189 倾向于通过 R172 和 F189 侧链的紧密接触采用“out”位, 这是一种在 T172R/G173Q 突变体中更占优势的倾向。这些数据表明锁定 F189 的平面构象可能有助于 T172R 取代的热稳定化效应。在 T172R 或野生型背景下, 丙氨酸取代 189 位的苯丙氨酸未显示热稳定性的任何增强或减弱。因此, R172 与 H3 螺旋自身或或许与二聚体相关亚单位的相互作用看起来导致稳定性的增强。

[0300] CocE 活性位点中 DTT- 碳酸酯加合物的形成。导致该研究复杂化的是活性位点中格外强的密度, 这看起来对应于与 CocE 的催化丝氨酸 (Ser117) 的共价加合物。这类密度先前未被报道 (图 33) (Larsen et al, 2002)。电子密度对应于具有两个取代臂的五元环。异常差异 Fourier 图证实了每条臂中硫的存在, $2F_o - F_c$ omit 图描绘了不同水平上鉴定的加合物中的氧原子 (图 33)。因此, 可以总结得出, 所述密度对应于 DTT, 其包括在结晶和收集液 (10mM) 中, 与活性位点的重碳酸盐反应。2- 氧代 - 二氧戊环显示被捕获为四面体中间体末端 (dead-end) 复合物, 其中四面体氧中的一个占据氧阴离子洞形成加合物, 2- 氧

代-二氧戊环丁酰碳酸酯或 DBC。在最高解析度的结构 (L169K) 中,二氧戊环中估计由碳酸酯提供的碳是距 S117 γ -氧(氧阴离子洞中的氧) $\sim 1.6 \text{ \AA}$ (距离不受高分辨率结构精修(refinement)的限制),距氧阴离子洞中的氧和 DTT 提供的两个氧原子 $1.4\text{--}1.5 \text{ \AA}$,最符合共价键。这种四面体碳的电子密度低于 DTT 配体中其他碳的电子密度,表明电子退出。2-氧代-二氧戊环加合物采用与含 CocE 的 2 苯基硼酸盐加合物类似的构象 (Larsenet al, 2002),除了四面体中心是转动的以外。

[0301] 为了证明这种加成复合物的形成不是我们的稳定化突变体的结果,确定有和没有 DTT 条件下的 wt-CocE 结构,并且还确定没有 DTT 条件下 CocE 稳定化突变体的结构。在 DTT 与 CocE 共结晶的所有情况下,观察加合物,在有或没有 DTT 的条件下 H2-H3 插入物的位置基本上是一样的。在本文测试的体外条件下,即与 DTT 相对较短的温育时间 (< 60 分钟), DTT 与底物竞争性地抑制 CocE 活性。应注意随着温育时间从数天到数周(可想象地允许 DBC 加合物形成的时间尺度)晶体生长条件是显著不同的。加合物形成还应展示显著不同的抑制模式,表现为非竞争性的抑制剂。有 DTT 或没有 DTT 条件下生长并且随后浸入可卡因类似物阿托品(看起来取代加合物)的晶体反而显示水分子靠近 S117 和高 B⁻ 因子(针对包括催化三联体的 S117 和 H287 的活性位点残基)。

[0302] 讨论

[0303] 迄今为止, CocE 是最有效的水解可卡因和降低可卡因体内水平的催化剂,用于在小鼠和大鼠中保护免于可卡因诱导的致死性 (Turner et al, 2002 ;Ko et al, 2007 ; Cooper et al, 2006 ;Garrera et al, 2005 ;Gasior et al, 2000 ;Daniels et al, 2006 ; W0/2008/08358)。啮齿动物中可卡因毒性这种“解毒剂”的有效性提示 CocE 是人类中的潜在治疗剂。但是, wt-CocE 显示相当的不稳定性,因为其在血流中的有效半衰期是 ~ 10 分钟。比较起来,四聚体 BchE, 在小鼠血浆中维持 16 小时,直至注射后 7 小时仍有活性 (Duysen et al, 2002),而抗可卡因 Ab 在小鼠循环中维持 8.1 天 (Norman et al, 2007)。即使如此, wt-CocE 的临床潜力表明其保护作用的持续时间在急性过量情况下(诸如由嗅吸或注射造成的过量)有可能是足够的 (Landry et al, 1993)。

[0304] 在涉及严重过量的情况下,就如“cocaine mules”(其中大量可卡因将释放入血流很长一段时间)的情况一样,需要作用时间更长的 CocE。因此 CocE 较短的有效血浆半衰期代表了在开发用于可卡因诱导致死性的急性治疗和可卡因滥用的慢性治疗的基于该蛋白的治疗剂中的主要障碍。

[0305] 此处,提供体外数据来证明相对较短的体内半衰期可能是体外容易观察到的 CocE 热灭活的结果。CocE 的热敏感性可能反映以下事实,红球菌属物种(分离 CocE 的微生物)在大约 20°C 的中等温度下在古柯植物下的土壤中生长茂盛 (Mackay, 1886 ;Martin, 1952),远远低于啮齿动物的体温 ($37\text{--}38^{\circ}\text{C}$)。

[0306] 在计算预测的 36 种突变体中,3 种突变显示增强的热稳定性。许多突变体是不稳定的,不能被过表达和纯化为功能性酶(表 1)。通过组合热稳定点突变体中的两种,产生相当热稳定的 CocE 突变体 G173Q/T172R,这将 37°C 的体外 τ_{inact} 从 10 分钟延长到 $4\text{--}1/2$ 小时,或大约 27 倍。在啮齿动物中作为突变体保护免于急性可卡因诱导的致死性的能力的函数的突变体体内分析与体外分析一致。

[0307] 计算建模研究的结果是惊人的,因为在 574 个氨基酸残基的酶中鉴定出数种稳定

的突变体。令人遗憾的是,这些方法的解析度不足以阐明突变体热稳定化效应的准确机制。但是,结合 X 射线结晶法有可能在原子解析度弄清导致增强稳定性的合理模型。通常更大的或带电荷的残基的取代诸如谷氨酰胺(取代甘氨酸),赖氨酸(取代亮氨酸)或精氨酸(取代苏氨酸)有助于稳定化结构域-结构域相互作用。酶中最不热稳定的结构域经鉴定是结构域 II,其包含 H2 和 H3 螺旋。

[0308] H2-H3 螺旋中热稳定取代的位置,和 H2-H3 环自身的结构异质性表明,H2-H3 螺旋区是固有不稳定的,可能最终成核或至少很大程度上导致 CocE 的聚集或解折叠。来自李斯特氏菌属 (*Listeria*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种(两种都能够在 37°C 存活)的 CocE 直向同源物具有显著更短的 H2&H3 螺旋,因此具有有可能更稳定的结构域 2(Genbank 登录号分别为 ZP 01928677 和 YP 660510)。但是,CocE 中 H2 和 H3 螺旋之间环的平截或完全去除将酶灭活(参见表 1)。

[0309] CocE 活性位点中 DTT-碳酸酯加合物的存在显然由酶催化。其他碳酸酯,诸如碳酸丙烯酯(4-甲基-2-氧代-1,3-二氧戊环)据报道在水中被分解成丙二醇和 CO₂。从 DTT 的逆向合成,邻位二醇和 CO₂ 因此是可以想象得到的。DTT 加合物看起来与催化性 S117 共价结合,大部分以如苯基硼酸的总的方式(Larsen et al,2002),尽管其 1.6 Å 的键长(与~1.43 Å 的预期距离形成对照)表明部分共价特性。DBC 二氧戊环的环平面与 CocE 的苯基硼酸和安息香酸结合形式的苯环平面重叠(Larsen et al,2002)。因为结合 DBC 的 wt-CocE 的活性位点残基的构象与苯基硼酸的结合形式相差很小,Larson 等(2002)在晶体结构中未观察到加合物有可能归因于安息香酸或苯基硼酸盐的互斥结合。

[0310] CocE 的晶体结构表明酶作为二聚体存在,初步研究表明该二聚体在低浓度是足够稳定的可以通过凝胶过滤分辨,尽管 37°C 的预处理诱导蛋白聚集并从尺寸排阻柱的柱空隙中洗脱。有趣的是,T172R/G173Q 和 L169K 失活的动力学仔细分析显示,活性在第一相位按指数规律降低,但看起来在其最大活性的大约 35% 处达到平台期。与 wt-CocE、G173Q 和 T172R(其中活性在 90 分钟内衰变至低于 10% 活性)相反,这种活性甚至在大于 8 小时后仍然保持。对于这种特性(T172R/G173Q 和 L169K 的)的貌似合理的解释是,仍然存在酶的热敏感部分,其不导致完全的酶失活。剩余的热敏感区可以位于二聚体界面,该二聚体界面的破坏可能导致聚集。先前提及的凝胶过滤层析数据与该观点一致。实际上,正在进行二聚体界面内其他突变体的进一步研究和表征。

[0311] 或许突变最引入注目的效果是由它们体内保护免于可卡因诱导的致死性的能力显示的。突变的效果相应于通过延长酶能够抵御的预处理持续时间的我们的体外数据。就 T172R/G173Q 而言,酶仍然能够保护免于可卡因诱导的致死率达到 50% 的预处理持续时间被延长至大于 20 倍,或延长直至 4.5 小时。这有力表明 CocE 体内不稳定性的原因与体外观察到的酶不稳定性的原因相同。

[0312] 总之,本工作显示组合计算、生化和结构分析的多管齐下(multi-pronged)方法可用于合理开发比天然酶显著更稳定的 CocE 变体。

[0313] 实施例 5. CocE 实变体 L169K/G173Q

[0314] 如下制备和表征 CocE 的突变体 L169K/G173Q。

[0315] 热稳定突变的设计。基于细菌可卡因酯酶(CocE)的 X 射线晶体结构(PDB 编号 1JU3)(Larsen et al,2002),利用 AMBER 程序(Case et al,2004)(参见上面的实施例 4)内

嵌有的能量最低化和分子动力学 (MD) 模拟构建结合 (-)-可卡因的 CocE 的完整 3D 模型。为了增加 CocE 的热稳定性, 使用在 RosettaDesign 程序中实施的算法 (Kuhlman and Baker, 2000 ; Korkegian et al, 2005)。该方法能够预测指定折叠内的热稳定化突变, 并将有可能结构性破坏活性位点结构或抑制其柔性的主链任意变化降至最低。RosettaDesign 程序中实施的方法使用能量函数评价指定折叠的特定序列的拟合度, 并使用 Monte Carlo 检索算法用于对序列空间进行取样。相同方法被其他研究人员成功用于增加酶的热稳定性并且不降低催化效率 (Kuhlman and Baker, 2000 ; Korkegian et al, 2005)。使用 RosettaDesign 程序的计算建模能够预测潜在降低能量从而增加 CocE 热稳定性的一组突变。作为合理设计的第一轮, 简化算法, 只考虑与催化部位相距 6-25 Å 的氨基酸残基上的可能突变。

[0316] 定点诱变。将 169 和 173 位的点突变导入 CocE cDNA, 所述 CocE cDNA 被克隆入细菌表达载体 pET-22b(+). 使用改进的 QuickChange (Stratagene) 诱变方案和单寡核苷酸引物产生突变。为了产生双突变体, 具有单个 G173Q 点突变的 cDNAs 被用作导入 L169K 的第二轮诱变的模板。双向测序突变体的完整编码区。野生型和 CocE 突变体在 37°C 生长的大肠杆菌 BL-21Gold(DE3) 细胞中表达为 C 端 6×His 标记的蛋白。在 18°C 用 1mM 异丙基-β-硫代半乳糖苷 (IPTG, Fisher) 诱导蛋白表达 12 小时。

[0317] 可卡因酯酶和突变体的纯化。沉淀细胞, 将其重悬于含蛋白酶抑制剂 (亮抑酶肽和利马豆或大豆胰蛋白酶抑制剂各 3 μg/ml) 的 50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl 中, 然后利用 French press (Thermo Fisher Scientific Corp, USA) 裂解。使用 Talon 金属亲和层析 (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View CA), 继之以阴离子交换 (Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ) 层析富集野生型或突变的 CocE。利用包含 20mM Hepes pH 8.0, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA 和 1mM DTT 的 150-450mM NaCl 线性梯度缓冲液从 Q-Sepharose 柱洗脱 CocE。合并峰组分, 通过 Centricon-30 (Millipore) 进行浓缩, 迅速在液氮中冰冻, 然后保存于 -80°C。

[0318] 催化效率的确定。为了确定催化活性, 进行分光光度分析。向包含递增可卡因浓度 (0.5, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 100, 和 150 μM) 的 96 孔 UV 可透过平板中添加 L169K/G173Q CocE 的样品得到 10ng/ml CocE 的终浓度, 终体积为 200 μl。使用 SOFTmax Pro 软件 (Version 3.1.2), 通过 SpectraMax Plus 384UV 板读数器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 检测 20 分钟内 240nm 处的吸光度变化, 每 10 秒读一次。将吸光度的变化转化为浓度的变化, 然后确定每摩尔酶的衰变速率 (K_{cat})。利用 Prism (GraphPad software, San Diego) 确定酶的 K_{cat} 和 K_m 。L169K/G173Q 突变使得每分子酶每分钟能够将大约 6000 个可卡因分子转化为无活性的代谢产物。 K_{cat} 相对于野生型和先前的 T172R/G173Q 突变的增加伴随 K_m 的增加, 这导致与野生型和 T172R/G173Q 突变类似的催化效率 (图 34)。

[0319] 体外半衰期的确定。为了模拟 NIH Swiss 小鼠中的体温和酶浓度, 在 37°C 水浴中温育浓度为 60 μg/ml 的 CocE, 其溶于人血浆或磷酸盐缓冲盐水 (PBS) pH 7.4 中。将在 -80°C 保存不同时间 (0, 24, 48, 77, 96, 120 小时) 的样品直接添加到 37°C 水中, 然后在如上所述的 10ng/ml 终浓度下分析所有样品。

[0320] 169 和 173 位赖氨酸和谷氨酸的分别取代将体外半衰期延长到大约 72 小时, 这是野生型酶的 332 倍, 是 T172R/G173Q 突变的 17 倍 (图 35)。

[0321] 体内功效的确定。体内也显示 K_{cat} 的增加。L169K/G173Q 突变的 CocE 剂量依赖性

地保护小鼠免于递增的致命剂量可卡因的伤害（图 36）。将 0.2ml 体积的 CocE IV 施入 NIH Swiss 小鼠的尾静脉。1 分钟后将不同浓度的可卡因输送到腹膜内腔。这种突变体被证明比先前的 CocE 突变体更有效，在低至 0.01mg 的剂量仍维持一定程度的保护。功效的增加将允许使用更少的酶，从而减轻动物对蛋白的先天性免疫应答。在与其他酶突变相同的浓度下，功效的增加使得该酶能够更加有效的抵抗极端剂量的可卡因（可见于人服用过量的情况下）。

[0322] 体内半衰期的鉴定。将 0.2ml 体积的 CocE IV 施用到尾静脉。在 CocE 施用后指定时间用腹膜内输送的 180mg/kg 可卡因攻击动物。在 1mg 检测 CocE 的 L169K/G173Q 突变体与其他突变体，因为在初步研究中不同 CocE 突变体的体内热稳定性之间 1mg 的 CocE 显示最大的区别（数据未显示）。CocE(1mg) 的 L169K/G173Q 突变体保护 50% 的 NIH Swiss 小鼠不死亡直至 7.5 小时。与先前的突变相比，更低剂量的 L169K/G173Q 突变也显示延长的免于致死性的保护（图 37）。

[0323] SEQ ID NO :1- 红球菌属 CocE 氨基酸序列

[0324] 1 mvdgnysvas nvmvpmrdgv rlvldlyrpd adgpvpvllv rnpydkfdvf awstqstnwl

[0325] 61 efvrldgyavv iqdtrglfas egefvphvdd eadaedtlsw ileqawcdgn vgmfgvsylg

[0326] 121 vtqwqaavsg vggkaiaps masadlyrap wygpggalsv eallgwsali gtglitsrsd

[0327] 181 arpedaadvf qlaailndva gaasvtplae qllgrlipw vidqvvdhpd ndeswqsisl

[0328] 241 ferlgglatp alitagwydg fvgeslrftv avkdnadarl vvgpwwshnl tgrnadrkfg

[0329] 301 iaatypiqea ttmhkaffdr hlrgetdala gvpkvrlfvm gidewrdetd wlpdtdaytp

[0330] 361 fylggsgaan tstgggtlst sigstesadt ylydpadpvp slgggtllfhn gdngpadqrp

[0331] 421 ihdrddvlcy stevltdpve vtgtvsarlf vsssavtdfd taklvdvfpd graialcdgi

[0332] 481 vrmryretlv nptlieagei yevaidmlat snvflpghri mvqvsssnfp kydrnsntgg

[0333] 541 viareqleem ctavnrihrg pehpshivlp iikr

[0334] 参考文献

[0335] Administration, S. A. a. M. H. S. Drug Abuse Warning Network, 2005 : National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. (ed. Office of Applied Studies, U. D. o. H. a. H. S.) (2005).

[0336] Baird, T. J. , Deng, S. X. , Landry, D. W. , Winger, G. & Woods, J. H. Natural and artificial enzymes against cocaine. I. Monoclonal antibody 15A10 and the reinforcing effects of cocaine in rats. J Pharmacol Exp Ther 295, 1127-34 (2000).

[0337] Bauman JL and DiDomenico RJ. J Cardiovasc Pharmacol Ther 7, 195-202 (2002).

[0338] Benowitz, N. L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. Pharmacol Toxicol 72, 3-12 (1993).

[0339] Bresler, M. M. , Rosser, S. J. , Basran, A. & Bruce, N. C. Gene cloning and nucleotide sequencing and properties of a cocaine esterase from Rhodococcus sp. strain MB1. Appl Environ Microbiol 66, 904-8 (2000).

[0340] Browne, S. P. , Slaughter, E. A. , Couch, R. A. , Rudnic, E. M. & McLean, A. M. The influence of plasma butyrylcholinesterase concentration on the in vitro

hydrolysis of cocaine in human plasma. *Biopharm Drug Dispos* 19,309-14(1998).

[0341] Carmona, G.N. et al. Plasma butyrylcholinesterase activity and cocaine half-life differ significantly in rhesus and squirrel monkeys. *Life Sci* 59, 939-43(1996).

[0342] Carmona et al. *Drug Metabolism & Disposition* 28,367-371(2000).

[0343] Carrera, M. R. , Ashley, J. A. , Wirsching, P. , Koob, G. F. & Janda, K. D. A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,1988-92(2001).

[0344] Carrera, M.R. et al. Treating cocaine addiction with viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,10416-21(2004).

[0345] Carrera, M. R. , Trigo, J. M. , Wirsching, P. , Roberts, A. J. & Janda, K. D. Evaluation of the anticocaine monoclonal antibody GNC92H2 as an immunotherapy for cocaine overdose. *Pharmacol Biochem Behav* 81,709-14(2005).

[0346] Carroll FI, Howell LL and Kuhar M. J. *J Med Chem* 42,2721-2736(1999).

[0347] Case, D. A. et al. AMBER 8. University of California, San Francisco(2004).

[0348] The CCP4 suite :programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50,760-3(1994).

[0349] Comer, S. D. et al. Depot naltrexone :long-lasting antagonism of the effects of heroin in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 159,351-60(2002).

[0350] Cooper, Z. D. et al. Rapid and robust protection against cocaine-induced lethality in rats by the bacterial cocaine esterase. *Mol Pharmacol* 70, 1885-91(2006).

[0351] Daniels, A. , Ayala, E. , Chen, W. , Coop, A. & Matsumoto, R. R. N-[2-(m-methoxyphenyl)ethyl]-N-ethyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethylamine (UMB 116) is a novel antagonist for cocaine-induced effects. *Eur J Pharmacol* 542, 61-8(2006).

[0352] Deng, S. X. , de Prada, P. & Landry, D. W. Anticocaine catalytic antibodies. *J Immunol Methods* 269,299-310(2002).

[0353] Duysen, E. G. , Bartels, C. F. & Lockridge, O. Wild-type and A328W mutant human butyrylcholinesterase tetramers expressed in Chinese hamster ovary cells have a 16-hour half-life in the circulation and protect mice from cocaine toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 302,751-8(2002).

[0354] Emsley, P. & Cowtan, K. Coot :model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60,2126-32(2004).

[0355] Gao Y and Brimijoin S. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 310,1046-1052(2004).

[0356] Gao, Y. et al. Gene transfer of cocaine hydrolase suppresses cardiovascular responses to cocaine in rats. *Mol Pharmacol* 67,204-11(2005).

[0357] Gasior, M. , Ungard, J. T. & Witkin, J. M. Chlormethiazole :effectiveness

- against toxic effects of cocaine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 295,153-61(2000).
- [0358] Gorelick, D. A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depend* 48,159-65(1997).
- [0359] Grabowski et al. *Addictive Behaviors* 29,1439-1464(2004).
- [0360] Inaba T. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 67, 1154-1157(1989).
- [0361] Kantak, K. M. Anti-cocaine vaccines: antibody protection against relapse. *Expert Opin Pharmacother* 4,213-8(2003).
- [0362] Knuepfer MM. *Pharmacol Ther* 97,181-222(2003).
- [0363] Ko, M. C. et al. Cocaine esterase: interactions with cocaine and immune responses in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320,926-33(2007).
- [0364] Korkegian, A. , Black, M. E. , Baker, D. & Stoddard, B. L. Computational thermostabilization of an enzyme. *Science* 308,857-60(2005).
- [0365] Kosten et al. *Vaccine* 20,1196-1204(2002).
- [0366] Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60,2256-68(2004).
- [0367] Kuhlman, B. & Baker, D. Native protein sequences are close to optimal for their structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97,10383-8(2000).
- [0368] Landry, D. W. , Zhao, K. , Yang, G. X. , Glickman, M. & Georgiadis, T. M. Antibody-catalyzed degradation of cocaine. *Science* 259,1899-901(1993).
- [0369] Larsen, N. A. et al. Crystal structure of a bacterial cocaine esterase. *Nat Struct Biol* 9,17-21(2002).
- [0370] Lynch, T. J. et al. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 145,363-71(1997).
- [0371] Mackay, J. B. L. Erythroxyton coca. *Tropical Agriculturist* 6,249(1886).
- [0372] Martin, L. A. Brief notes on the cultivation of coca. *Agronomia* 17, 77-80(1952).
- [0373] Mattes, C. E. et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* 145,372-80(1997).
- [0374] Meiler, M. M. et al. Fluorescent cocaine probes: a tool for the selection and engineering of therapeutic antibodies. *J Am Chem Soc* 127,2477-84(2005).
- [0375] Mets, B. et al. A catalytic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10176-81(1998).
- [0376] Murshudov, G. N. , Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53,240-55(1997).
- [0377] Newman, A. H. & Rothman, R. B. *Addiction*, 169-192(Elsevier, Amsterdam, London,

2007).

[0378] Norman, A. B. et al. A chimeric human/murine anticocaine monoclonal antibody inhibits the distribution of cocaine to the brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 145–53 (2007).

[0379] Otwinowski, Z., Minor, W. & Charles W. Carter, Jr. [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 276 307–326 (Academic Press, 1997).

[0380] Rogers, C. J., Mee, J. M., Kaufmann, G. F., Dickerson, T. J. & Janda, K. D. Toward cocaine esterase therapeutics. *J Am Chem Soc* 127, 10016–7 (2005).

[0381] Sun et al. *Molecular Pharmacology* (2002a).

[0382] Sun et al. *Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 710–716 (2002b).

[0383] Turner, J. M. et al. Biochemical characterization and structural analysis of a highly proficient cocaine esterase. *Biochemistry* 41, 12297–307 (2002).

[0384] Veronese, F. M. & Harris, J. M. Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 453–6 (2002).

[0385] Wilson LD and Shelat C. *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777–788 (2003).

[0386] Xie, W. et al. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. *Mol Pharmacol* 55, 83–91 (1999).

[0387] Yang, G. et al. Anti-Cocaine Catalytic Antibodies: A Synthetic Approach to Improved Antibody Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5881–5890 (1996).

[0388] PCT 公开 W0/2008/008358.

[0389] 根据上文, 将明白本发明的数个优点被实现, 并且获得其他优点。

[0390] 因为在不脱离本发明范围的情况下可以对上述方法和组合物进行各种变化, 所以意指上述说明书包含的以及附图显示的所有内容均应被解释为说明性的, 而不是限制性的。

[0391] 本说明书引用的所有参考文献在此通过援引并入。本文对于参考文献的讨论仅仅旨在概述作者做出的主张, 而不是认可任何参考文献构成现有技术。本申请人保留质疑所引用参考文献的准确性和相关性的权利。

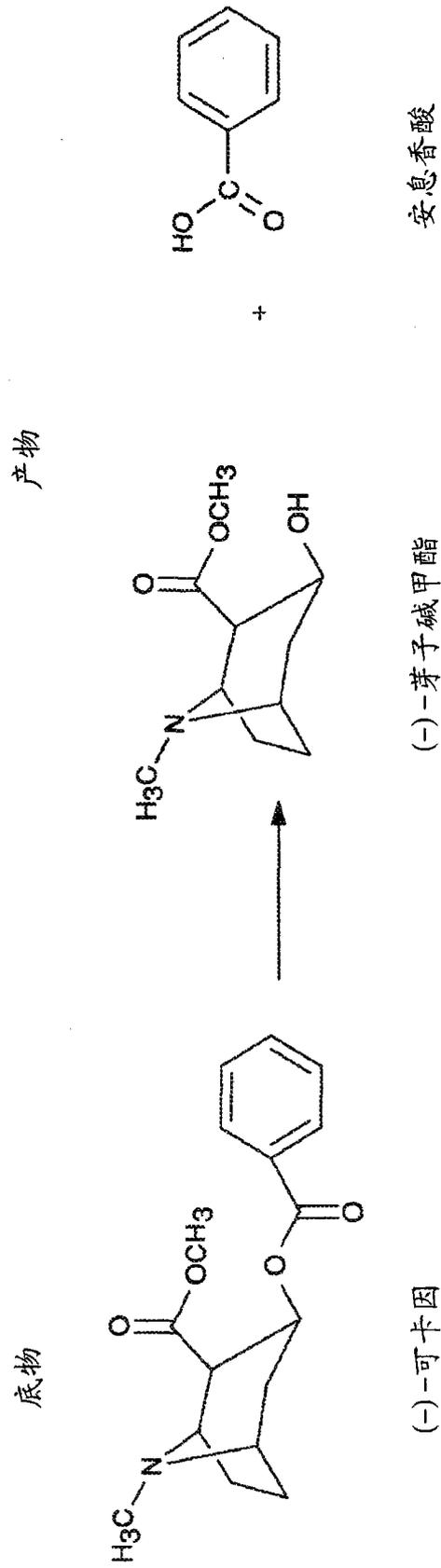


图 1

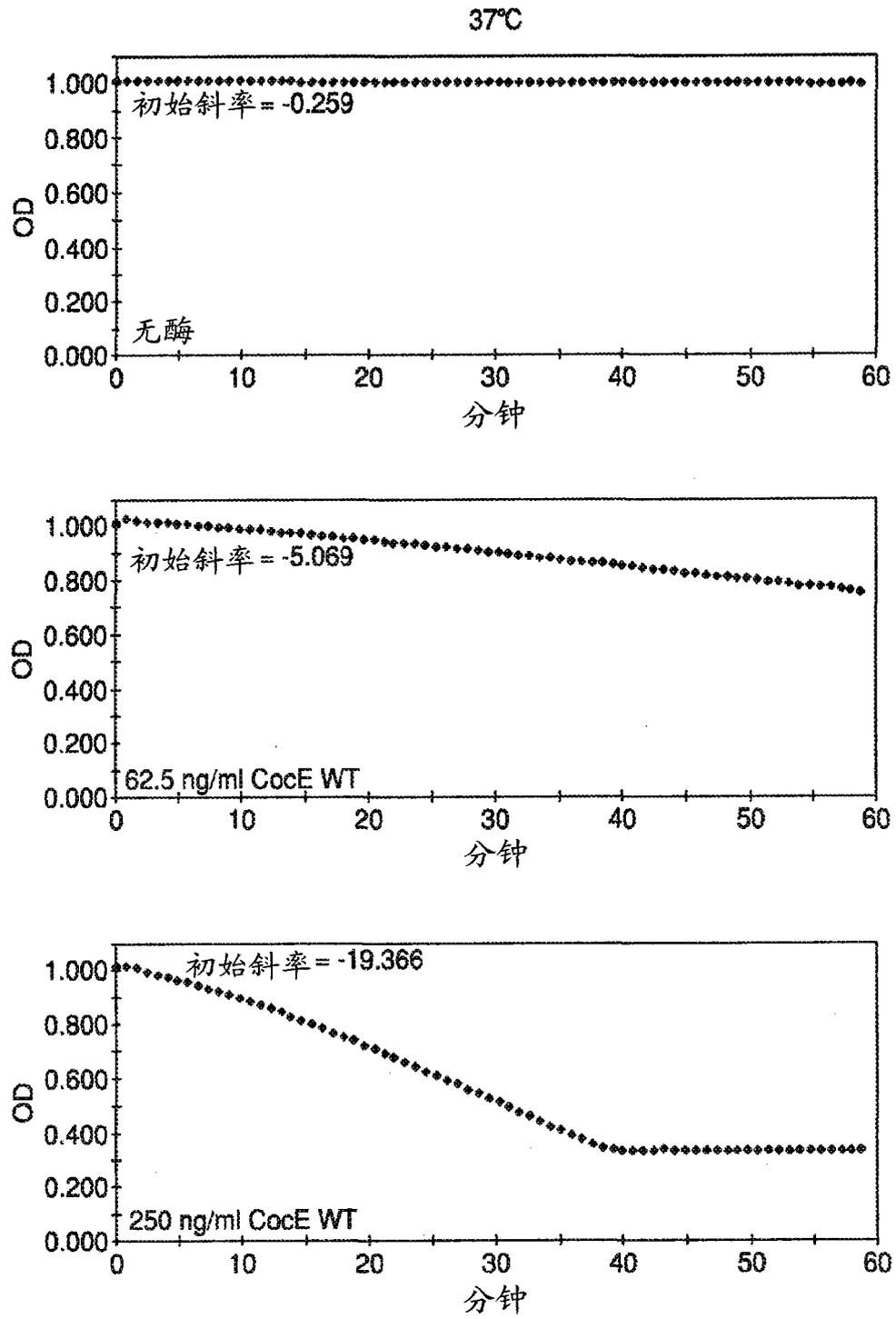


图 2

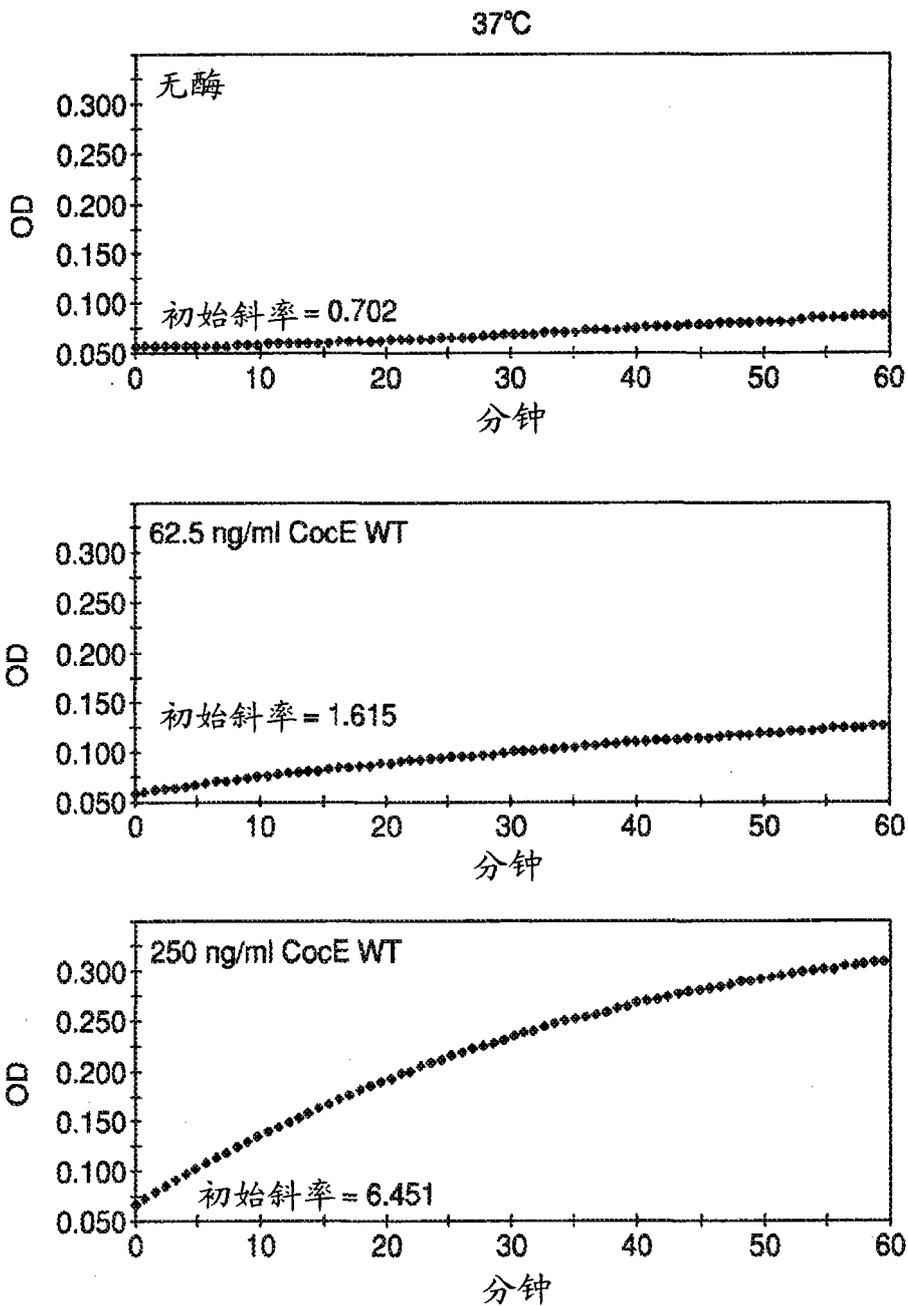
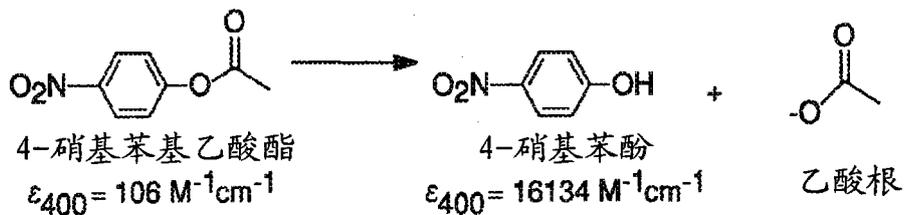


图 3

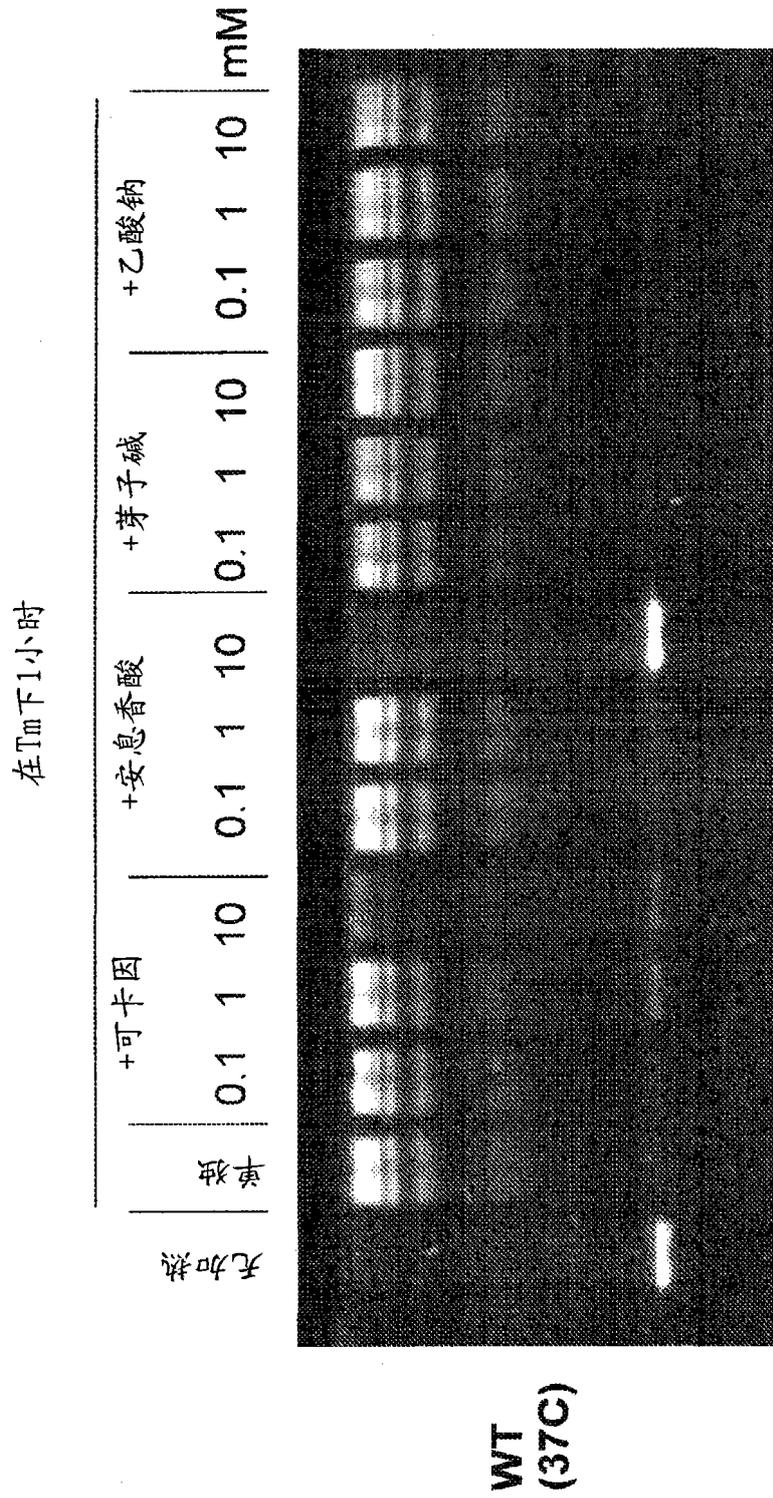


图 4

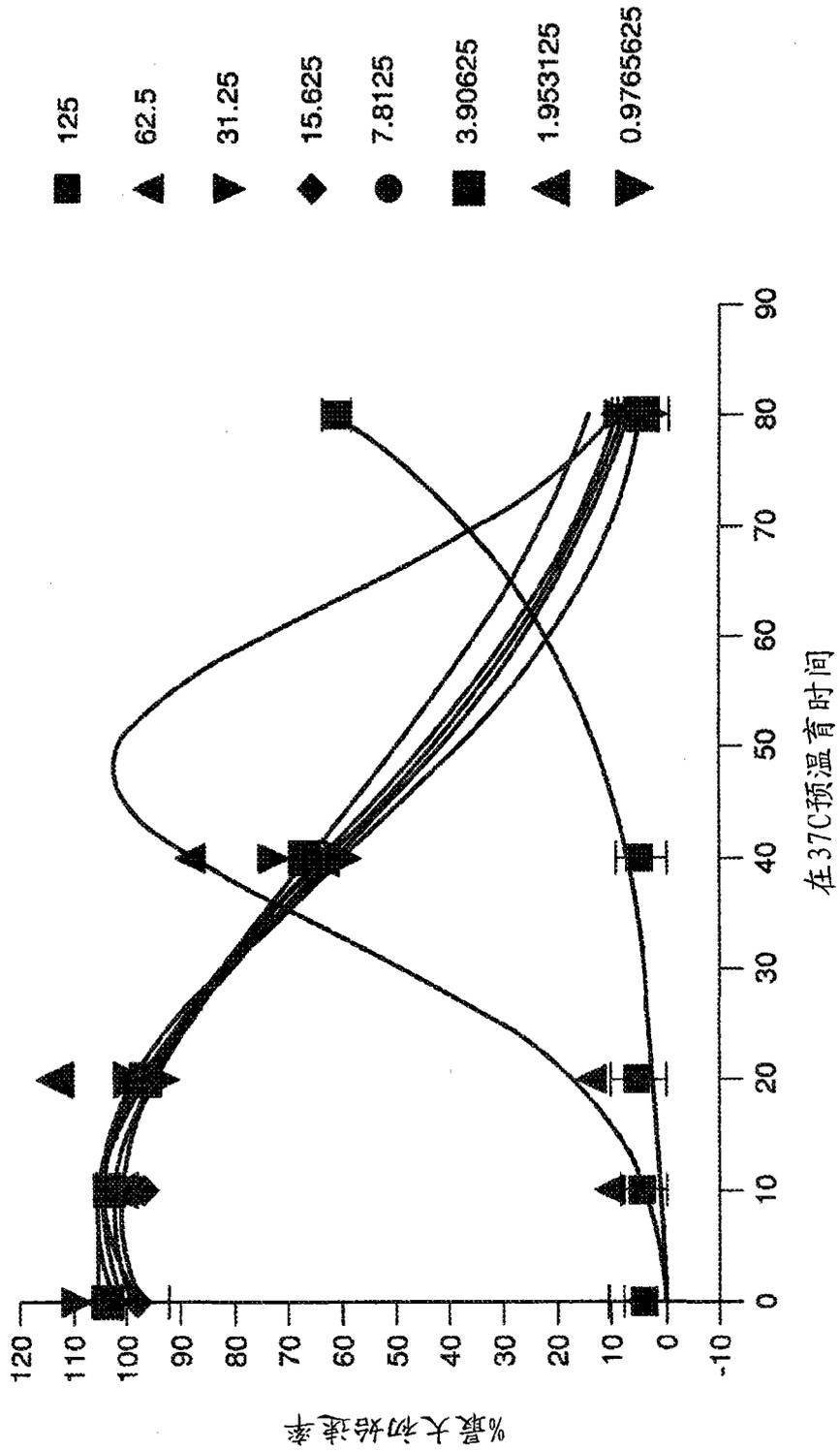


图 5

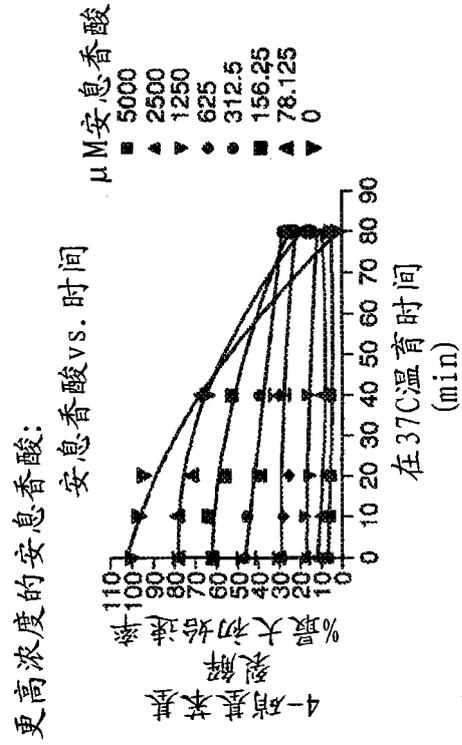
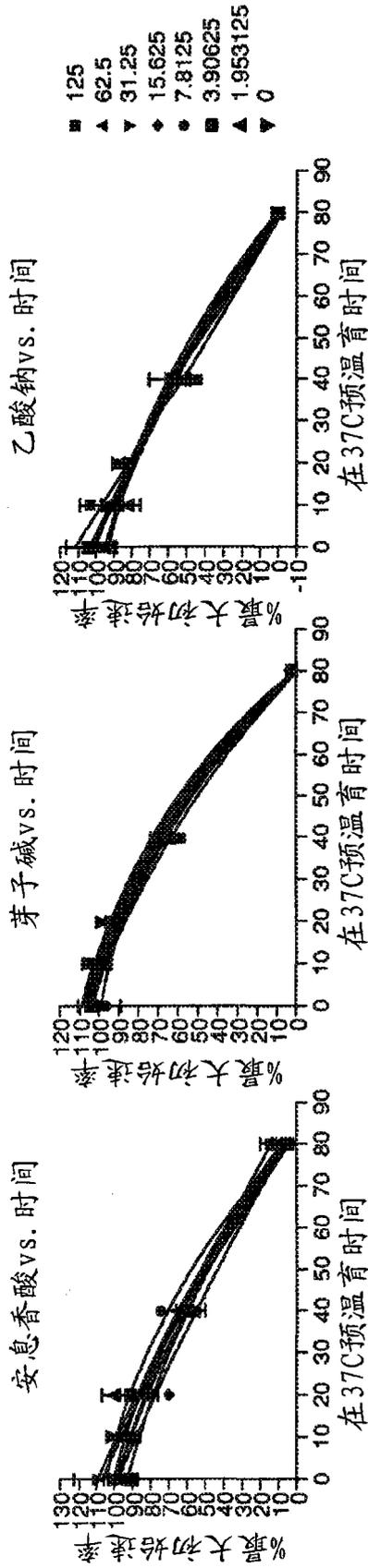


图 6

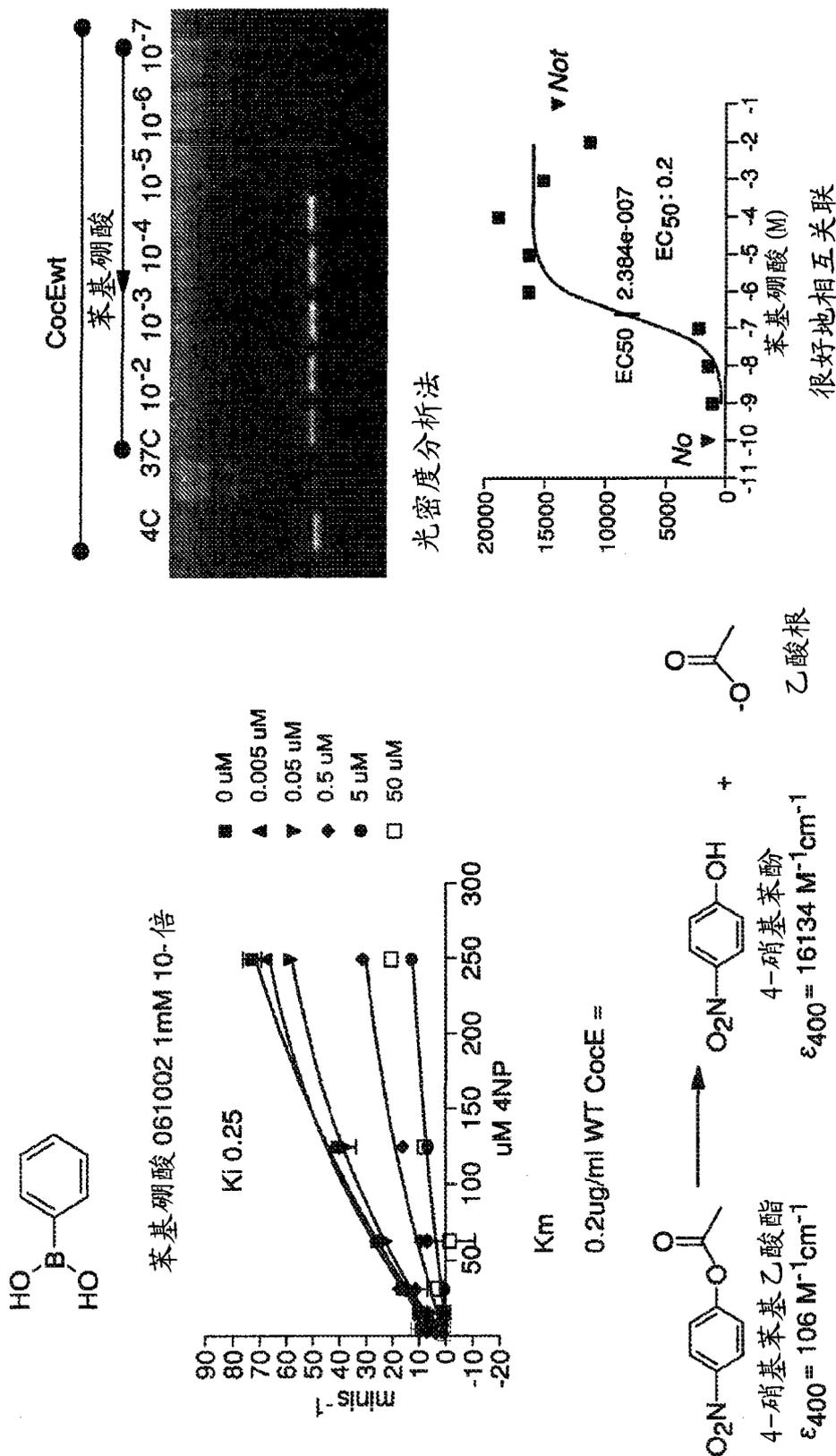


图 7

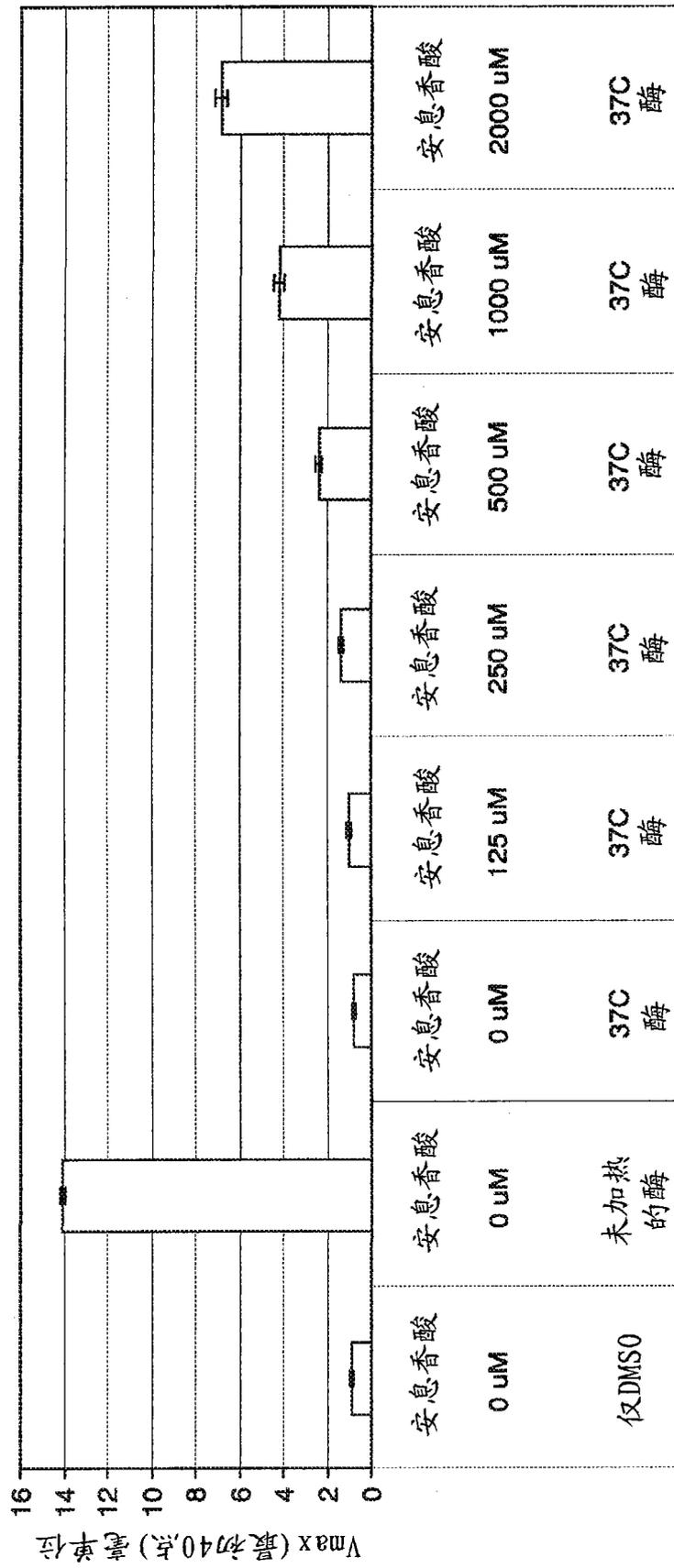


图 8

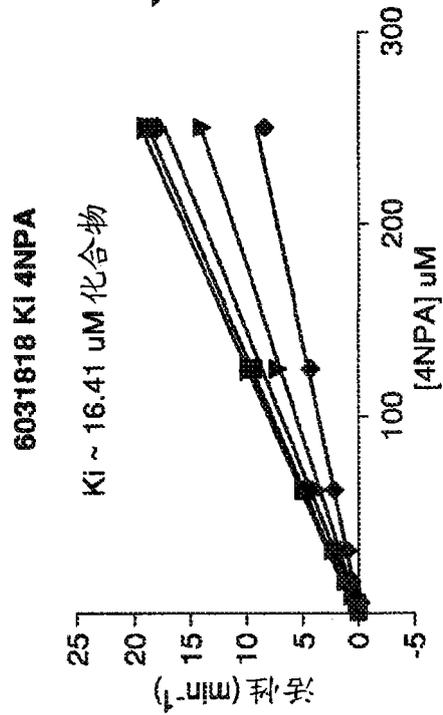
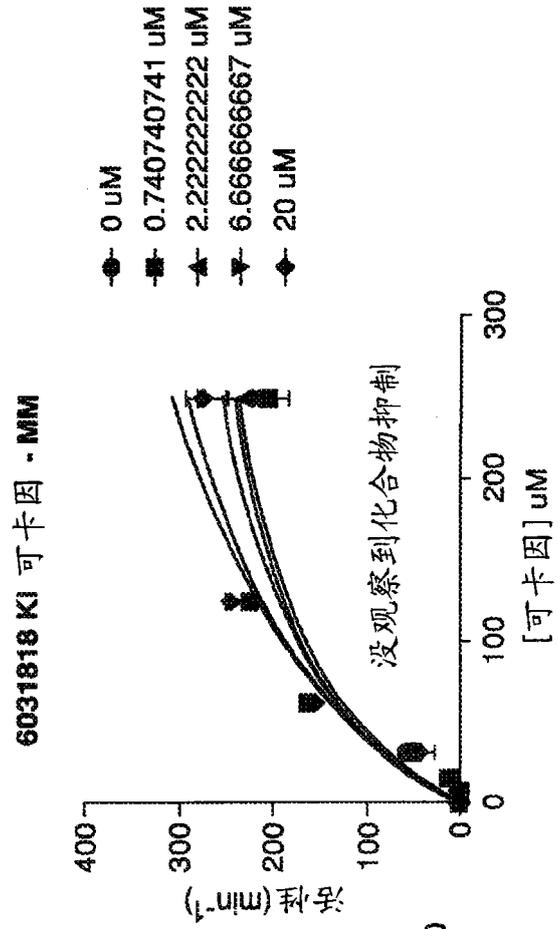
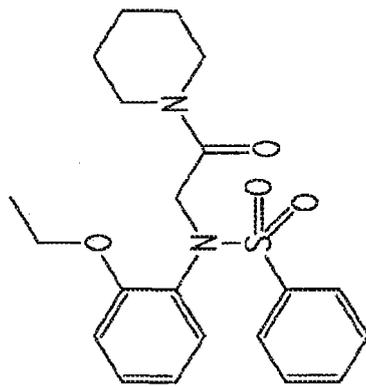


图 10

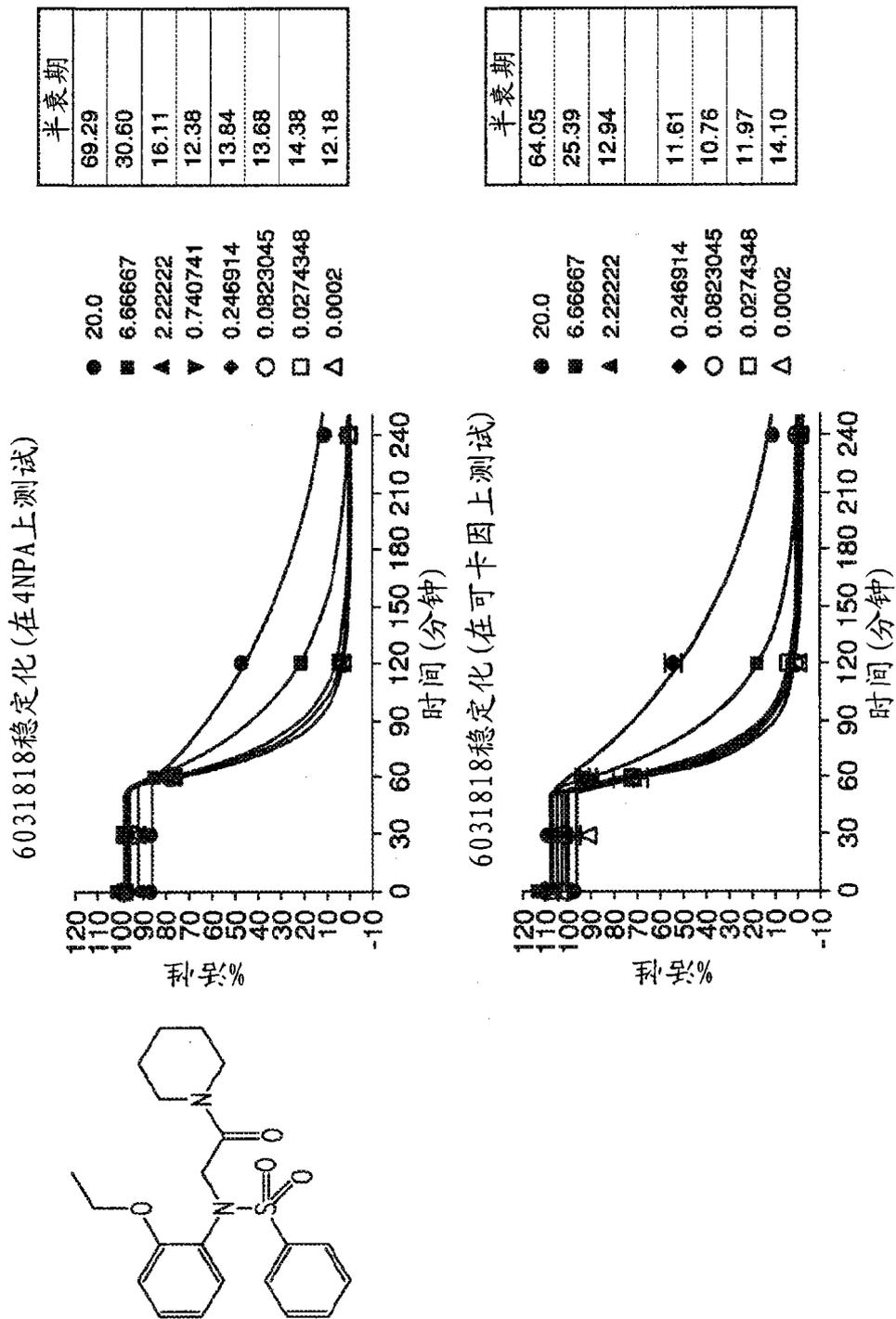
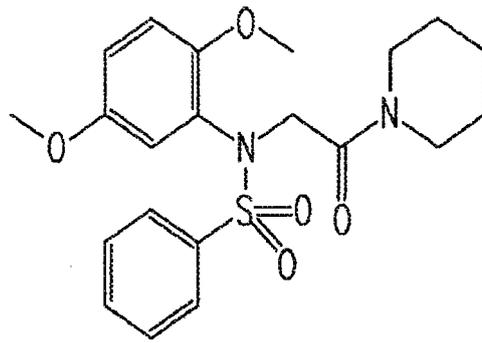
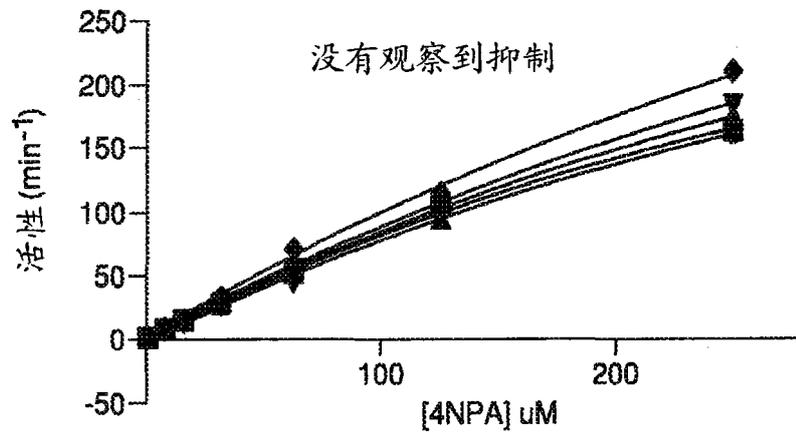


图 11



6169221 Ki 4NPA - MM



6169221 Ki 可卡因 - MM

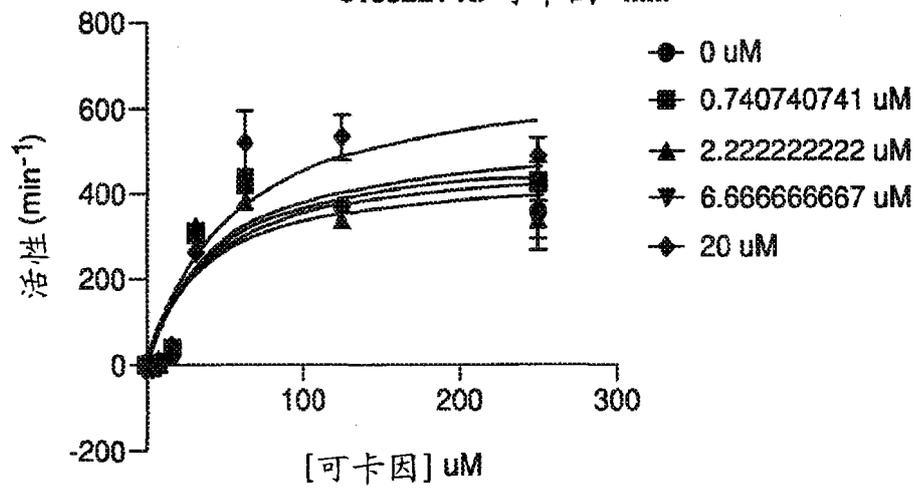
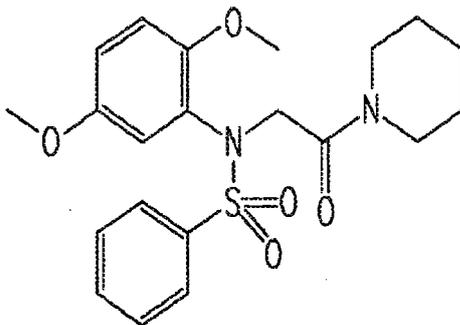
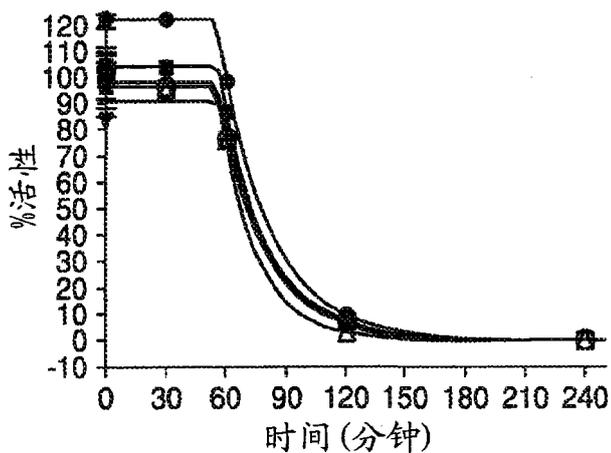


图 12



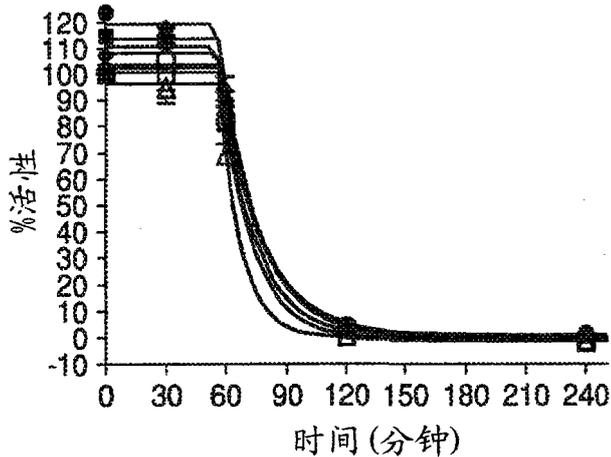
6169221稳定化(在4NPA上测试)



- 20.0
- 6.66667
- ▲ 2.22222
- ▼ 0.740741
- ◆ 0.246914
- 0.0823045
- 0.0274348
- △ 0.0002

半衰期	
●	17.86
■	15.46
▲	17.40
▼	16.53
◆	16.88
○	16.33
□	17.24
△	12.72

6169221稳定化(在可卡因上测试)



- 20.0
- 6.66667
- ▲ 2.22222
- ▼ 0.740741
- ◆ 0.246914
- 0.0823045
- 0.0274348
- △ 0.0002

半衰期	
●	13.33
■	10.21
▲	14.20
▼	11.69
◆	12.25
○	10.76
□	12.45
△	7.495

图 13

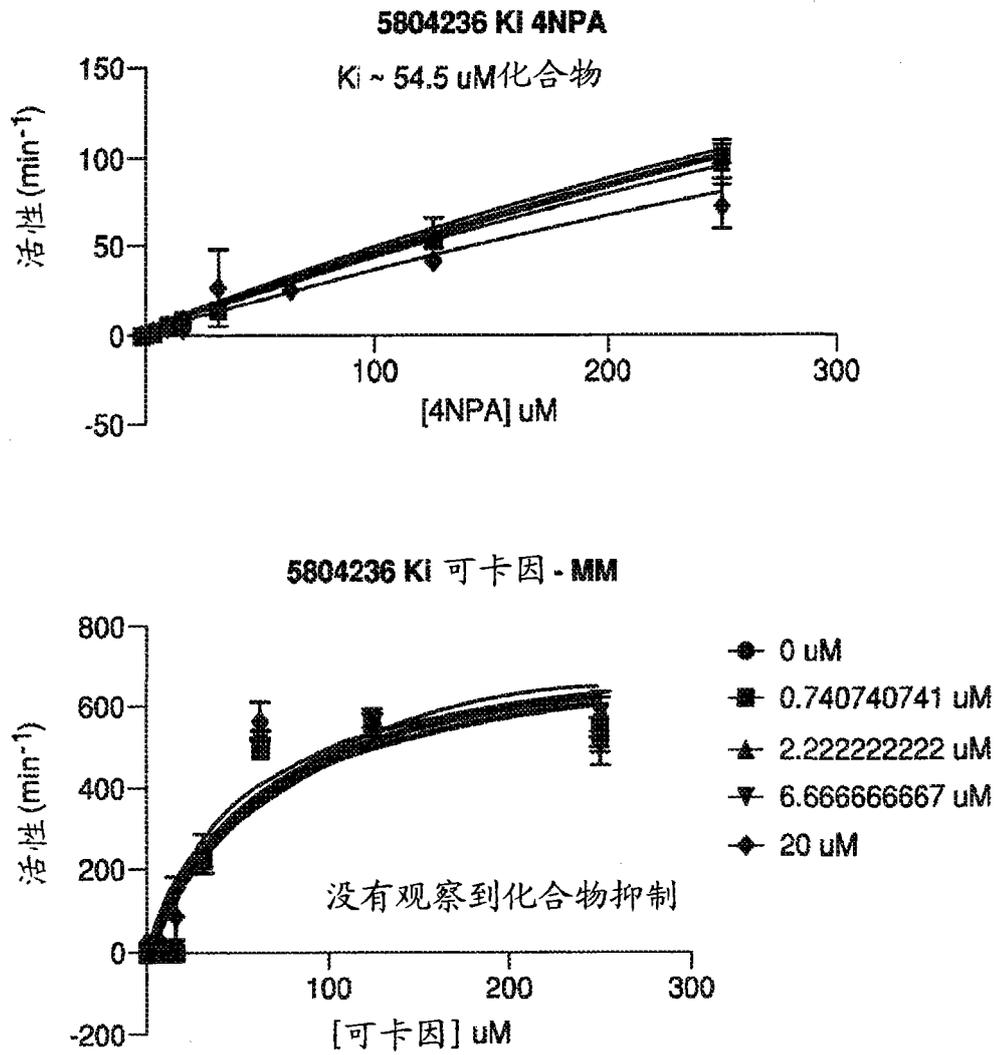
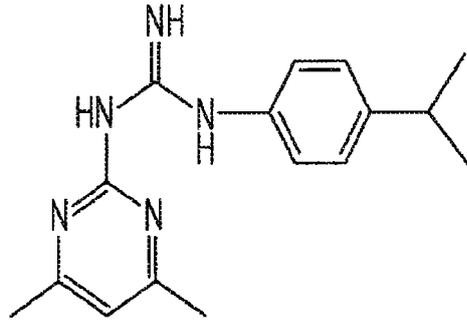
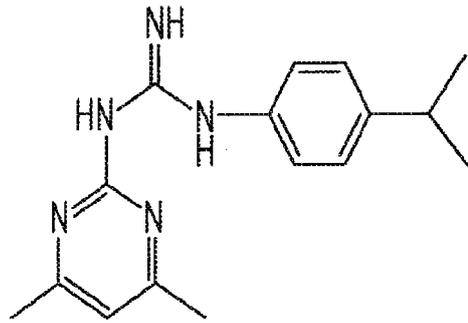
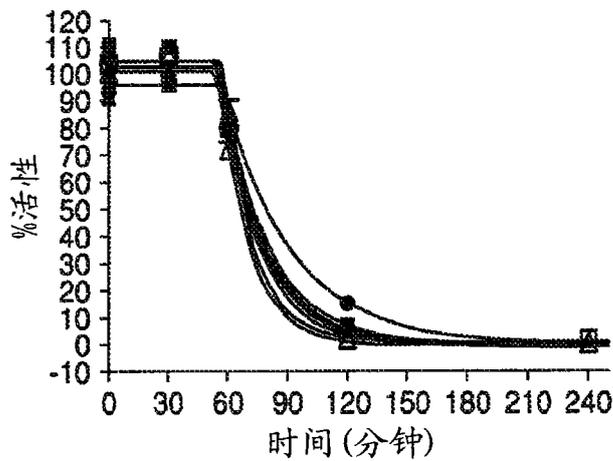


图 14



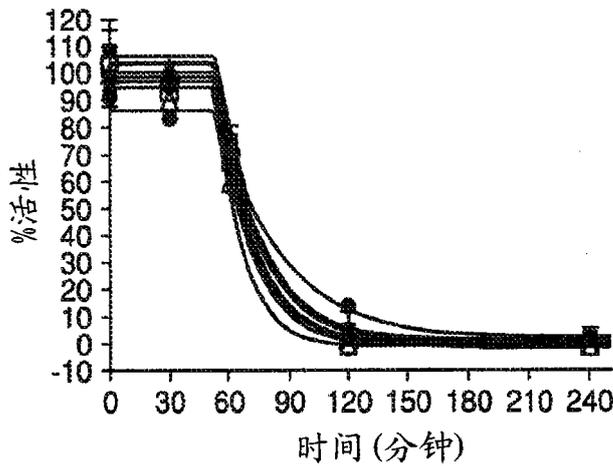
5804236稳定化(4NPA测试)



- 20.0
- 6.66667
- ▲ 2.22222
- ▼ 0.740741
- ◆ 0.246914
- 0.0823045
- 0.0274348
- △ 0.0002

半衰期
24.10
17.05
15.02
14.50
12.84
14.42
10.48
10.61

5804236稳定化(可卡因测试)



- 20.0
- 6.66667
- ▲ 2.22222
- ▼ 0.740741
- ◆ 0.246914
- 0.0823045
- 0.0274348
- △ 0.0002

半衰期
21.94
15.25
14.66
14.52
12.74
12.86
11.45
9.080

图 15

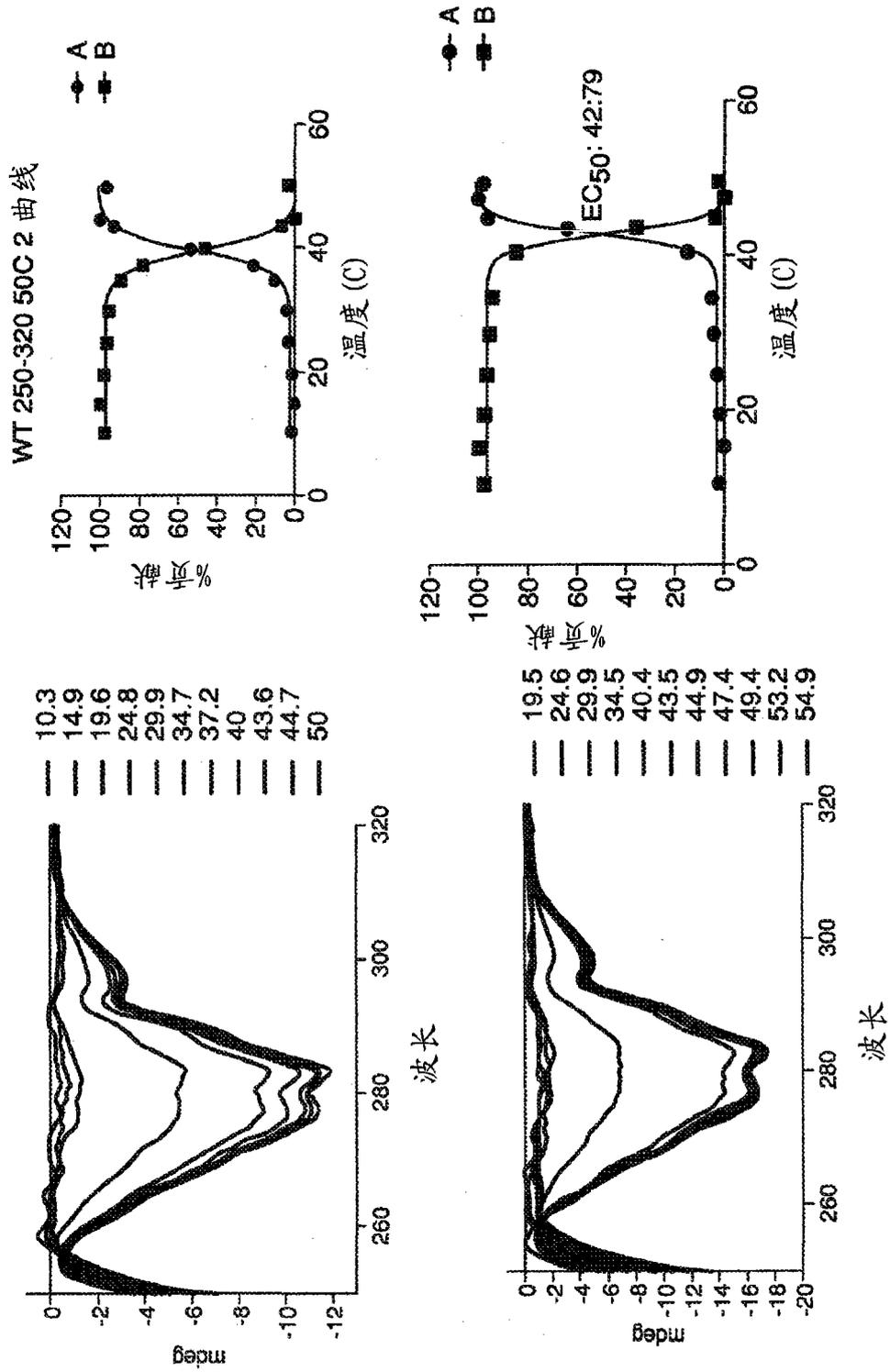


图 16

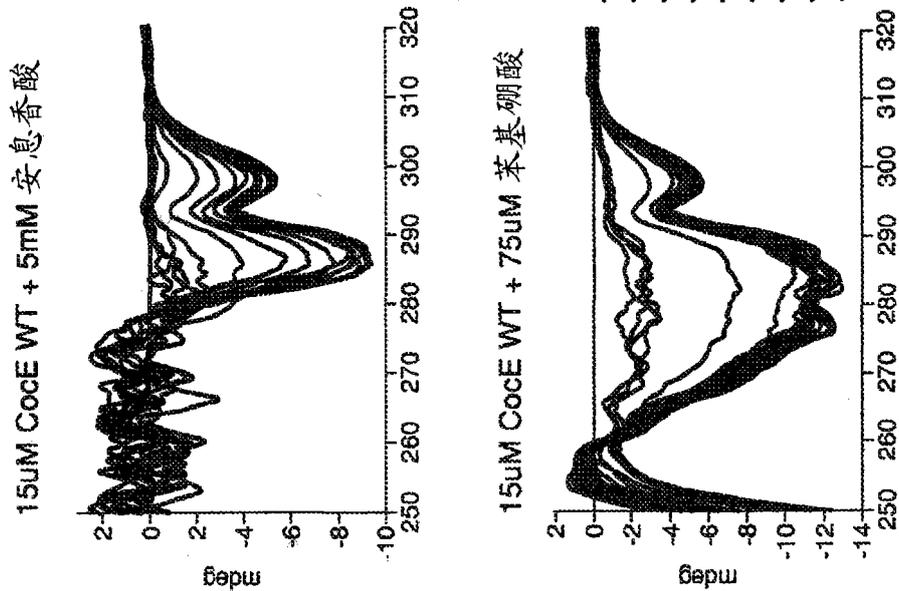


图 17

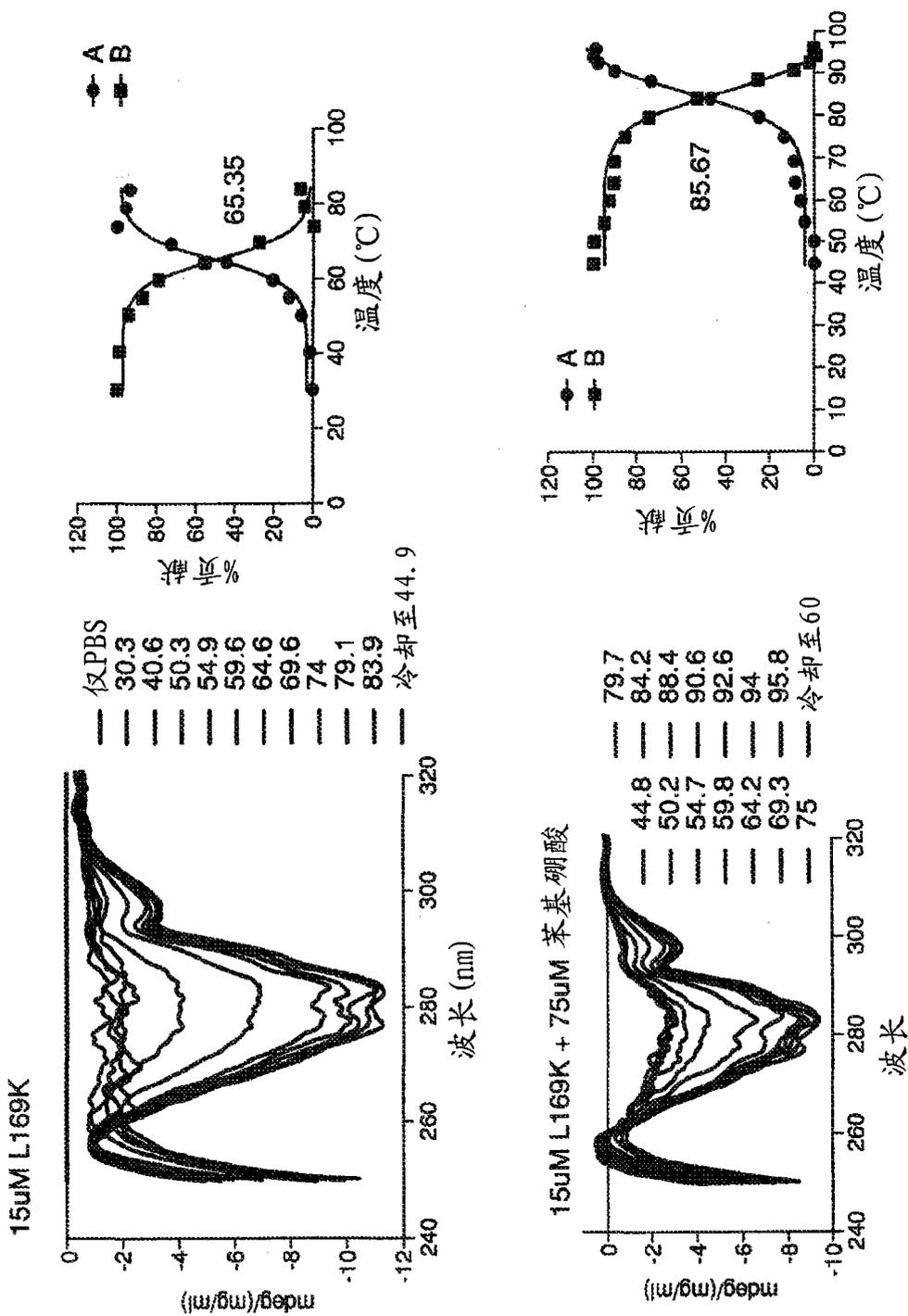


图 18

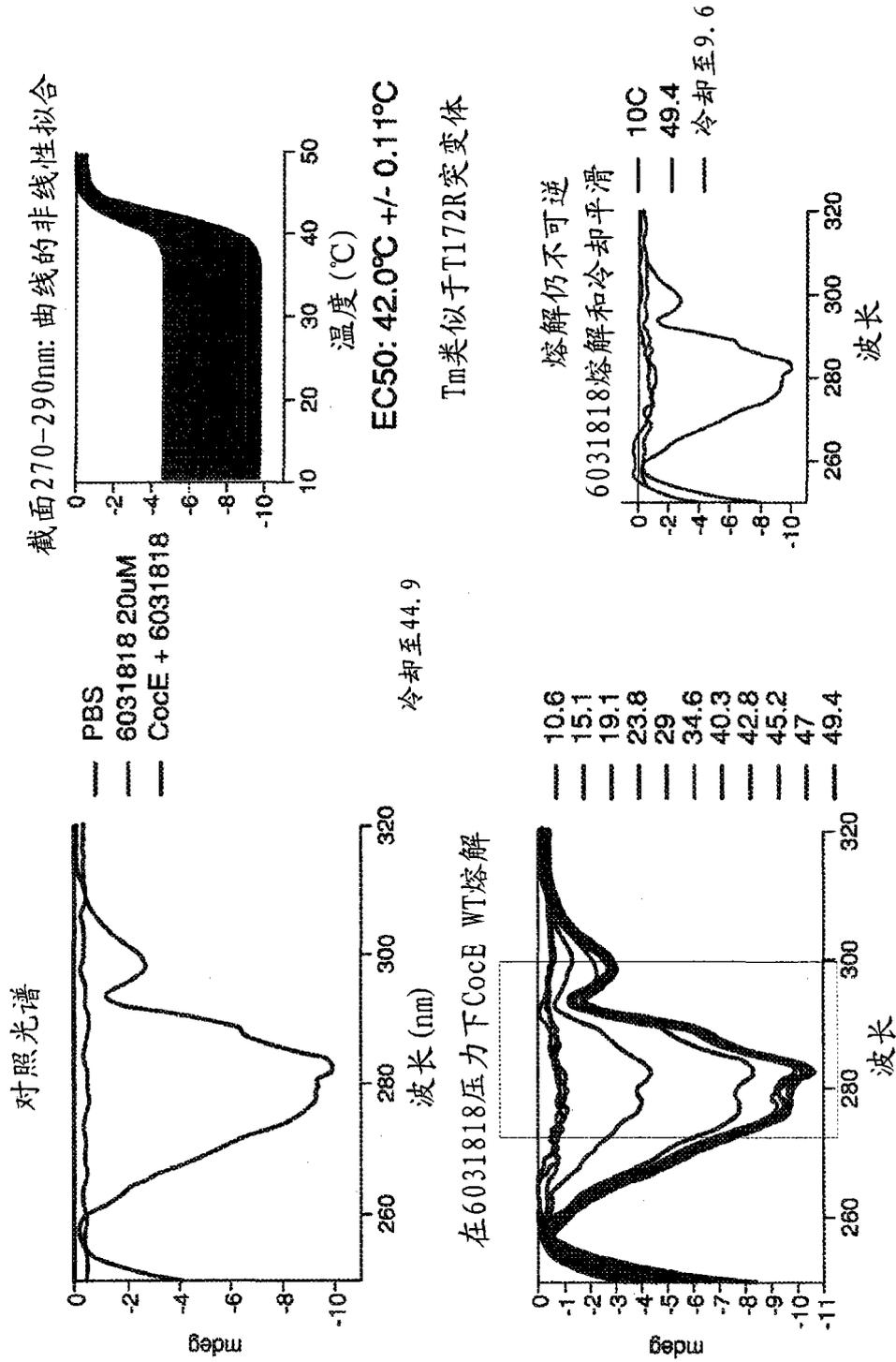


图 19

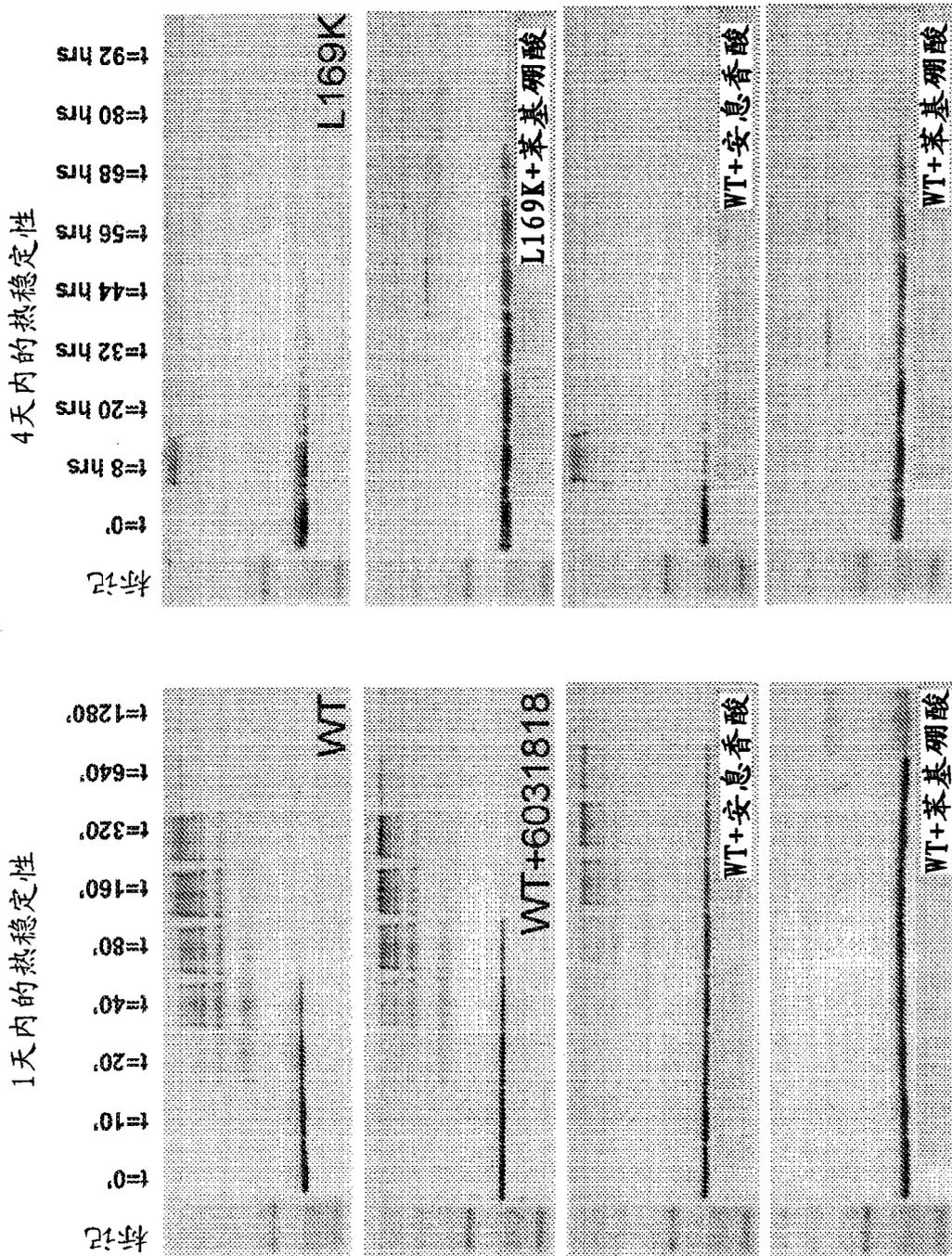


图 20

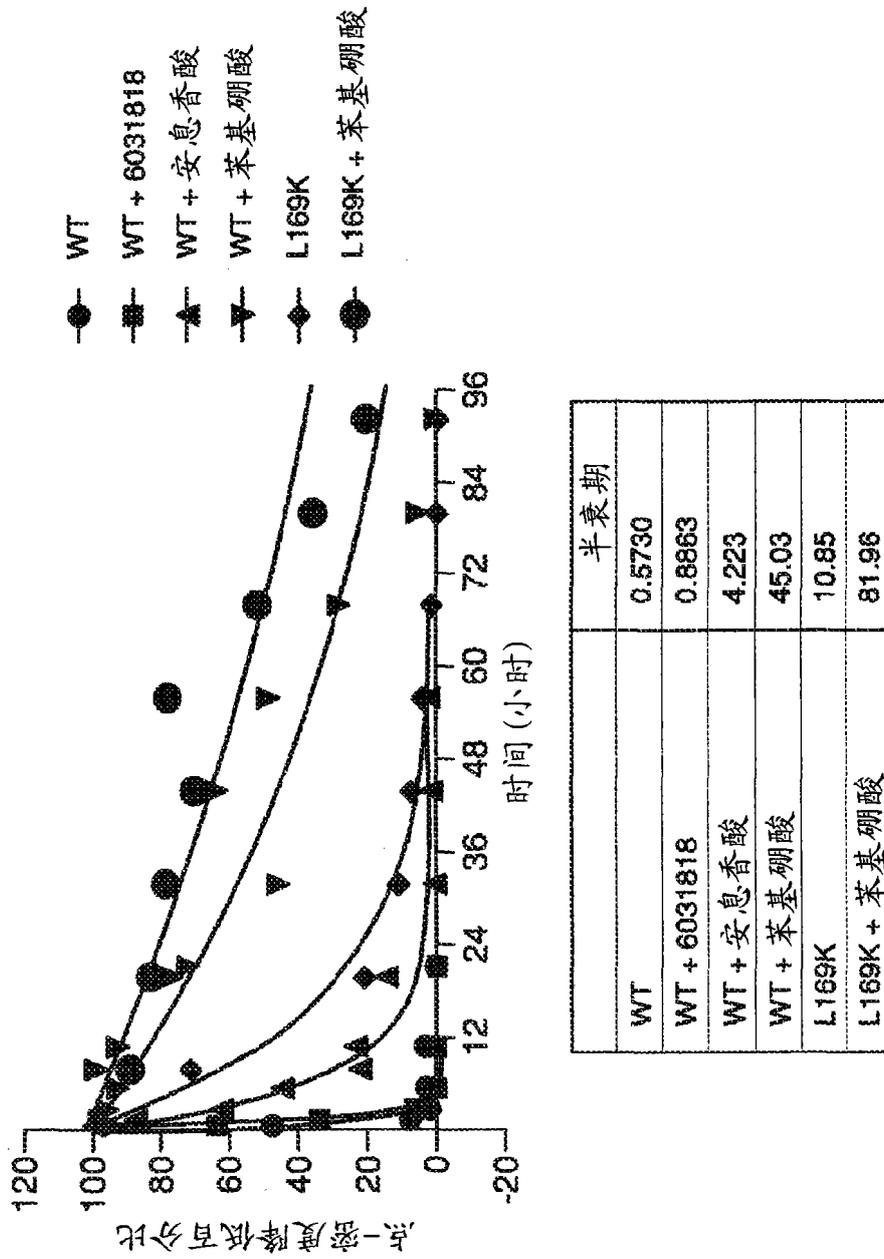


图 21

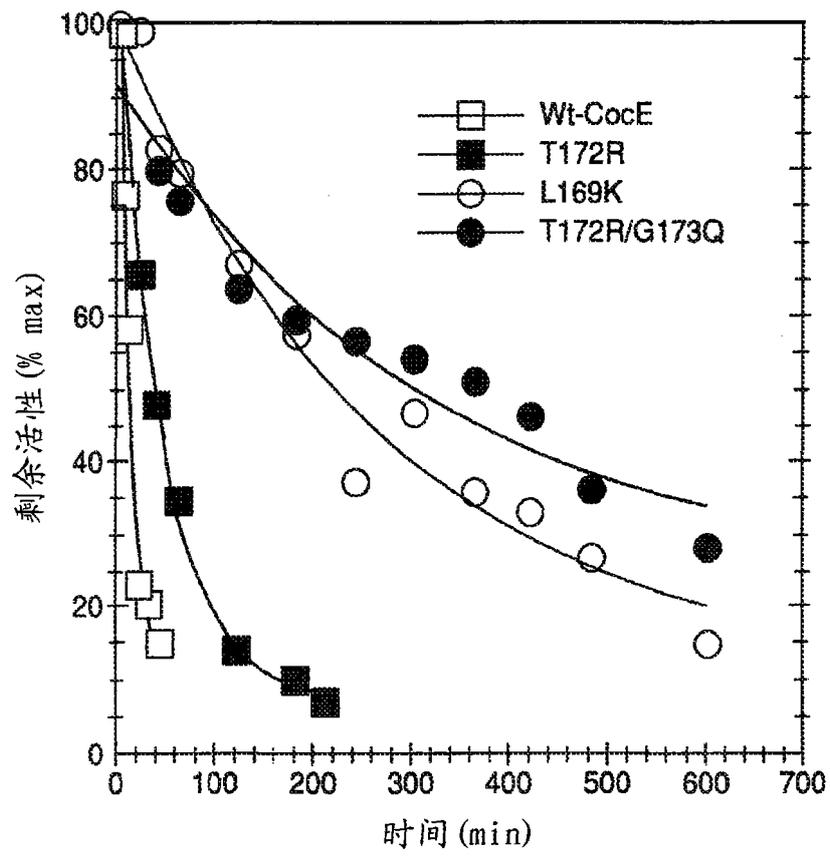


图 23

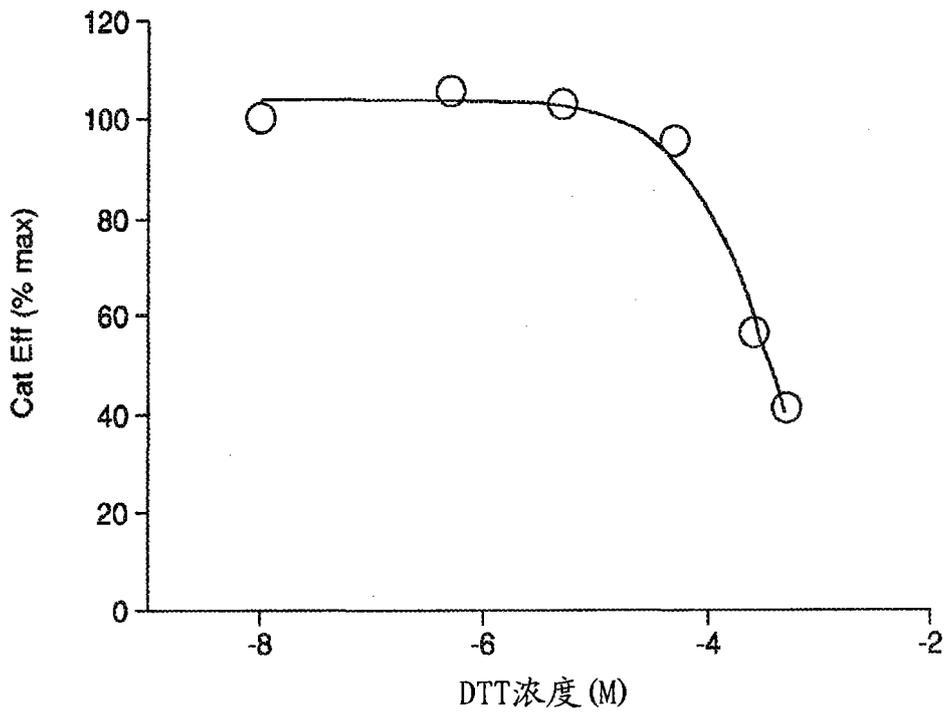


图 24

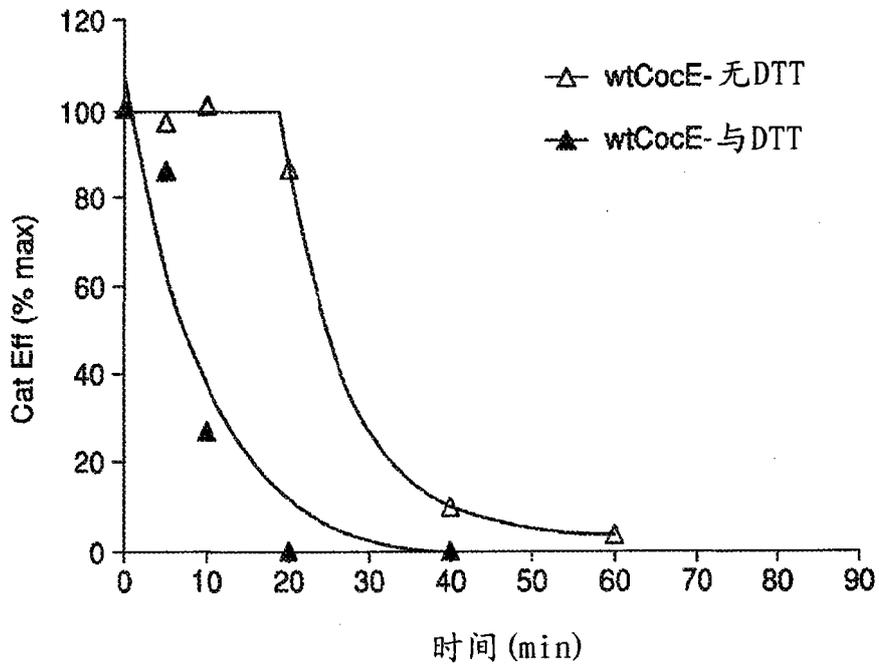


图 25

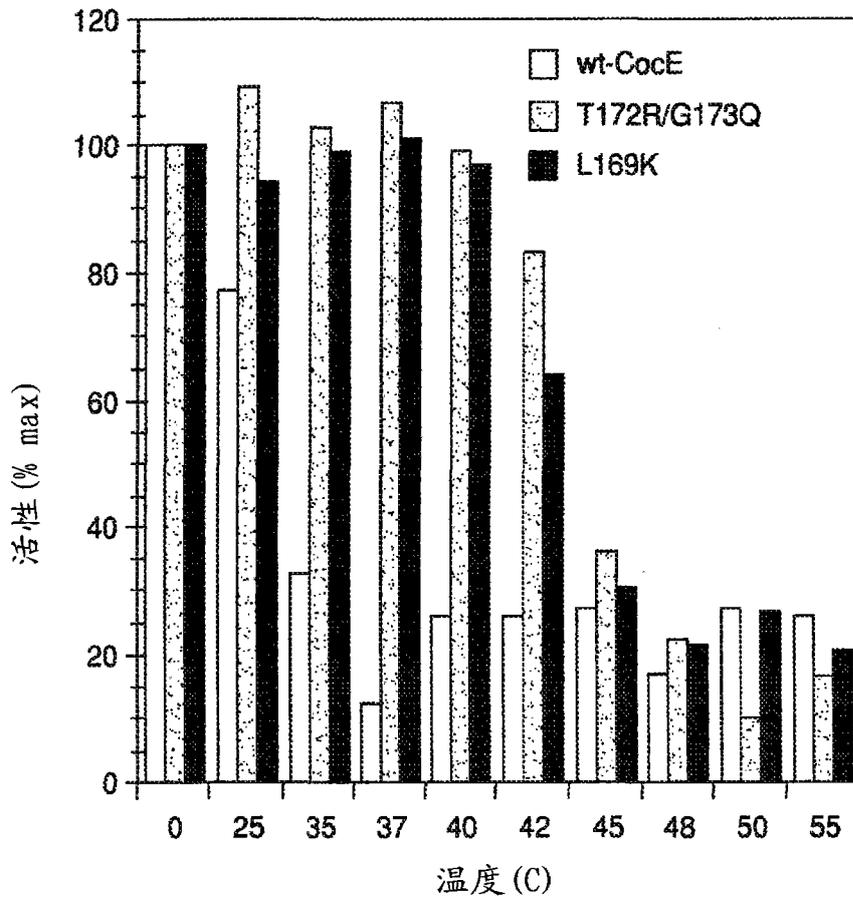


图 26

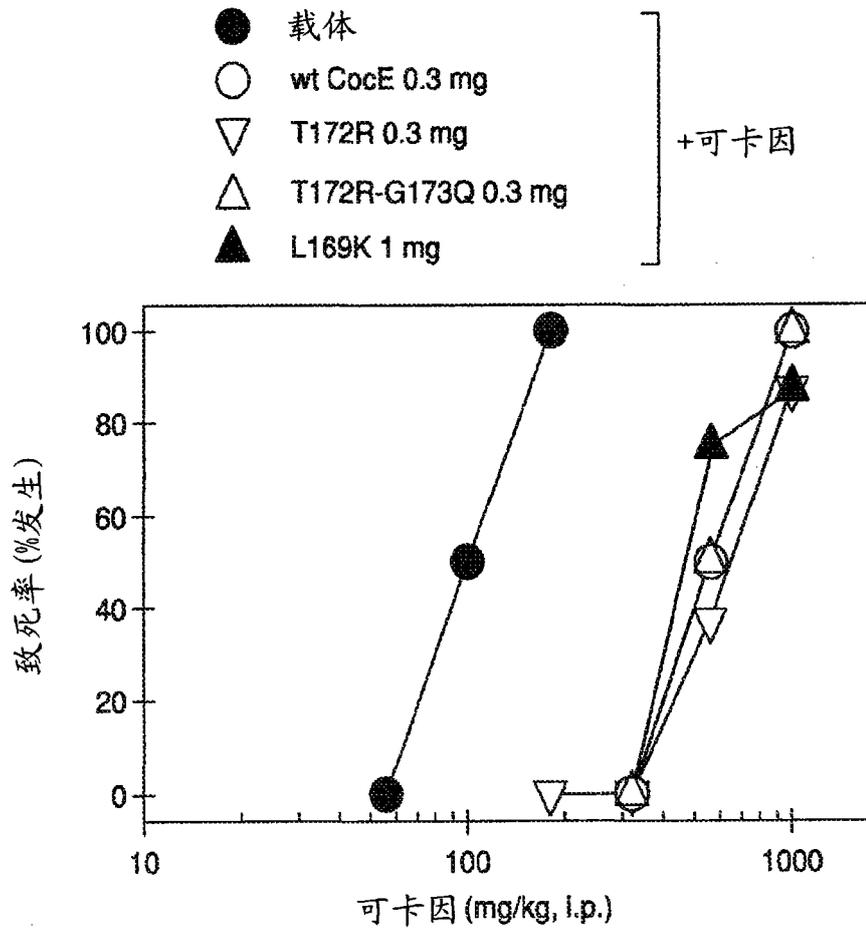


图 27

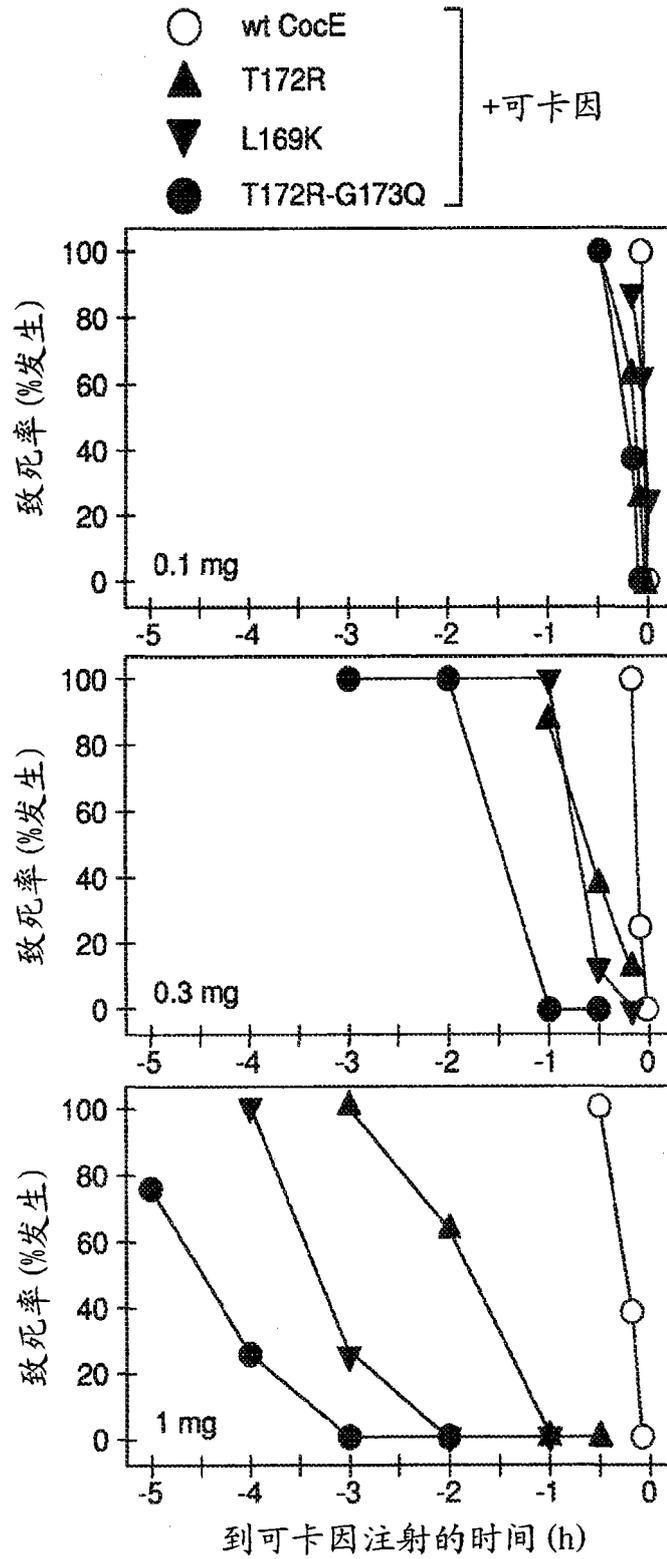


图 28

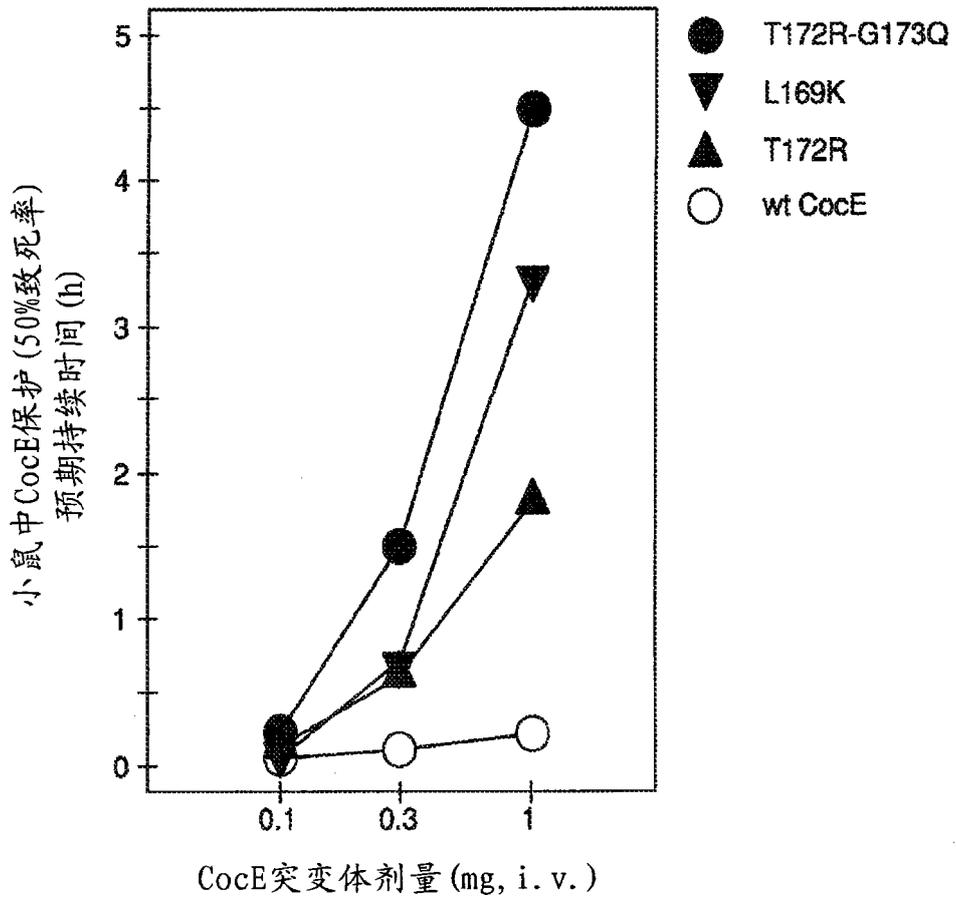


图 29

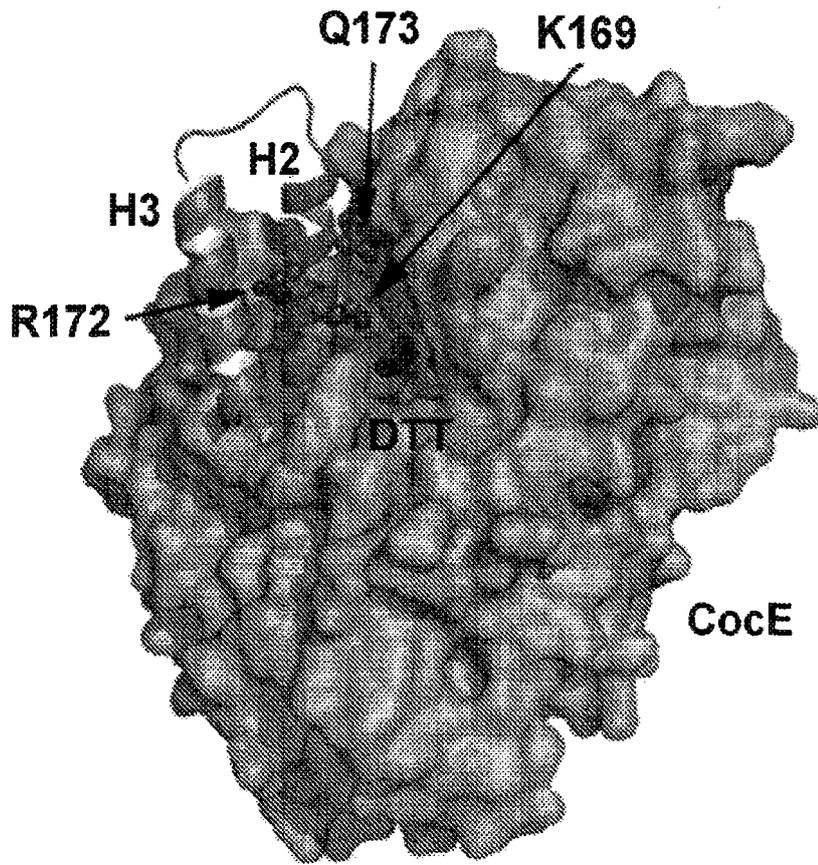


图 30

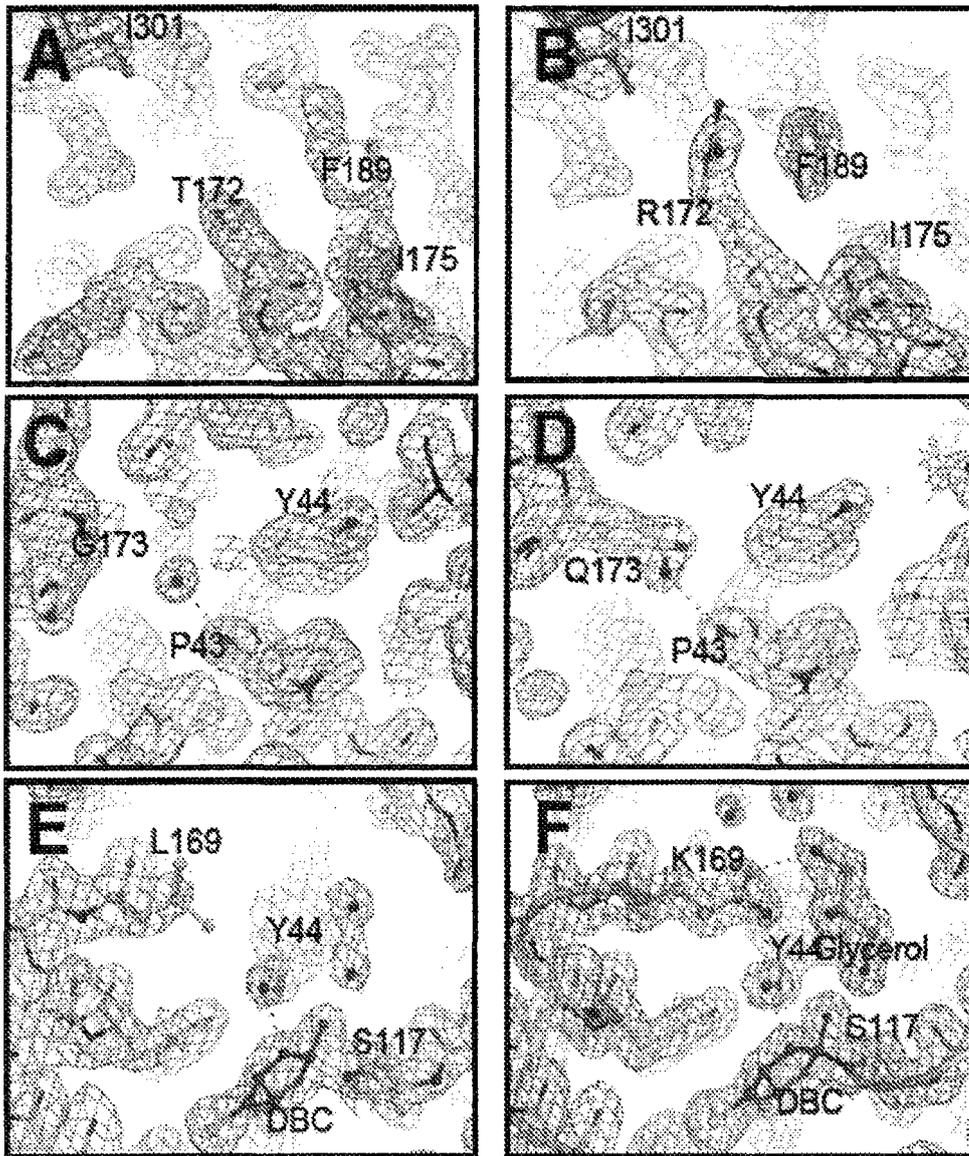


图 31

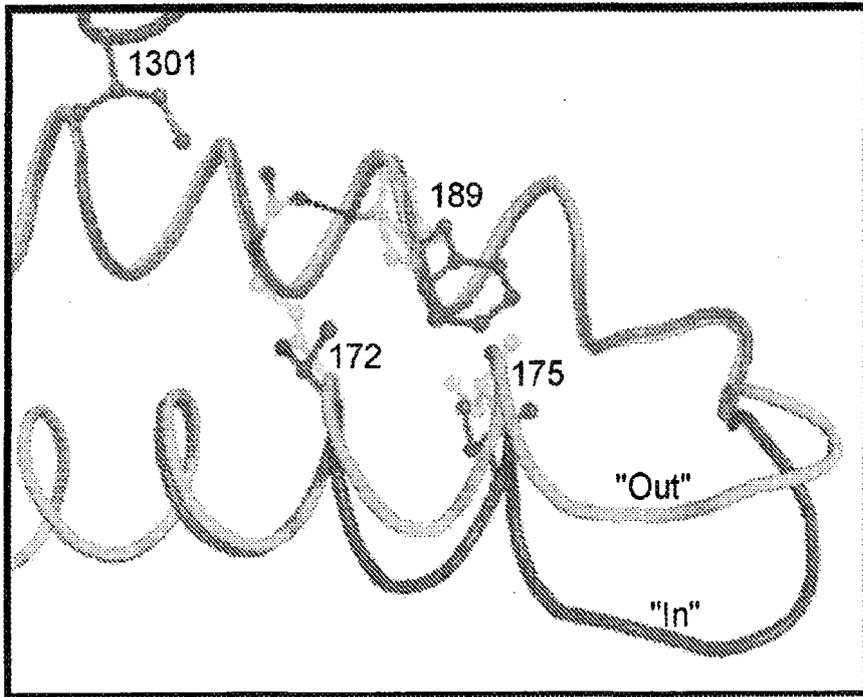


图 32

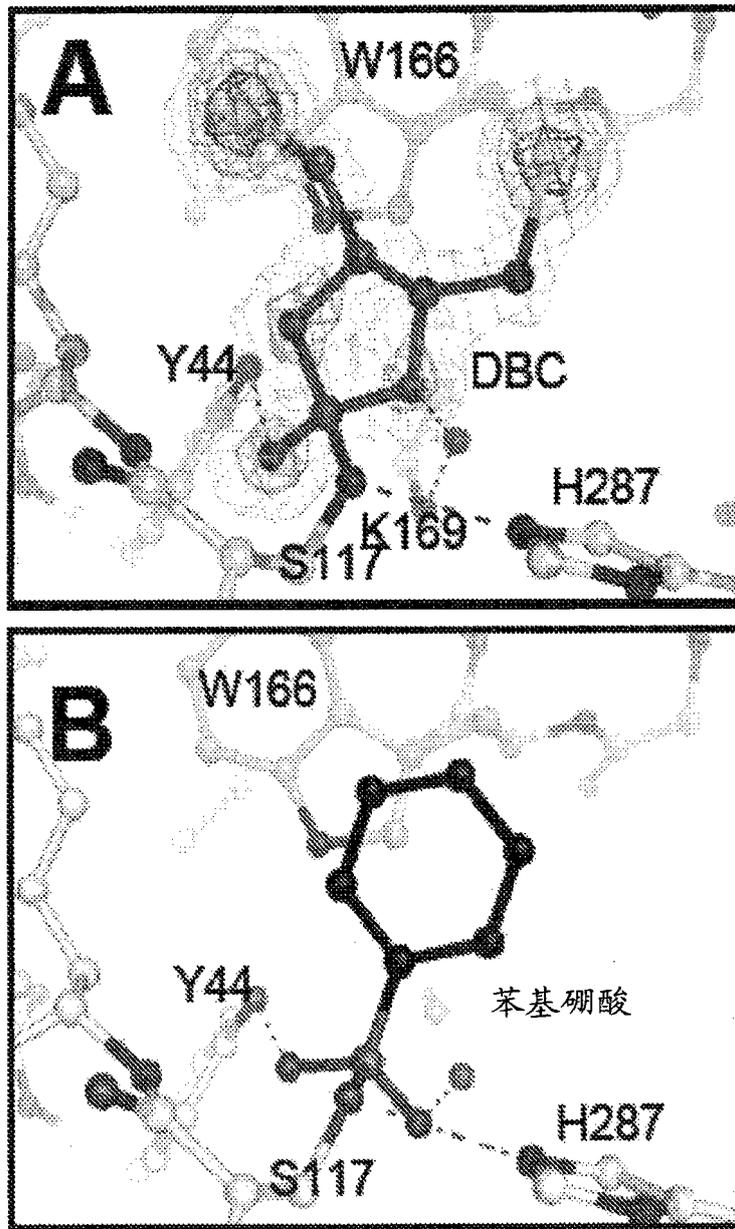
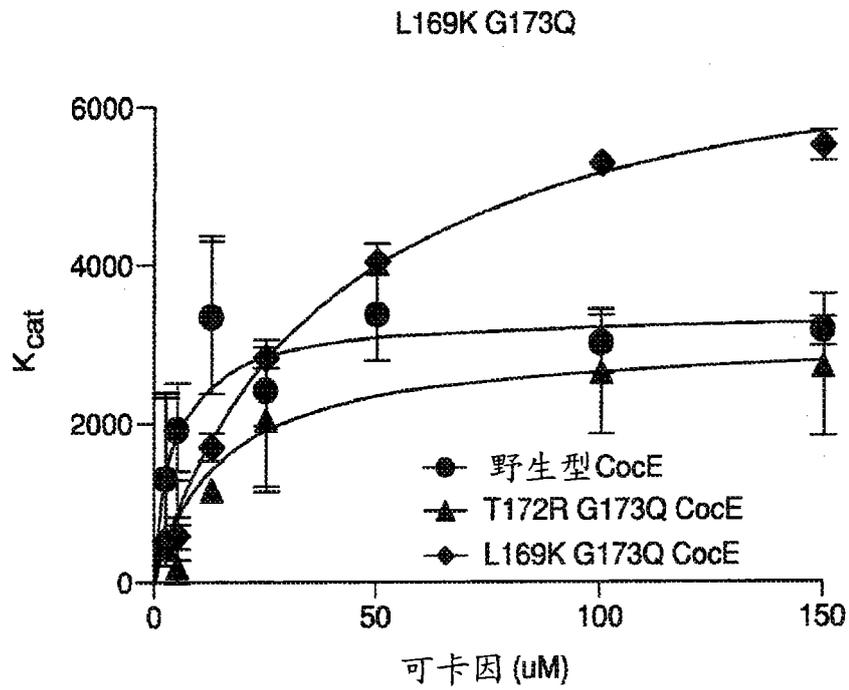


图 33



可卡因 酯酶	K_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	催化效率 $K_{cat}(\text{min}^{-1})/K_m(\text{M})$
野生型	3337	4	8.3×10^8
T172R G173Q	3082	14	2.2×10^8
T169K G173Q	7245	40	1.8×10^8

图 34

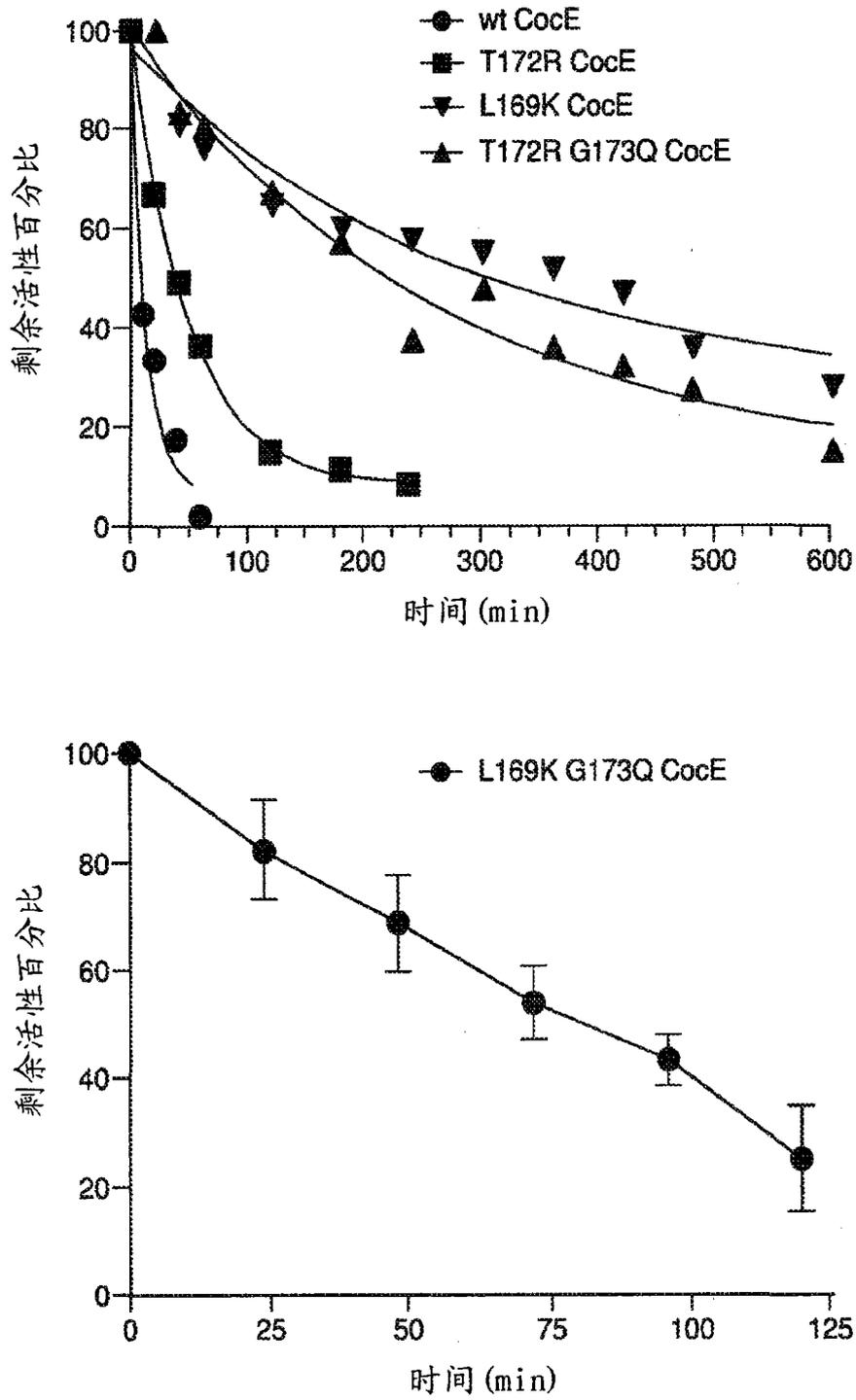


图 35

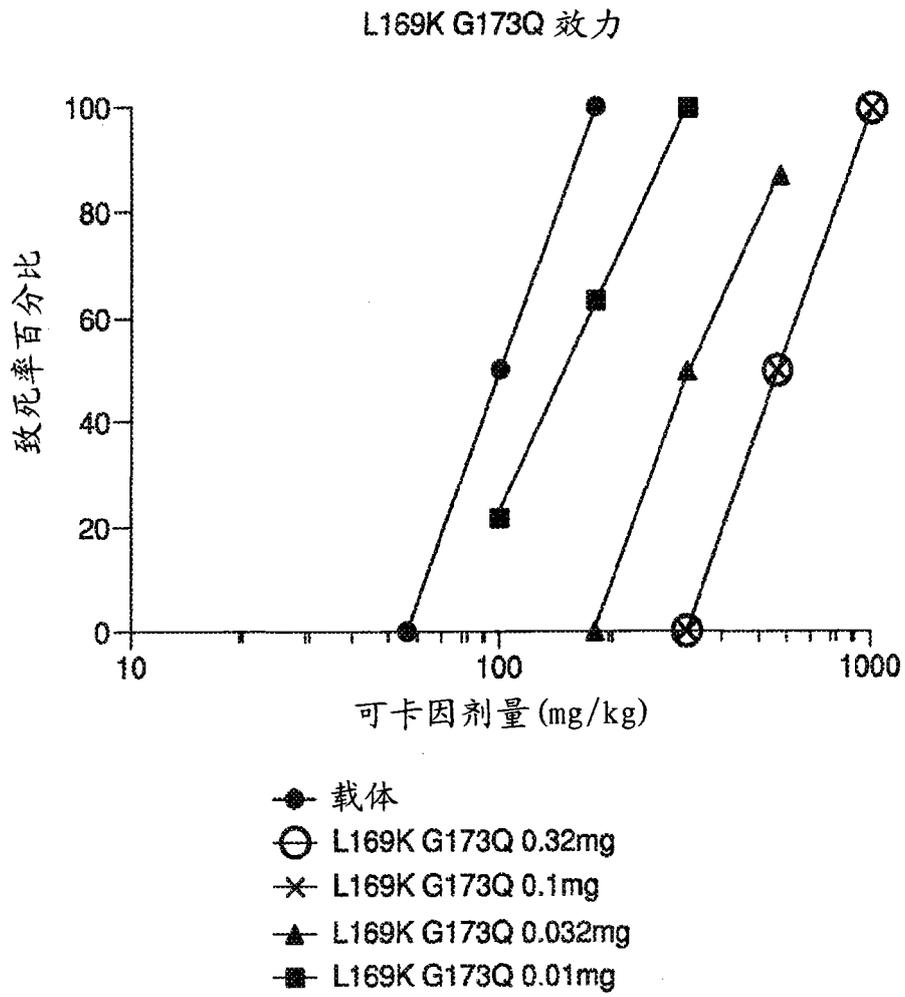


图 36

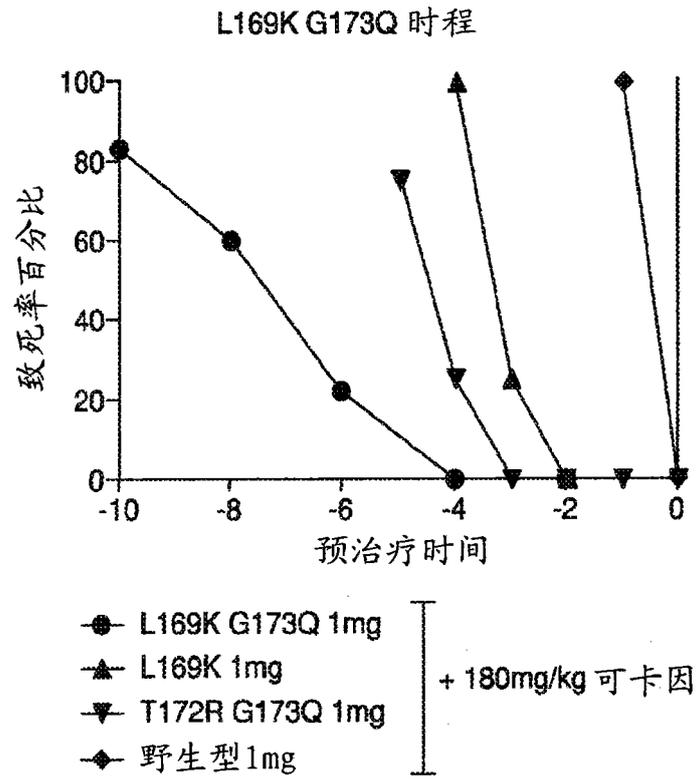


图 37A

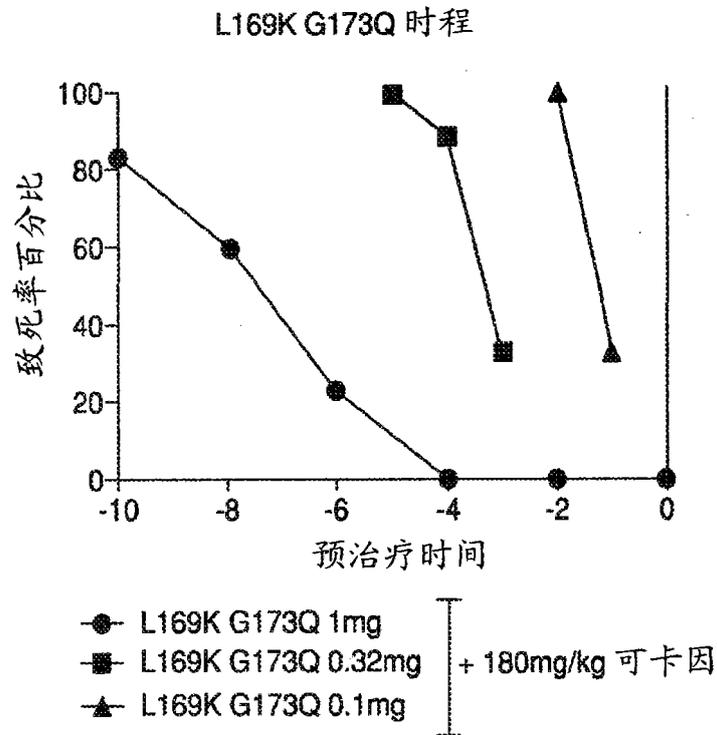


图 37B