



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105051022 B

(45)授权公告日 2017.10.27

(21)申请号 201480018083.5

M·J·卡尔米洛维兹

(22)申请日 2014.03.25

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 105051022 A

代理人 李程达

(43)申请公布日 2015.11.11

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C07D 307/60(2006.01)

61/805,786 2013.03.27 US

C07B 53/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07C 229/04(2006.01)

2015.09.25

C07C 59/74(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/IB2014/060140 2014.03.25

CN 1649827 A, 2005.08.03,

(87)PCT国际申请的公布数据

WO 2008/127646 A2, 2008.10.23,

W02014/155291 EN 2014.10.02

CN 102341494 A, 2012.02.01,

(73)专利权人 辉瑞爱尔兰制药公司

CN 102341494 A, 2012.02.01,

地址 爱尔兰科克郡

审查员 李磊

(72)发明人 S·德巴尔热 D·T·厄德曼

权利要求书1页 说明书77页

P·M·奥尼尔 R·库玛

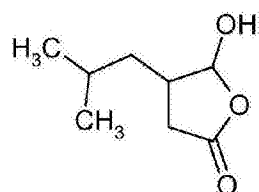
序列表20页

(54)发明名称

用于制备普瑞巴林的方法和中间体

(57)摘要

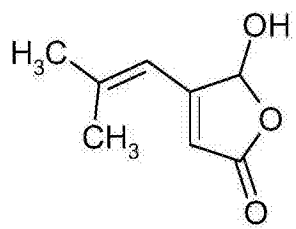
本发明提供了式(I^A)的化合物的制备方法。



(I^A) 本发明还提供了

用于将式(I^A)的化合物转化为普瑞巴林的改进的方法。

1. 根据式 (VI^A) 的 5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮



(VI^A)

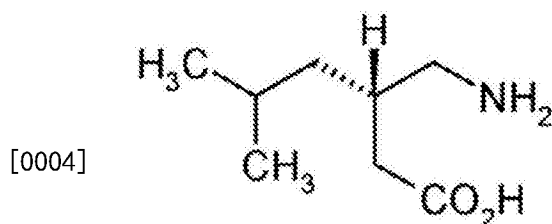
用于制备普瑞巴林的方法和中间体

发明领域

[0001] 本发明涉及用于制备 (S)-(+)-3-氨基-5-甲基己酸(普瑞巴林)的5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮及其衍生物的制备。本发明还涉及用于将5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮转化为普瑞巴林的改进方法。普瑞巴林是表现出与人 $\alpha_2\delta$ 钙通道亚基的结合亲和力的 γ -氨基酸。

[0002] 发明背景

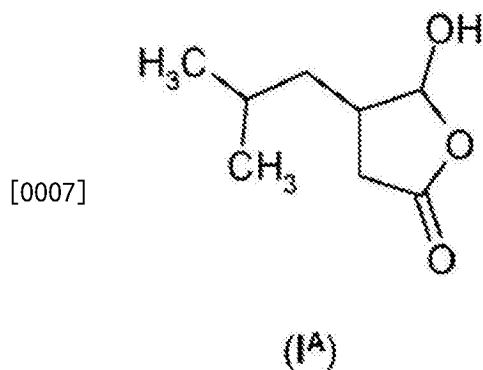
[0003] 普瑞巴林,或(S)-(+)-3-氨基-5-甲基-己酸((S)-II),



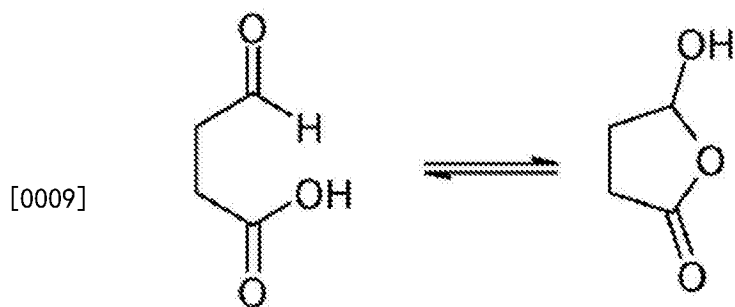
普瑞巴林((S)-II)

[0005] 是 **Lyrica®** 中的活性主体,其被批准用于癫痫、神经性疼痛、纤维肌痛和广泛性焦虑障碍的治疗。它表现出抗发作活性(如在美国专利US 5,563,175中所讨论的)和抗感受伤害活性(如在美国专利US 6,001,876中所讨论的)。据假设,普瑞巴林(II)的药理活性由结合到钙通道的 $\alpha_2\delta$ ($\alpha_2\delta$) 亚基引起的。普瑞巴林(II)还被描述为在其它条件下,例如在与精神运动兴奋剂、炎症、胃肠道损伤、酒精中毒、失眠以及各种精神障碍包括焦虑、抑郁、躁狂症和双相型障碍相关的生理条件下具有效用。

[0006] 已公开了许多用于制备普瑞巴林的方法。5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)已被鉴定为是一种有用的前体。



[0008] 将理解,化合物(I^A),与本文所讨论的许多其它化合物一样,可被认为是4-氧代丁酸衍生物的环化异构体。4-氧代丁酸的衍生物可以以开链形式或环状形式存在。

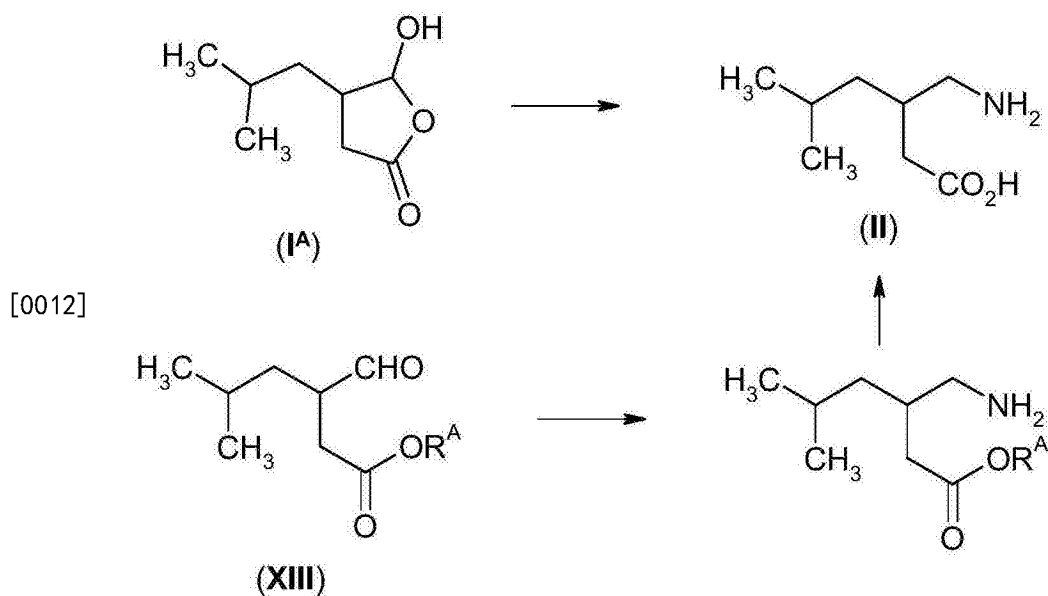


“开链”异构体

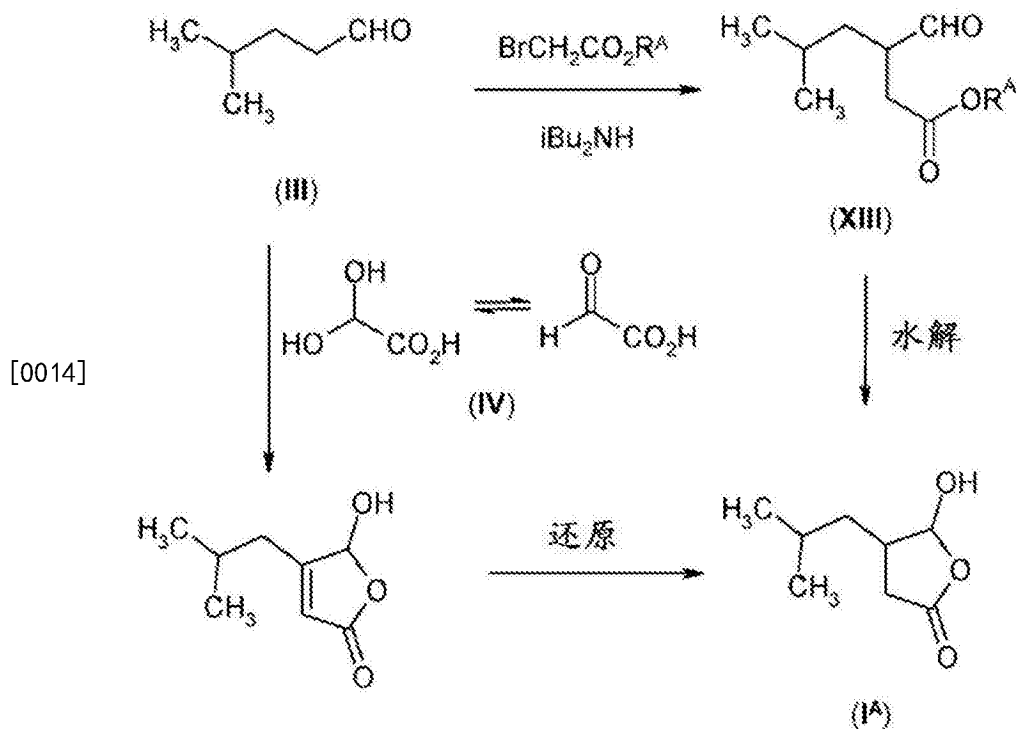
“环状”异构体

[0010] 这两种异构形式可共存于平衡状态,并且这两种形式的相对贡献将取决于种类的确切化学性质。

[0011] 国际专利申请PCT/US2008/004699 (公开为W02008/127646A2) 提出使用化学或酶介导的还原性胺化将5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)或开环异构形式的酯(XIII,其中R^A为烷基)转化为(II)。提示转氨酶的使用将选择性提供优选的((S)-II)对映体。

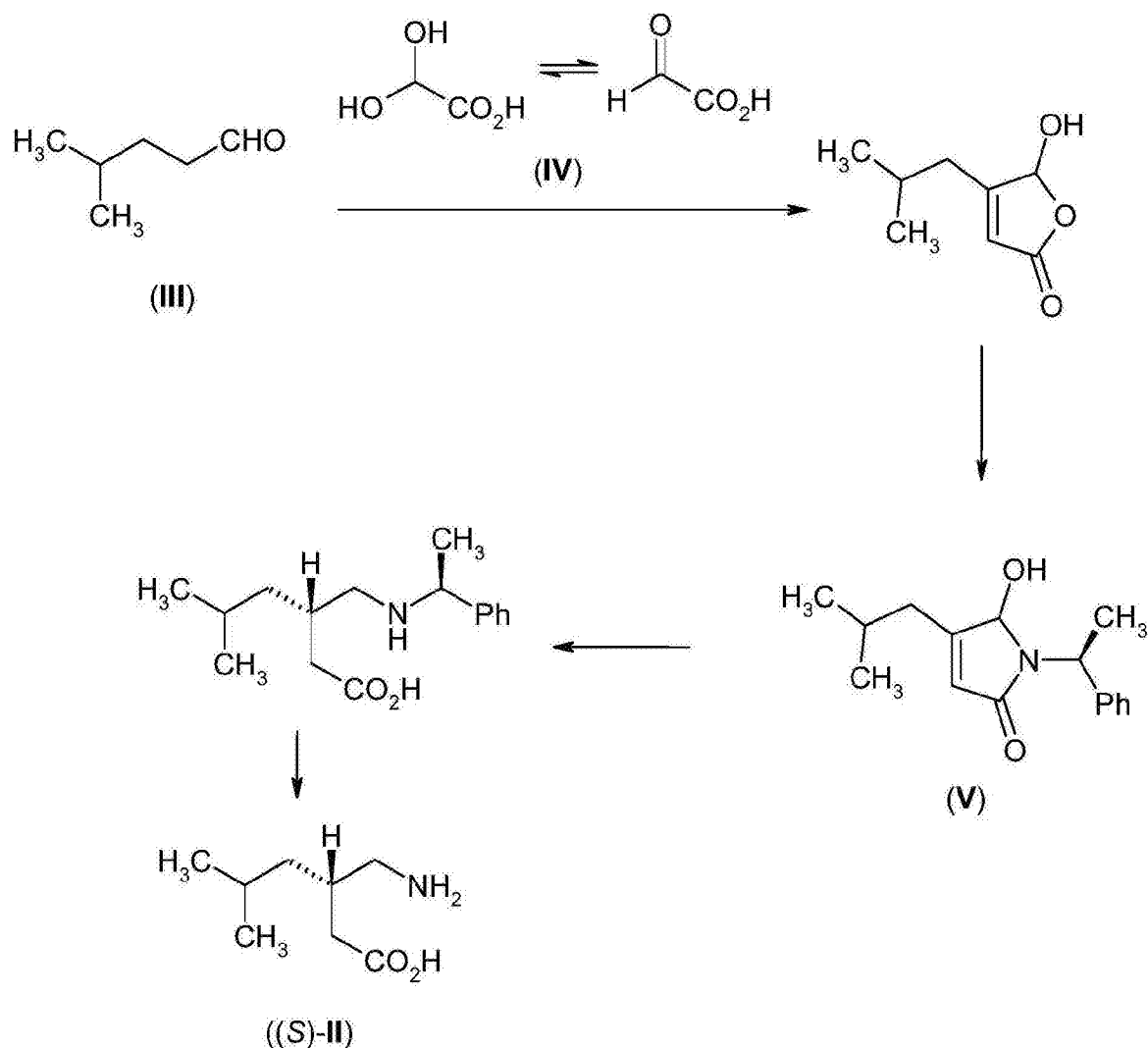


[0013] 酯(XIII)是从4-甲基戊醛(III)通过用适当的卤代乙酸酯在二异丁胺存在下烷化来制备的。前体(I^A)通过酯(XIII)的酯水解或通过4-甲基戊醛(III)与乙醛酸(IV)的缩合和随后双键的还原来制成。酶介导的还原的使用也被提示为引入所需的立体化学的一种方式。



[0015] 国际专利申请PCT/IN2010/000140 (公开为W02011/086565) 公开了相关的方法。4-甲基戊醛(III)和乙醛酸(IV)的缩合产物与手性胺例如 α -甲基苄胺反应以产生吡咯酮(V)。氢化作用产生一定程度的立体选择性,并且脱保护产生手性形式的普瑞巴林(II)。

[0016]

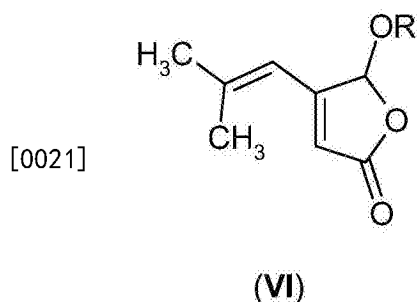


[0017] 仍然在寻找普瑞巴林 (II) 的进一步改进的合成法。特别期望的是提供成本有效且安全的方法。具体地,重要的是提供这样的普瑞巴林 (II) 合成:其可以在商业规模上进行,其使用容易得到的、便宜并且安全的起始材料和试剂,并且其避免需要困难的分离。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供了用于制备5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮 (I^A) 的改进方法,和可用于这些改进方法的中间体。

[0020] 在第一方面A1,本发明提供了根据式 (VI) 的化合物



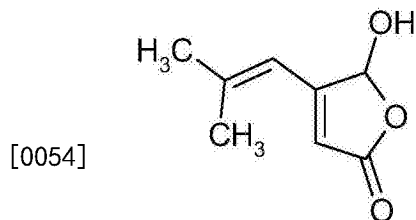
[0022] 在第一实施方式A1E1中,本发明提供了根据式 (VI) 的化合物,其中R选自:

- [0023] 氢,
- [0024] (C₁-C₆) 烷基,
- [0025] (C₁-C₆) 卤代烷基,
- [0026] (C₁-C₃) 烷氧基 (C₂-C₆) 烷基,
- [0027] (C₂-C₆) 烯基,
- [0028] (C₃-C₁₀) 环烷基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0029] (C₃-C₁₀) 环烷基 (C₁-C₆) 烷基,其中环烷基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0030] 芳基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0031] 芳基 (C₁-C₆) 烷基,其中芳基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0032] R¹-C(O)-,和
- [0033] R²-SO₂-;
- [0034] R¹选自:
- [0035] 氢,
- [0036] (C₁-C₆) 烷基,
- [0037] (C₁-C₆) 卤代烷基,
- [0038] (C₁-C₃) 烷氧基 (C₂-C₆) 烷基,
- [0039] (C₂-C₆) 烯基,
- [0040] (C₃-C₁₀) 环烷基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0041] (C₃-C₁₀) 环烷基 (C₁-C₆) 烷基,其中所述环烷基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0042] 芳基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,和
- [0043] 芳基 (C₁-C₆) 烷基,其中芳基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0044] 并且R²选自:
- [0045] (C₁-C₆) 烷基,
- [0046] (C₁-C₆) 卤代烷基,
- [0047] (C₁-C₃) 烷氧基 (C₂-C₆) 烷基,
- [0048] (C₂-C₆) 烯基,
- [0049] (C₃-C₁₀) 环烷基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0050] (C₃-C₁₀) 环烷基 (C₁-C₆) 烷基,其中所述环烷基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代,
- [0051] 芳基,其可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团

取代,和

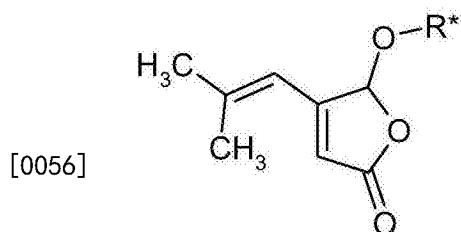
[0052] 芳基 (C₁-C₆) 烷基,其中芳基可任选被独立地选自卤素、(C₁-C₃) 烷基和 (C₁-C₃) 烷氧基的1、2或3个基团取代。

[0053] 在其它的实施方式A1E2中,本发明提供了根据实施方式A1E1的化合物,其中R为氢,使得式 (VI) 的化合物为根据式 (VI^A) 的5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮。



(VI^A)

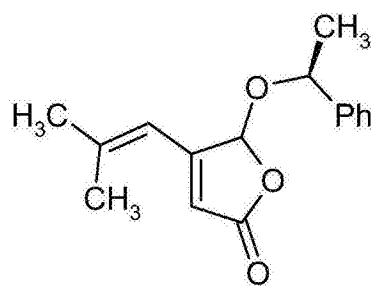
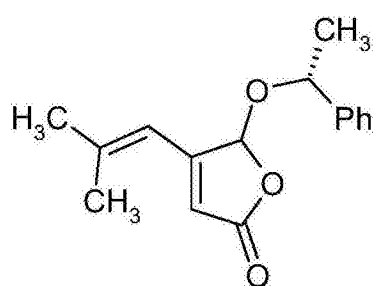
[0055] 在其它的实施方式A1E3中,本发明提供了式 (VI^B) 的根据实施方式A1E1的化合物



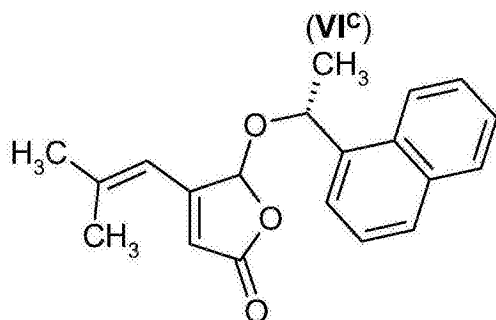
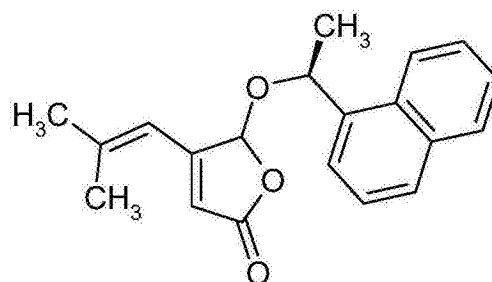
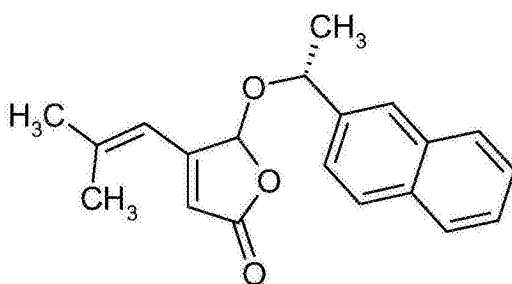
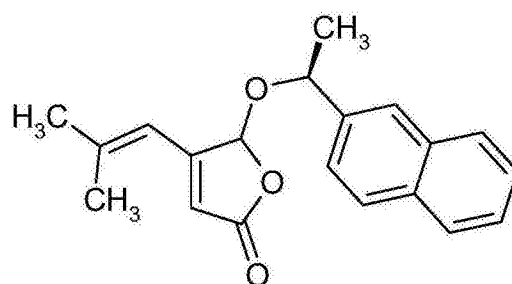
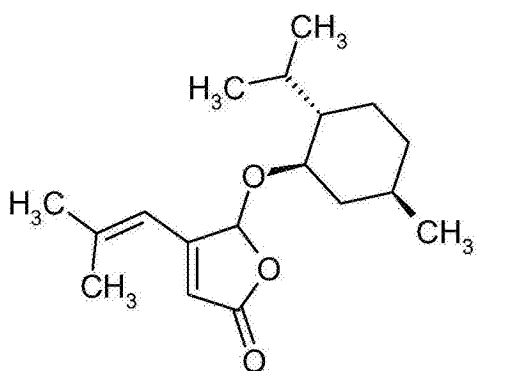
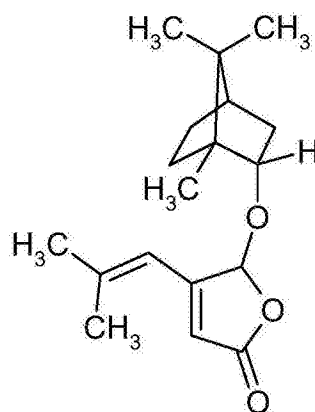
(VI^B)

[0057] 其中R*是手性 (C₅-C₁₅) 烃基。

[0058] 在其它的实施方式A1E4中,本发明提供了根据实施方式A1E3的化合物,其中R*选自 (R)-或 (S)- α -甲基苄基、(R)-或 (S)-1-(1-萘基) 乙基、(R)-或 (S)-1-(2-萘基) 乙基、薄荷基和冰片基,使得式 (VI) 的化合物是式 (VI^C)-(VI^K) 的化合物。



[0059]

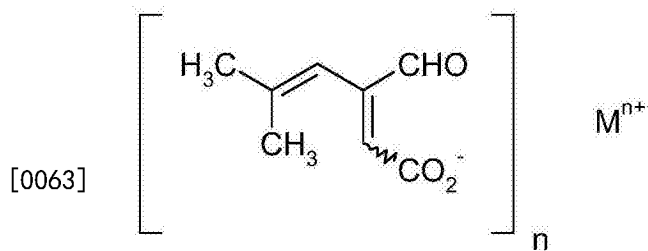
(VI^D)(VI^E)(VI^F)(VI^G)(VI^H)

[0060]

(VI^J)(VI^K)

[0061] 在其它的实施方式A1E5中,本发明提供了根据实施方式A1E1的化合物,其中R为 $R^1-C(O)-$ 或 R^2-SO_2- 并且 R^1 和 R^2 是手性 (C_5-C_{15}) 烃基。

[0062] 在另一个方面A2中,本发明提供了式 (IX) 的化合物



(IX)

[0064] 式 (IX) 的化合物可以以 (E)-或 (Z)-几何异构体或以两种几何异构体的混合物存在。

[0065] 在第一实施方式A2E1中,本发明提供了式 (IX) 的化合物,其中:

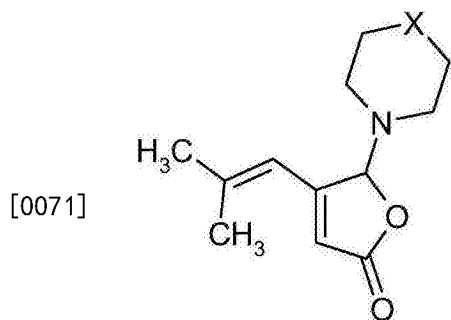
[0066] n是1且M⁺选自Li⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺、NH₄⁺、((C₁-C₃) 烷基) NH₃⁺、((C₁-C₃) 烷基)₂NH₂⁺、((C₁-C₃) 烷基)₃NH⁺和((C₁-C₃) 烷基)₄N⁺;或者

[0067] n是2且M²⁺选自Mg²⁺、Ca²⁺和Zn²⁺。

[0068] 在其它的实施方式A2E2中,本发明提供了根据实施方式A2E1的化合物,其中n是1且M⁺选自NH₄⁺和((C₁-C₃) 烷基) NH₃⁺。

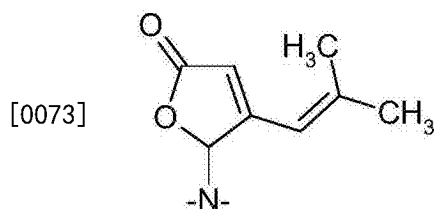
[0069] 在其它的实施方式A2E3中,本发明提供了根据实施方式A2E1的化合物,其中n是1且M⁺选自Li⁺、Na⁺和K⁺。

[0070] 在另一个方面A3中,本发明提供了式 (VII) 的化合物。



(VII)

[0072] 在第一实施方式A3E1中,本发明提供了式 (VII) 的化合物,其中-X-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃) 烷基)-、-N(苄基)-、或



[0074] 在其它的实施方式A3E2中,本发明提供了根据实施方式A3E1的化合物,其选自:

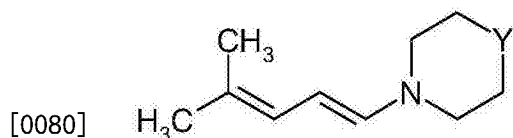
[0075] 4-(2-甲基丙烯基)-5-吡咯烷-1-基-5H-呋喃-2-酮;

[0076] 4-(2-甲基丙烯基)-5-哌啶-1-基-5H-呋喃-2-酮;

[0077] 4-(2-甲基丙烯基)-5-吗啉-4-基-5H-呋喃-2-酮;和

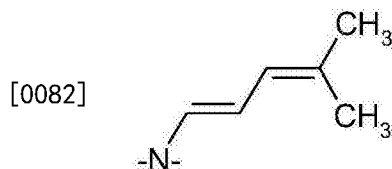
[0078] 1,4-双-(4-(2-甲基丙烯基)-5H-呋喃-2-酮-5-基) 哌嗪。

[0079] 在另一个方面A4中,本发明提供了式(VIII)的化合物。



(VIII)

[0081] 在第一实施方式A4E1中,本发明提供了式(VIII)的化合物,其中-Y-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃)烷基)-、-N(苄基)-、或



[0083] 在其它的实施方式A4E2中,本发明提供了根据实施方式A4E1的化合物,其选自:

[0084] 4-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)吗啉;

[0085] 1-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)-哌嗪,

[0086] 1-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)-4-甲基哌嗪,

[0087] 4-乙基-1-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)-哌嗪,

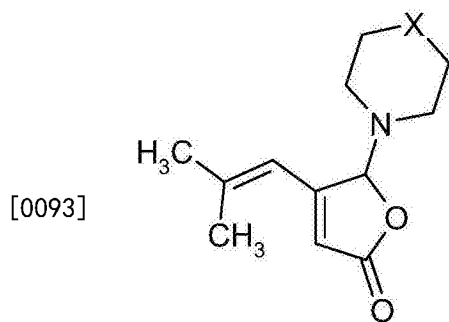
[0088] 4-苄基-1-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)-哌嗪,和

[0089] 1,4-双-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)哌嗪。

[0090] 在另一个方面A5中,本发明提供了式(VI^A)的化合物的制备方法,其包括在酸催化剂的存在下用水处理式(VII)的化合物的步骤。

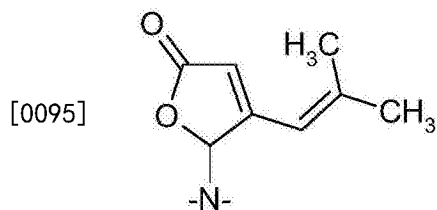
[0091] 在第一实施方式A5E1中,本发明提供了式(VI^A)的化合物的制备方法,其包括以下步骤:

[0092] (a) 制备式(VII)的化合物



(VII)

[0094] 其中-X-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃)烷基)-、-N(苄基)-、或



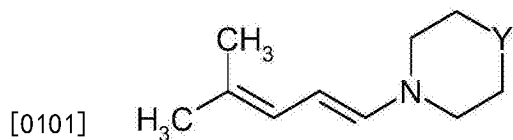
[0096] 和

[0097] (b) 在酸催化剂的存在下用水处理式 (VII) 的化合物。

[0098] 在其它的实施方式A5E2中,本发明提供了根据实施方式A5E1的方法,其中在水解步骤(b)之前分离来自步骤(a)的式(VII)的化合物。

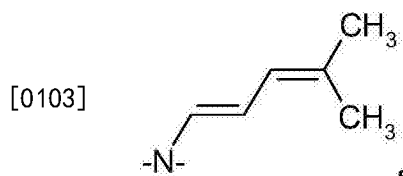
[0099] 在其它的实施方式A5E3中,本发明提供了根据实施方式A5E1的方法,其中水解步骤(b)在步骤(a)之后直接进行,以使得在水解步骤(b)之前不分离式(VII)或(VII^B)的化合物。

[0100] 在其它的实施方式A5E4中,本发明提供了根据实施方式A5E1、A5E2或A5E3的方法,其中式(VII)的化合物通过用乙醛酸或其水合物处理式(VIII)的化合物来制备



(VIII)

[0102] 其中-Y-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃) 烷基)-、-N(苄基)-、或



[0104] 在另一个方面A6中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R不是氢、R¹-C(O)-和R²-SO₂-,所述方法包括在酸催化剂的存在下用醇R-OH处理式(VI^A)的化合物的步骤。

[0105] 在实施方式中A6E1中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R不是氢、R¹-C(O)-和R²-SO₂-,所述方法包括以下步骤:

[0106] (a) 使用根据如上定义的实施方式A5E1、A5E2、A5E3和A5E4之任一的方法制备式(VI^A)的化合物;和

[0107] (b) 在酸催化剂的存在下用醇R-OH处理式(VI^A)的化合物。

[0108] 在另一个方面A7中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R不是氢、R¹-C(O)-和R²-SO₂-,所述方法包括在化学计量酸的存在下用醇R-OH处理式(VII)的化合物的步骤。

[0109] 在实施方式中A7E1中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R不是氢、R¹-C(O)-和R²-SO₂-,所述方法包括以下步骤:

[0110] (a) 制备式(VII)的化合物;和

[0111] (b) 在化学计量酸的存在下用醇R-OH处理式(VII)的化合物。

[0112] 在另一个方面A8中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R是R¹-C(O)-,所述方法包括用酰基氯R¹-C(O)-Cl或酸酐(R¹-C(O))₂O处理式(VI^A)的化合物的步骤。

[0113] 在实施方式中A8E1中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R是R¹-C(O)-,所述方法包括以下步骤:

[0114] (a) 使用根据如上定义的实施方式A5E1、A5E2、A5E3和A5E4之任一的方法制备式

(VI^A)的化合物;和

[0115] (b) 用酰基氯R¹-C(O)-Cl或酸酐(R¹-C(O))₂O处理式(VI^A)的化合物。

[0116] 在另一个方面A9中,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R是R²-SO₂-,所述方法包括用磺酰氯R²-SO₂-Cl处理式(VI^A)的化合物的步骤。

[0117] 在实施方式中A9E1,本发明提供了式(VI)的化合物的制备方法,其中R是R²-SO₂-,所述方法包括以下步骤:

[0118] (a) 使用根据如上定义的实施方式A5E1、A5E2、A5E3和A5E4之任一的方法制备式(VI^A)的化合物;和

[0119] (b) 用磺酰氯R²-SO₂-Cl处理式(VI^A)的化合物。

[0120] 在另一个方面A10中,本发明提供了4-甲基-2-戊烯醛的烯胺衍生物的制备方法。

[0121] 在第一实施方式A10E1中,本发明提供了4-甲基-2-戊烯醛的烯胺衍生物的制备方法,其包括在合适的胺存在下使乙醛与异丁醛反应。

[0122] 在其它的实施方式A10E2中,本发明提供了根据实施方式A10E1的方法,其中适宜的胺是仲胺。

[0123] 在其它的实施方式A10E3中,本发明提供了根据实施方式A10E2的方法,其中所述仲胺选自:((C₁-C₄)烷基)₂NH,吡咯烷,哌啶,吗啉,哌嗪,N-甲基哌嗪,N-乙基哌嗪和N-苄基哌嗪。

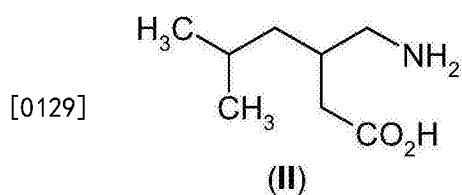
[0124] 在其它的实施方式A10E4中,本发明提供了根据实施方式A10E3的方法,其中所述仲胺选自吡咯烷、哌啶、吗啉和哌嗪。

[0125] 在其它的实施方式A10E5中,本发明提供了根据实施方式A10E1、A10E2、A10E3和A10E4之任一的方法,其中所述反应在酸催化剂的存在下进行。

[0126] 在其它的实施方式A10E6中,本发明提供了根据实施方式A10E1、A10E2、A10E3、A10E4和A10E5之任一的方法,其中在加入乙醛前将异丁醛与适当的胺组合。

[0127] 在其它的实施方式A10E6中,本发明提供了根据实施方式A10E1、A10E2、A10E3、A10E4和A10E5之任一的方法,其中将异丁醛和乙醛同时加入到反应容器中。

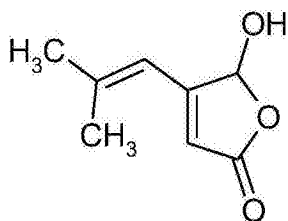
[0128] 在另一个方面A11中,本发明提供了3-氨基-5-甲基己酸(II)的制备方法。



[0130] 在第一实施方式A11E1中,本发明提供了3-氨基-5-甲基己酸(II)或其药学上可接受的盐的制备方法,所述方法包括以下步骤:

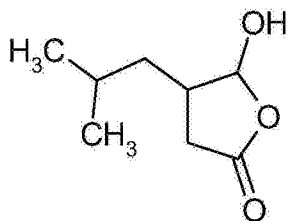
[0131] (a) 制备5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A)

[0132]

(VI^A)

[0133] (b) 将所述5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A)转化为5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)

[0134]

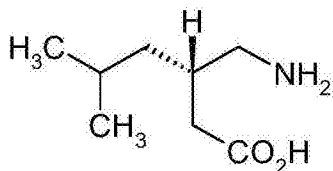
(I^A)

[0135] 和

[0136] (c) 将所述5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)转化为3-氨基甲基-5-甲基己酸(II)。

[0137] 在其它的实施方式A11E2中,本发明提供了根据实施方式A11E1的方法,其中所述3-氨基甲基-5-甲基己酸(II)是(S)-3-氨基甲基-5-甲基己酸((S)-II)

[0138]



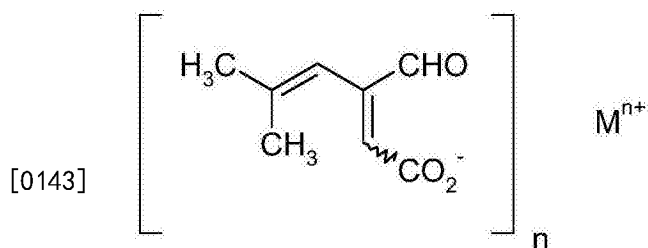
((S)-II)

[0139] 其中所述(S)-3-氨基甲基-5-甲基己酸具有至少80%的对映体过量。

[0140] 在其它的实施方式A11E3中,本发明提供了根据实施方式A11E1或A11E2的方法,其中步骤(a)包括根据如上所述的实施方式A5E1、A5E2、A5E3或A5E4的方法。

[0141] 在其它的实施方式A11E4中,本发明提供了根据实施方式A11E1、A11E2或A11E3的方法,其中步骤(b)包括以下步骤:

[0142] (b1) 用金属氧化物、氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐、氨、单-、二-或三-(C₁-C₃) 烷基胺、或四-(C₁-C₃) 烷基铵氢氧化物处理5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A), 以形成式(IX)的盐



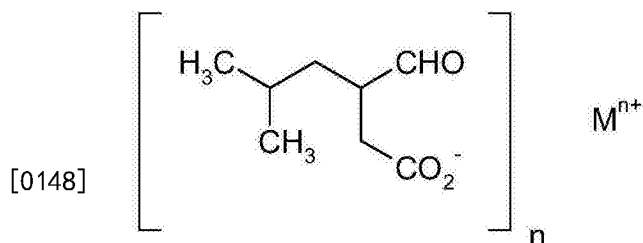
(IX)

[0144] 其中:

[0145] n是1且 M^{n+} 选自 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 NH_4^+ 、((C₁-C₃) 烷基) NH_3^+ 、((C₁-C₃) 烷基) $_2NH_2^+$ 、((C₁-C₃) 烷基) $_3NH^+$ 和((C₁-C₃) 烷基) $_4N^+$;或者

[0146] n是2且 M^{2+} 选自 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} ;

[0147] (b2) 氢化式 (IX) 的盐,以获得式 (X) 的盐



(X)

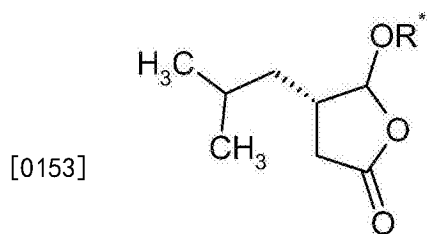
;和

[0149] (b3) 用酸处理式 (X) 的盐。

[0150] 在其它的实施方式A11E5中,本发明提供了根据实施方式A11E1、A11E2或A11E3的方法,其中步骤(b)包括以下步骤:

[0151] (b1) 将5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A)转化为如在实施方式A1E3中定义的式(VI)的化合物,其中R是手性(C₅-C₁₅) 烃基;

[0152] (b2) 氢化式(VI)的化合物,以获得式(XI)的化合物



(XI)

[0154] 其中R*是手性(C₅-C₁₅) 烃基;和

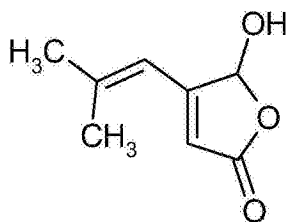
[0155] (b3) 用酸处理式(XI)的化合物,以产生((S)-I^A)。

[0156] 在另一个方面A12中,本发明提供了3-氨基-5-甲基己酸(II)的其它制备方法。

[0157] 在第一实施方式A12E1中,本发明提供了3-氨基-5-甲基己酸(II)或其药学上可接受的盐的制备方法,所述方法包括以下步骤:

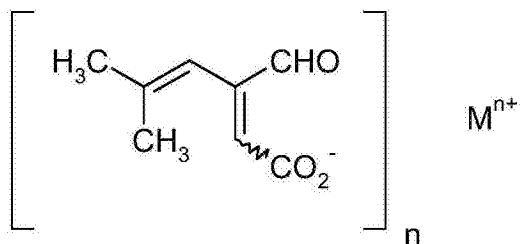
[0158] (a) 制备5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A)

[0159]

(VI^A)

[0160] (b) 用氨或单- (C₁-C₃) 烷基胺处理5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A), 以形成式(IX^A)的盐

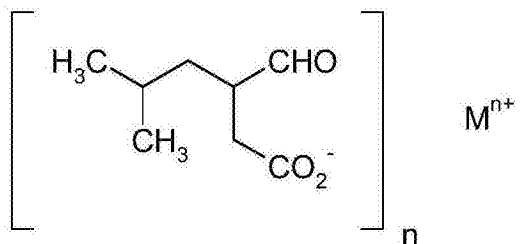
[0161]

(IX^A)

[0162] 其中n为1且M⁺选自NH₄⁺和((C₁-C₃) 烷基) NH₃⁺

[0163] (c) 氢化式(IX^A)的盐, 以获得式(X^A)的盐

[0164]

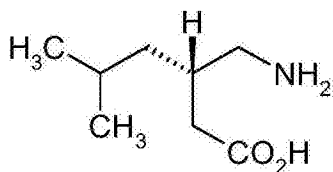
(X^A)

;和

[0165] (d) 用转氨酶或胺氧化酶/亚胺还原酶处理式(X^A)的盐, 以提供3-氨基-5-甲基己酸(II)。

[0166] 在其它的实施方式A12E2中, 本发明提供了根据实施方式A12E1的方法, 其中3-氨基-5-甲基己酸(II)是(S)-3-氨基-5-甲基己酸((S)-II)

[0167]



((S)-II)

[0168] 其中所述(S)-3-氨基-5-甲基己酸具有至少80%的对映体过量。

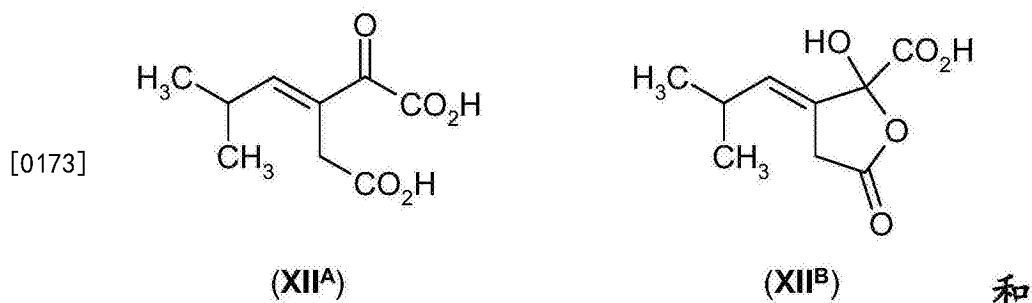
[0169] 在其它的实施方式A12E3中, 本发明提供了根据实施方式A12E1或A12E2的方法, 其中步骤(a)包括根据如上所述的实施方式A5E1、A5E2、A5E3或A5E4的方法。

[0170] 在另一个方面A13中, 本发明提供了5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮

喃酮(I^A)的其它制备方法。

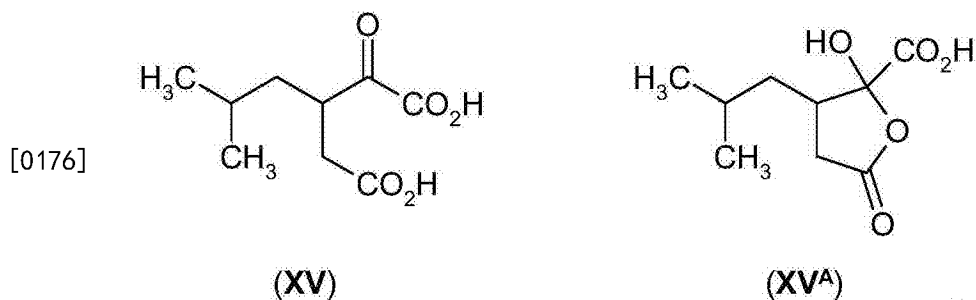
[0171] 在第一实施方式A13E1中,本发明提供了5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)的其它制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0172] (a) 获得3-亚异丁基-2-氧代戊二酸(XII^A)或其环化的异构体(XII^B)

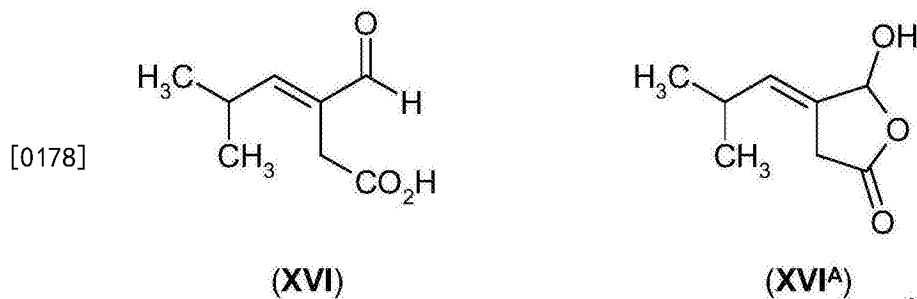


[0174] (b) 相继或同时地还原碳-碳双键和使α-酮酸官能团脱羧基。

[0175] 在其它的实施方式A13E2中,本发明提供了根据实施方式A13E1的方法,其中在α-酮酸官能团的脱羧基之前还原碳-碳双键以提供3-亚异丁基-2-氧代戊二酸(XV)或其环化的异构体(XV^A)



[0177] 在其它的实施方式A13E3中,本发明提供了根据实施方式A13E1的方法,其中在碳-碳双键的还原之前使α-酮酸官能团脱羧基以提供3-甲酰基-5-甲基-3-戊烯酸(XVI)或其环化的异构体(XVI^A)



[0179] 在其它的实施方式A13E4中,本发明提供了根据实施方式A13E1的方法,其中同时地使α-酮酸官能团脱羧基和还原碳-碳双键。

[0180] 在其它的实施方式A13E5中,本发明提供了根据实施方式A13E1、A13E2、A13E3或A13E4的方法,其中脱羧反应在脱羧酶的存在下进行。

[0181] 在其它的实施方式A13E6中,本发明提供了根据实施方式A13E1、A13E2、A13E3、A13E4或A13E5的方法,其中碳-碳双键的还原在烯酮还原酶(enoate reductase)的存在下进行。

[0182] 在另一个方面A14中,本发明提供了选自以下的化合物:

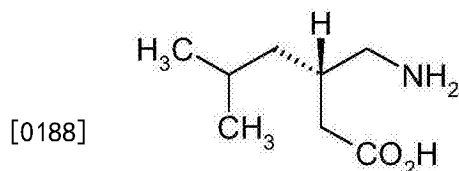
[0183] 3-亚异丁基-2-氧代戊二酸;

[0184] 3-异丁基-2-氧代戊二酸;和

[0185] 3-甲酰基-5-甲基-3-戊烯酸,

[0186] 或其盐、(C₁-C₆) 烷基酯或环化异构体。

[0187] 在另一个方面A15中,本发明提供了(S)-3-氨基-5-甲基己酸((S)-II)或其药理学上可接受的盐的制备方法



((S)-II)

[0189] ,所述方法包括以下步骤:

[0190] (a) 使用根据如上定义的实施方式A13E1、A13E2、A13E3、A13E4、A13E5或A13E6之任一的方法制备5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A),和

[0191] (b) 将所述5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮转化为(S)-3-氨基-5-甲基己酸。

[0192] 在另一个方面A16中,本发明提供了将(R)-3-氨基-5-甲基己酸转化为(S)-3-氨基-5-甲基己酸的方法,其包括用转氨酶或胺氧化酶/亚胺还原酶处理(R)-3-氨基-5-甲基己酸。

[0193] 在另一个方面A17中,本发明提供了用于增加(S)-3-氨基-5-甲基己酸在(R)-和(S)-3-氨基-5-甲基己酸的混合物中的比例的方法,包括用转氨酶或胺氧化酶/亚胺还原酶处理所述混合物。

[0194] 在另一个方面A18中,本发明提供了可用于将5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)转化为普瑞巴林的转氨酶。

[0195] 在第一实施方式A18E1中,本发明提供了具有与下列氨基酸序列具有至少95%同源性的氨基酸序列的转氨酶

[0196]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHX²⁷RGTVVVTHGEGPYX⁴¹VDVX⁴⁵GRRYLDANGLYNMVAGFDHKGLIDAAK
AQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX¹⁴⁷N
AYHGVTAVSASMTGX¹⁶³PX¹⁶⁵NSVFGLPLPGFVHLX¹⁸⁰CPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAG
FFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYPDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISSKNLTAGFFPVGA
VILGPELX³⁰⁴KRLETAIEAIEEFPHGFTAX³²⁴GHPVGCAIALKAIDWMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI
EYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSX⁴⁰¹RIANTCX⁴⁰⁸DLGLICX⁴¹⁵X⁴¹⁶X⁴¹⁷GQSVILX⁴²⁴PPFILTEAQMD
EMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID NO.1)

[0197] 其中

[0198] x²⁷选自谷氨酰胺(Q)和谷氨酸(E);

[0199] x⁴¹选自异亮氨酸(I)和缬氨酸(V);

[0200] x⁴⁵选自天冬酰胺(N)和组氨酸(H);

- [0201] x^{147} 选自天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)；
[0202] x^{163} 选自亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)；
[0203] x^{165} 选自酪氨酸(Y)和组氨酸(H)；
[0204] x^{180} 选自苏氨酸(T)；甘氨酸(G)和丝氨酸(S)；
[0205] x^{304} 选自丙氨酸(A)和丝氨酸(S)；
[0206] x^{324} 选自甘氨酸(G)和丝氨酸(S)；
[0207] x^{401} 选自赖氨酸(K)和谷氨酸(E)；
[0208] x^{408} 选自苏氨酸(T)和谷氨酰胺(Q)；
[0209] x^{415} 选自丝氨酸(S)和丙氨酸(A)；
[0210] x^{416} 选自脯氨酸(P)和丙氨酸(A)；
[0211] x^{417} 选自亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)；和
[0212] x^{424} 选自半胱氨酸(C)和丝氨酸(S)。
[0213] 在其它的实施方式A18E2中，本发明提供了根据实施方式A18E1的具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的转氨酶。

[0214] 在其它的实施方式A18E3中，本发明提供了根据实施方式A18E1或A18E2的转氨酶，其中：

- [0215] x^{27} 是谷氨酸(E)；
[0216] x^{147} 是谷氨酰胺(Q)；
[0217] x^{165} 是组氨酸(H)；
[0218] x^{304} 是丝氨酸(S)；
[0219] x^{324} 是甘氨酸(G)；
[0220] x^{401} 是赖氨酸(K)；
[0221] x^{408} 是谷氨酰胺(Q)；
[0222] x^{416} 是丙氨酸(A)；
[0223] x^{417} 是甲硫氨酸(M)；和
[0224] x^{424} 是丝氨酸(S)。

[0225] 在其它的实施方式A18E4中，本发明提供了根据实施方式A18E2的具有选自下列的氨基酸序列的转氨酶：

[0226]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAACAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVT
AVSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLE
TAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDMF DKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.2)；

[0227]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAACAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVT

AVSASMTGLPYNVSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.3) ;

[0228]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDA AKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGLPHNSVSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.4) ;

[0229]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDA AKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGMPHNSVSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.5) ;

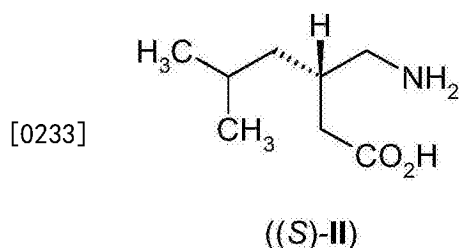
[0230]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDA AKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGLPHNSVSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.6) ; 和

[0231]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDA AKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGLPHNSVSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.7) 。

[0232] 在另一个方面A19中,本发明提供了(S)-3-氨基-5-甲基己酸((S)-II)或其药学上可接受的盐的制备方法



[0234] ,所述方法包括用根据实施方式A18E1、A18E2、A18E3和A18E4之任一的转氨酶处理5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)和胺的步骤。

[0235] 优选实施方式的详细描述

[0236] 术语“烷基”是指含有指定数目的碳原子的直链或支链饱和脂肪烃基(radical)。烷基的例子包括甲基,乙基,n-丙基,异丙基,n-丁基,异丁基,仲丁基,叔丁基,新戊基和n-己基。

[0237] 术语“烷氧基”是指由连接至氧原子的如上定义的烷基构成的基团。烷氧基的离子包括甲氧基,乙氧基和异丙氧基。

[0238] 术语“烷氧基-烷基”是指其中烷氧基取代了烷基氢原子的直链或支链饱和脂肪烃基。烷氧基-烷基的例子是2-甲氧基乙基。

[0239] 术语“卤代烷基”是指其中一个或多个氢原子被氟、氯、溴或碘替换的如上定义的烷基。当多于一个氢原子被替换时,替换的卤素原子可以是相同的或不同的。卤代烷基的例子包括氟甲基,二氟甲基,三氟甲基,氯二氟甲基,2,2,2-三氟乙基和3-溴丙基。

[0240] 术语“芳基”是指苯基或萘基。

[0241] 术语“芳基-烷基”是指其中芳基取代了烷基氢原子的直链或支链饱和脂肪烃基。芳基-烷基的例子是苄基。

[0242] 术语“环烷基”是指含有指定数目的碳原子的饱和单环或多环碳环。单环环烷基的例子包括环丙基,环丁基,环戊基和环己基。多环环烷基的例子包括二环[2,2,1]庚基和二环[3,2,1]辛基。

[0243] 关于烷基或芳基的术语“任选取代”是指烷基或芳基的氢原子可以被列出的基团之一替换。取代可以在烷基或芳基中的任何位置发生。当任选取代是使用“一个或多个基团”时,则烷基或芳基的任何数目的氢原子,多至等于存在于烷基或芳基中的氢的数目的最大数目,可被替换,并且各替换是相互独立的。

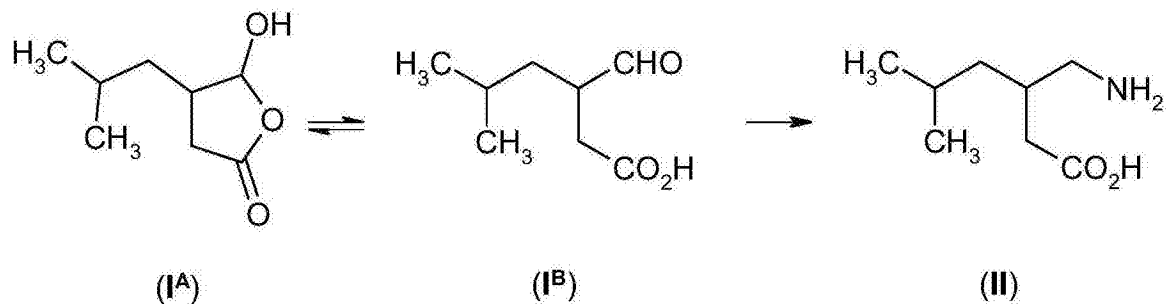
[0244] 术语“对映体过量”,有时缩写为“e.e.”,是对于给定的样品,一种对映体超过其对映异构体的过量的测量并表达为百分比。对映体过量定义为:

[0245] $100 \times (er-1) / (er+1)$

[0246] 其中“er”是量较多的对映体对量较少的对映体的比率。

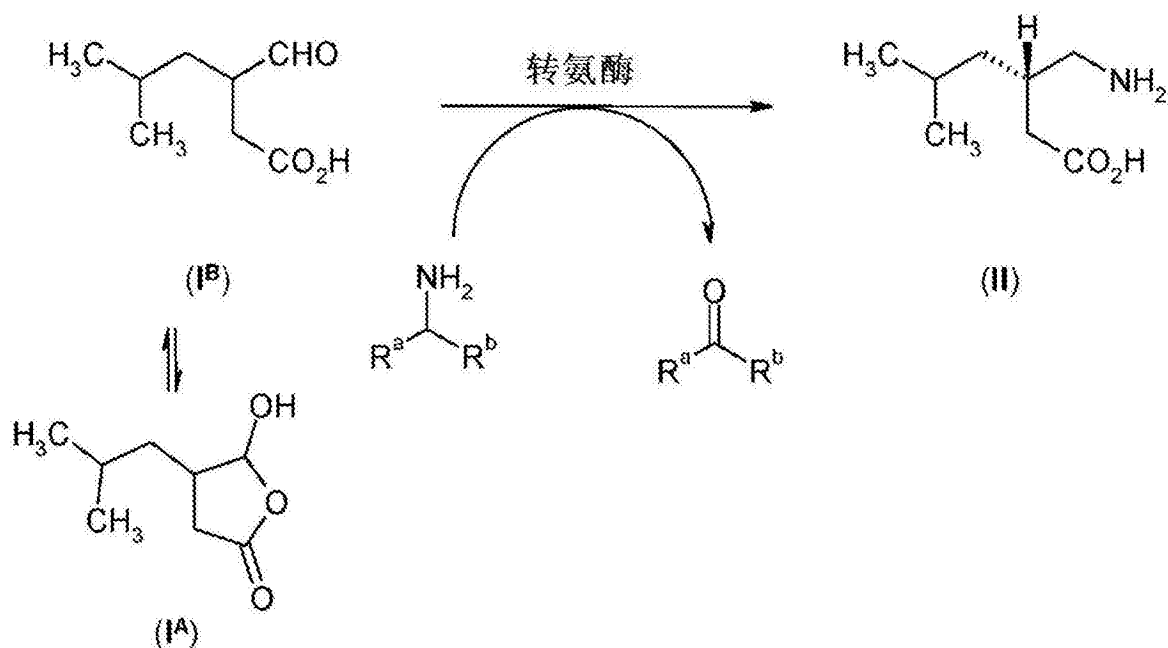
[0247] 5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮(I^A)是3-氨基-5-甲基己酸(II)的制备中的适宜的中间体。在化学还原剂的存在下用氨对外消旋(I^A)的处理提供了外消旋的3-氨基-5-甲基己酸((R/S)-II)(见W02008/127646A2)。推测该反应牵涉开环的异构体(I^B)。

[0248]

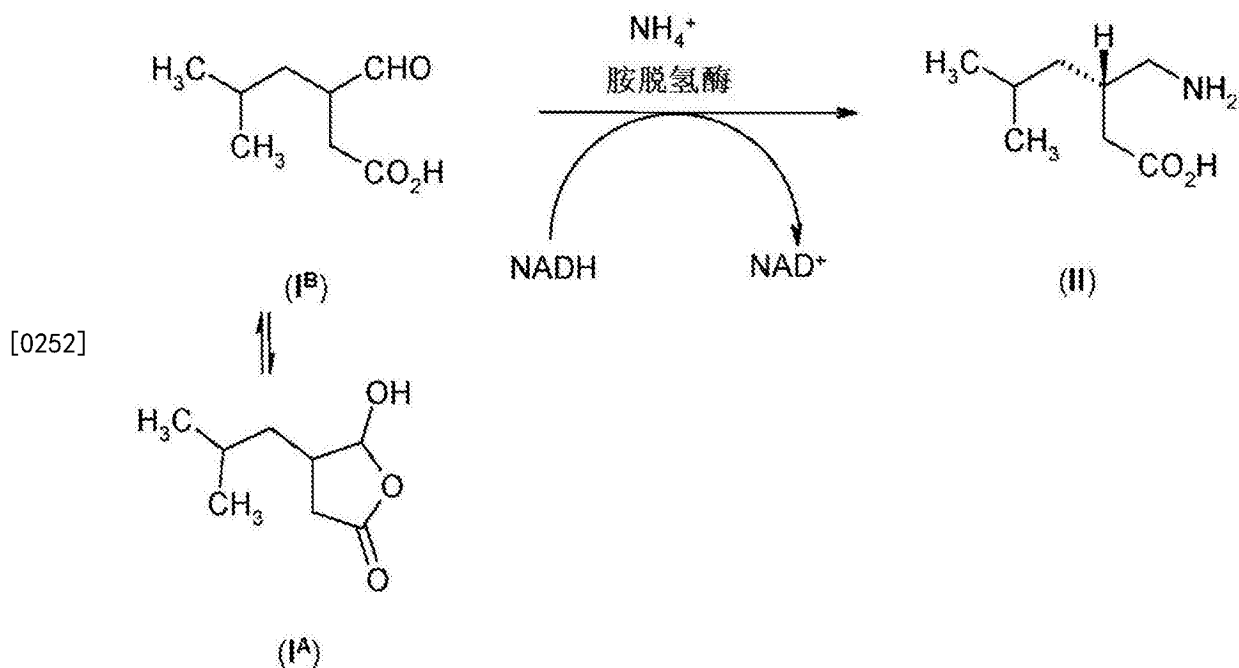


[0249] 在转氨酶的存在下使用胺供体的还原性胺化可提供对映体富集的3-氨基-5-甲基己酸。合适的胺供体是伯胺例如单-烷基胺,特别是异丙胺,和 α -氨基酸。

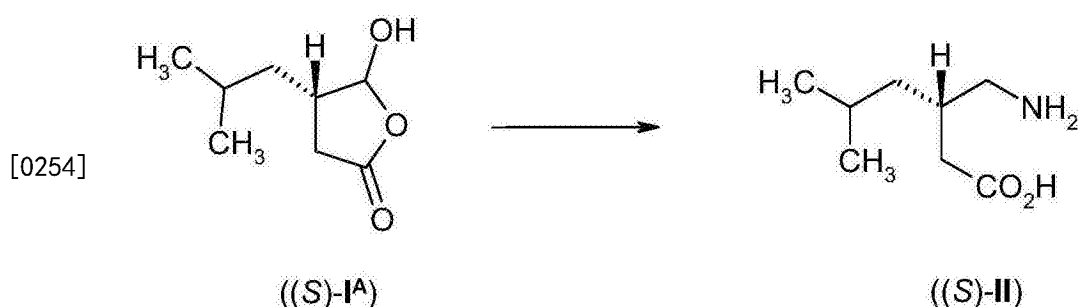
[0250]



[0251] (I^A) 与适合的胺脱氢酶/亚胺还原酶在氨的存在下的反应也可以是对普瑞巴林的合适途径。可能需要化学计量的辅助因子例如NADH或NADPH,或可包括第二氧化还原酶例如甲酸脱氢酶以再循环辅助因子。



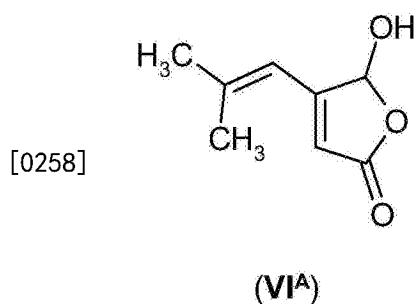
[0253] 其中二氢呋喃酮(I^A) 在C-4位置上具有确定的立体化学,此立体化学可在还原性胺化反应过程中被保留。由于普瑞巴林具有(S)-立体化学,可优选具有已经存在于二氢呋喃酮中的此立体化学。



[0255] 可选择地,二氢呋喃酮(I^A) 可以以外消旋形式使用。随后可以通过在允许单一对映体的立体选择性形成的条件下进行还原性胺化反应,例如通过在转氨酶的存在下进行转化,或通过使产物经历单独拆分步骤,例如通过与手性酸或碱结晶,来获得产物的所需的立体异构体。

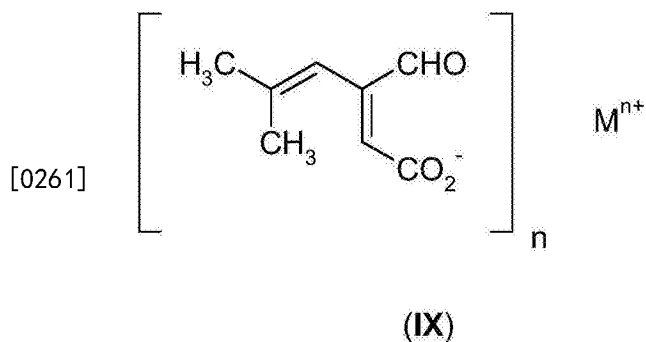
[0256] 可通过使用下文示出的方法以外消旋或对映体富集形式方便地制备二氢呋喃酮(I^A)。

[0257] 在第一方法中,二氢呋喃酮(I^A) 通过还原5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-5H-2-呋喃酮(VI^A) 制备。



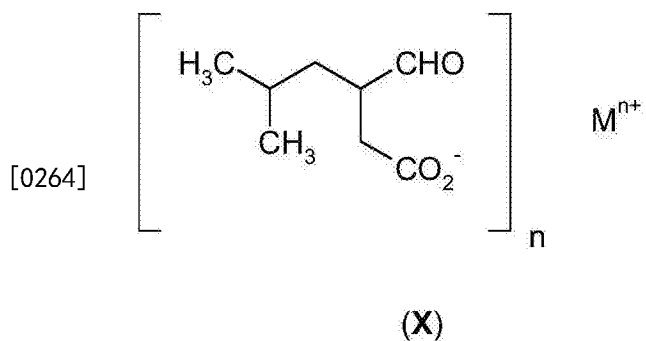
[0259] 该还原可通过在合适的催化剂的存在下进行氢化来方便地完成。合适的催化剂包括均相和多相催化剂。催化剂一般包括过渡金属例如钯、铂、铑、钌或镍,或其盐或氧化物。多相催化剂包括细碎的金属和衬底支持的金属和金属氧化物,其中衬底可以是碳、二氧化硅,氧化铝或任何其它合适的惰性材料。均相催化剂包括过渡金属的膦配位络合物。当膦配体为手性时,则催化剂是手性的。当使用非手性催化剂时,则产物是外消旋二氢呋喃酮(I^A)。手性催化剂的使用可以以对映选择性方式提供二氢呋喃酮(I^A)。

[0260] 当反应在碱性介质中进行时可改善氢化反应的选择性和总产率。不受理论束缚,据信在碱的存在下呋喃酮主要以开环的盐(IX)存在。

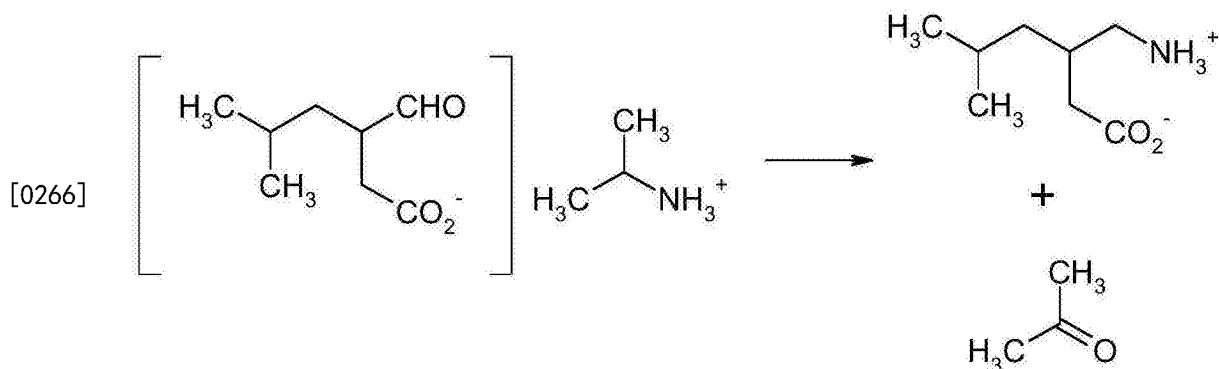


[0262] 可以使用任何合适的碱,只要它不干扰氢化过程,例如通过使催化剂中毒。合适的碱的例子包括碱(例如Li,Na,K和Rb)和碱土金属(例如Ca和Mg)氧化物、氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐。还可使用其它金属盐,例如锌盐。由于其良好的溶解性和/或低毒性,碱金属盐可以是优选的。胺碱例如氨以及伯、仲和叔胺可用于制备铵盐。还可使用四烷基氢氧化铵,导致四烷基铵盐的形成。

[0263] 式(IX)的盐的氢化提供了式(X)的盐。



[0265] 在氢化反应之后,通过用合适的酸处理该盐来回收二氢呋喃酮(I^A)。可选择地,可通过用转氨酶或胺氧化酶/亚胺还原酶处理来将该盐直接转化为3-氨基-5-甲基己酸(II)。在这种情况下,可优选使用铵盐(M⁺=NH₄⁺)或烷基伯铵盐(M⁺=烷基-NH₃⁺),因为铵或烷基铵离子提供了酶的辅底物。异丙基铵盐与转氨酶的组合使用是优选的例子。

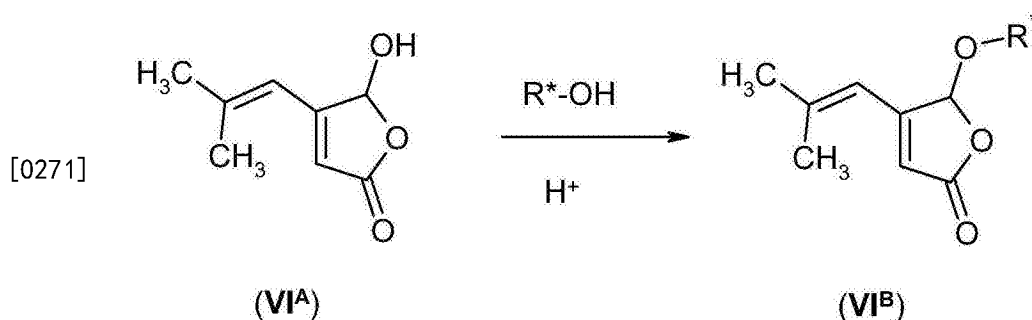


[0267] 其中R不是氢的式(VI)的呋喃酮还可通过氢化还原。当R是烷基、卤代烷基、烷氧基烷基烯基、环烷基、环烷基-烷基、芳基或芳基-烷基时,这些呋喃酮可以从式(VI^A)的化合物通过与醇R-OH在酸催化剂的存在下反应来制备。当R是R¹-C(O)-时,呋喃酮可以从式(VI^A)的化合物通过与酸酐(R¹-C(O))₂O或酰基氯R¹-C(O)-Cl任选在碱例如叔胺的存在下反应来制备。当R是R²-SO₂-时,呋喃酮可以从式(VI^A)的化合物通过与磺酰氯R²-SO₂-Cl任选地在碱例如叔胺的存在下反应来制备。

[0268] 在氢化步骤后,式(I^A)的二氢呋喃酮可以从还原产物通过用酸(当R是烷基、卤代烷基、烷氧基烷基烯基、环烷基、环烷基-烷基、芳基或芳基-烷基时)或碱(当R是R¹-C(O)-或R²-SO₂-时)处理来产生。

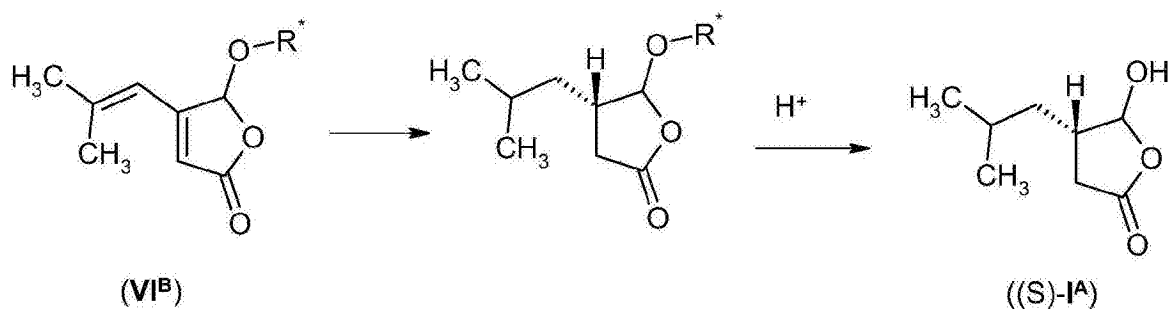
[0269] 手性R基团的使用可提供手性氢化产物而无需手性催化剂。

[0270] 例如,呋喃酮(VI^A)与手性醇R*-OH反应以提供手性醚衍生物(VI^B)。



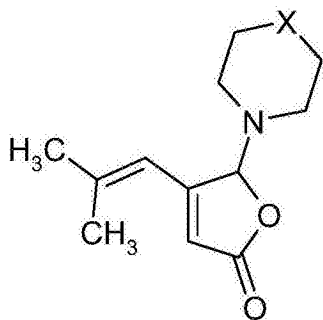
[0272] 合适的手性醇可包括α-芳基醇例如1-苯基乙醇和1-萘基乙醇,以及萜烯醇例如薄荷醇和冰片。衍生物(VI^B)的氢化可以以对映选择性方式进行,随后用合适的酸处理所得到的产物并在水的存在下提供手性形式的二氢呋喃酮(I^A)。

[0273]



[0274] 呋喃酮(VI^A)可从式(VII)的化合物通过在酸催化剂的存在下用水处理式(VII)的化合物来制备

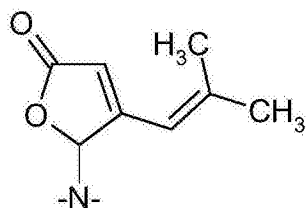
[0275]



(VII)

[0276] 其中-X-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃) 烷基)-、-N(苄基)-、或

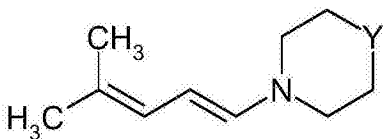
[0277]



[0278] 。合适的酸包括无机酸例如硫酸。可选择地,式(VII)的化合物可以用醇R-OH处理以直接提供式(VI)的化合物,其中R是烷基、卤代烷基、烷氧基烷基烯基、环烷基、环烷基-烷基、芳基或芳基-烷基。

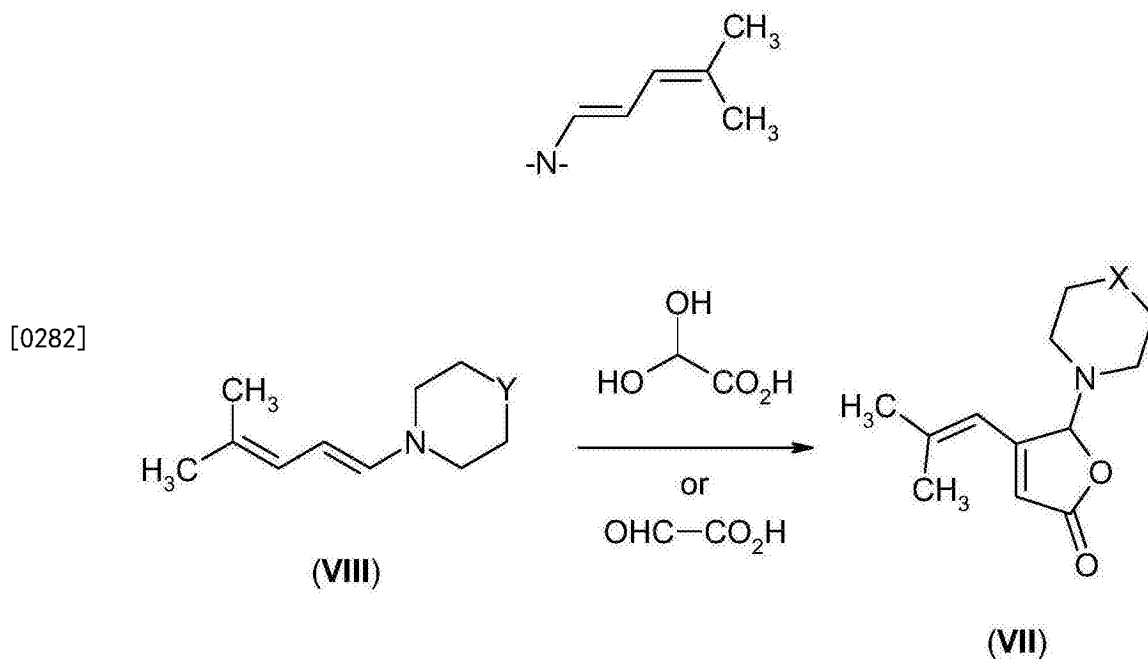
[0279] 式的化合物(VII)可以通过式(VIII)的二烯胺与乙醛酸或其水合物的反应来制备。

[0280]



(VIII)

[0281] 其中-Y-表示单键、-CH₂-、-O-、-NH-、-N((C₁-C₃) 烷基)-、-N(苄基)-、或

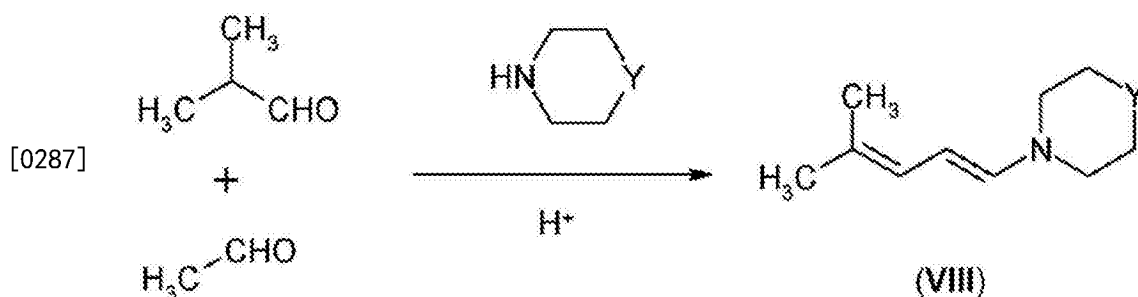


[0283] 应理解,式(VII)中的-X-相应于式(VIII)的起始材料中的-Y-,除了当-Y-是



[0285] 其中-Y-表示单键或-CH₂-的式(VIII)的化合物已通过4-甲基-2-戊烯醛与吡咯烷或哌啶的反应来制备(Kienzle,F.等人,Helv.Chim.Acta1985,68(5),1133-39)。可以类似地制备式(VIII)的其它化合物。

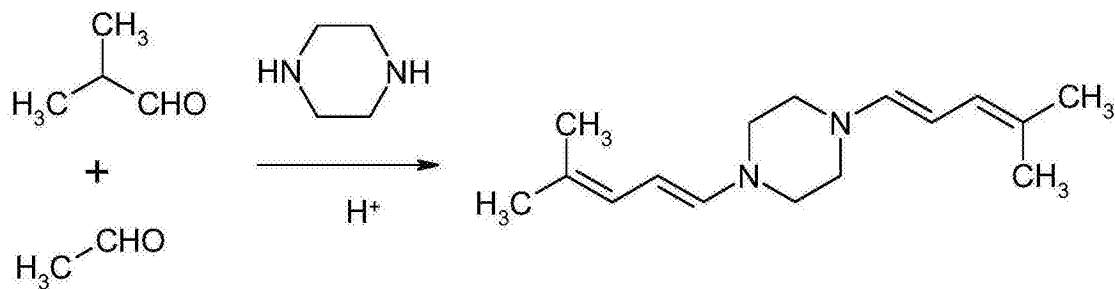
[0286] 可选择地,异丁醛和乙醛在合适的胺例如吡咯烷、哌啶或吗啉的存在下与溶剂例如乙腈中的催化酸的缩合提供二烯胺衍生物(VIII)。



[0288] Y=单键、CH₂、O、N(烷基)、N(苄基)

[0289] 如果哌嗪用作胺,则获得双-二烯胺。

[0290]

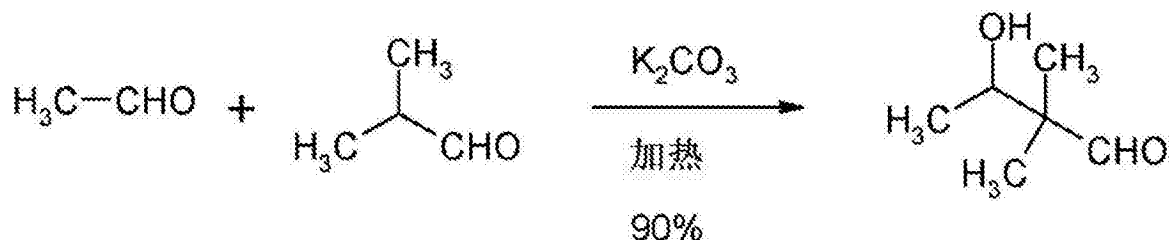


[0291] 其中Y是NH的式(VIII)的化合物可以通过使用单保护哌嗪作为胺接着进行脱保护步骤来获得。

[0292] 还可使用无环仲胺例如二乙胺和二异丙胺,但环状仲胺是优选的。

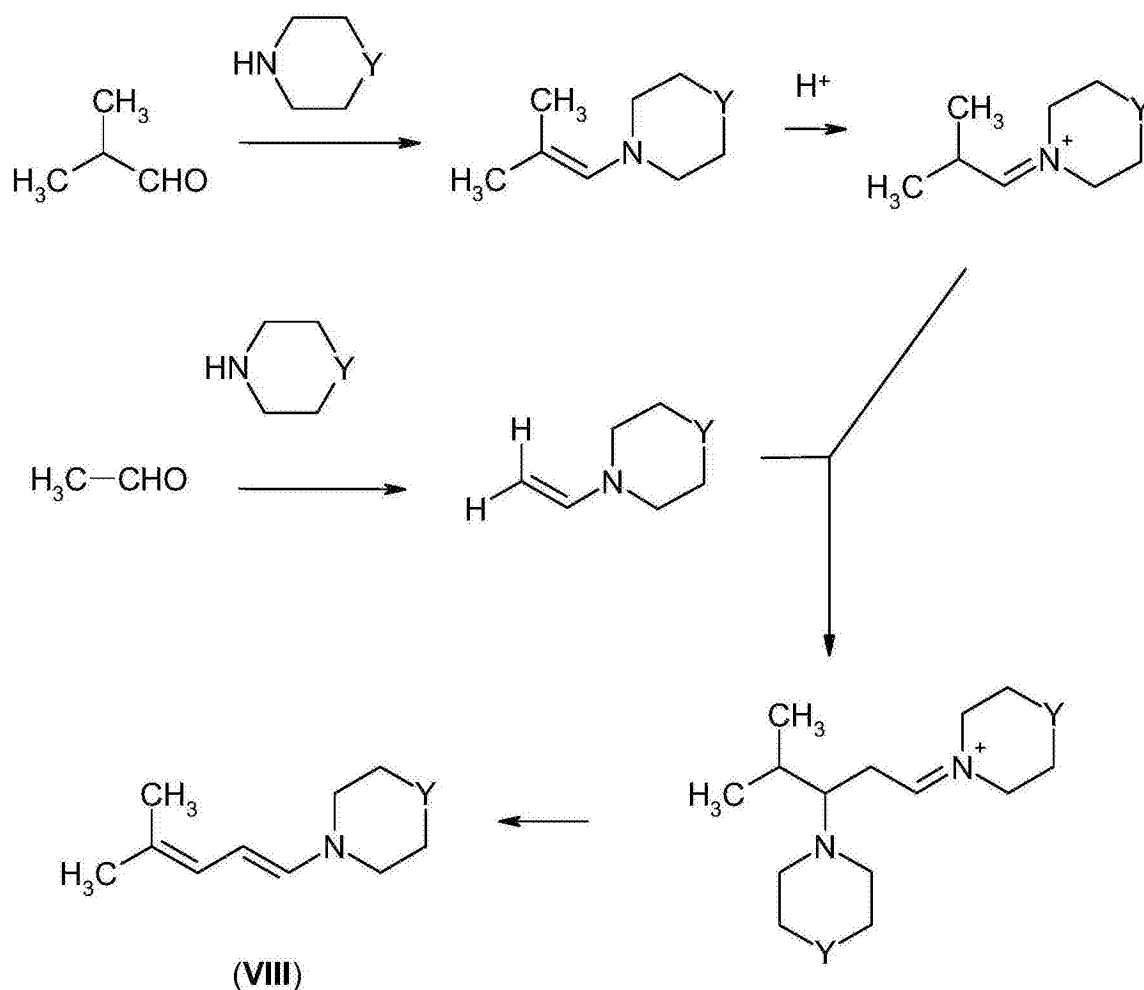
[0293] 异丁醛和乙醛的这种反应模式不同于直接的碱催化反应(例如使用碳酸钾作为碱:英国专利GB834100),其仅产生其中异丁醛用作亲核体的加合物2,2-二甲基-3-羟基丁醛。

[0294]



[0295] 不希望受任何具体理论的束缚,假设乙醛和异丁醛两者最初被转化为它们的烯胺衍生物。在酸催化剂的存在下,更加碱性的异丁烯胺被转化成其亚胺离子。该亲电子物质优先与较少空间位阻的亲核体(其为乙醛烯胺)反应-这确保反应围绕期望的方式进行。

[0296]



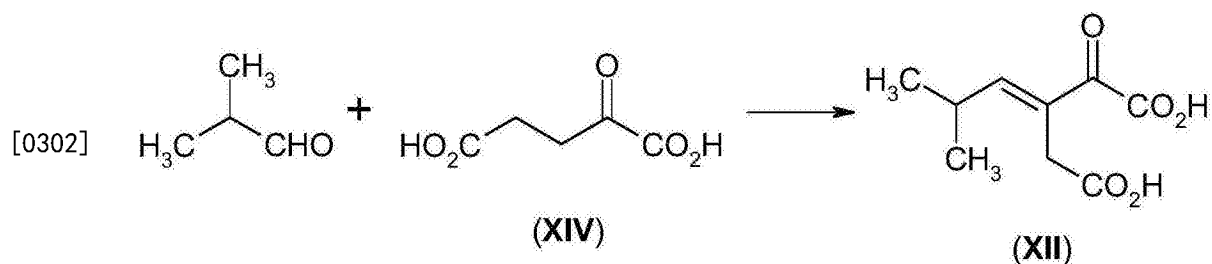
[0297] 本发明的方法比实现正常乙醛反应性的这种“极反转”的文献方法更经济并且更适合于按比例放大,在文献方法中乙醛被转化为O-甲烷硅基化烯醇衍生物并与异丁醛在Mukiyama羟醛条件下偶联。在本发明中,两种偶联配偶体被同时活化-电子和空间效应,指导所观察到的反应性模式。另一优点是,产物二烯胺是4-甲基-2-戊烯醛用于与乙醛酸反应以形成所需的5-氨基呋喃酮(VII)的期望的“活化”形式。

[0298] 这些式(VIII)的二烯胺衍生物可被分离和纯化,或可选择地它们可以直接用乙醛酸(或其水合物)处理,这直接提供呋喃酮衍生物(VII)。

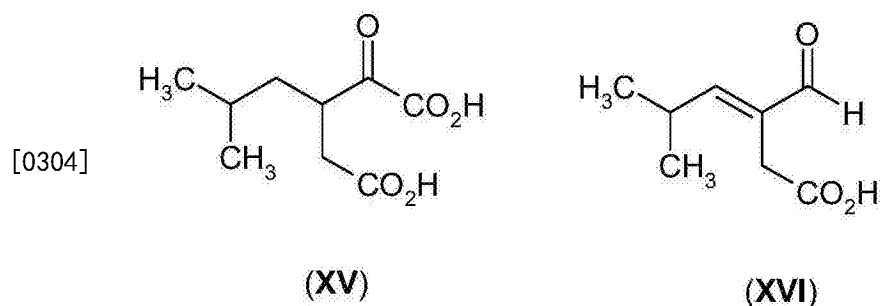
[0299] 呋喃酮衍生物(VII)可被分离和纯化。随后使用酸水溶液的处理提供呋喃酮(VI^A)。

[0300] 总体而言,上文示出的转化提供了用于使用廉价且安全的起始材料制备普瑞巴林的短路径。

[0301] 在可选择的实施方式中,二氢呋喃酮(I)从3-亚异丁基-2-氧代戊二酸(XII)制备,所述(XII)由异丁醛与2-氧代戊二酸(α-酮戊二酸)(XIV)的缩合容易地获得。



[0303] 二酸(XII)至二氢呋喃酮(I)的转化需要脱羧步骤和还原步骤。这两个处理步骤可以分开进行,在这种情况下脱羧步骤或还原步骤可以是第一步骤,或者这两个过程可同时进行。当还原步骤首先进行时,将产生中间体(XV)。当脱羧步骤首先进行时,将产生中间体(XVI)。

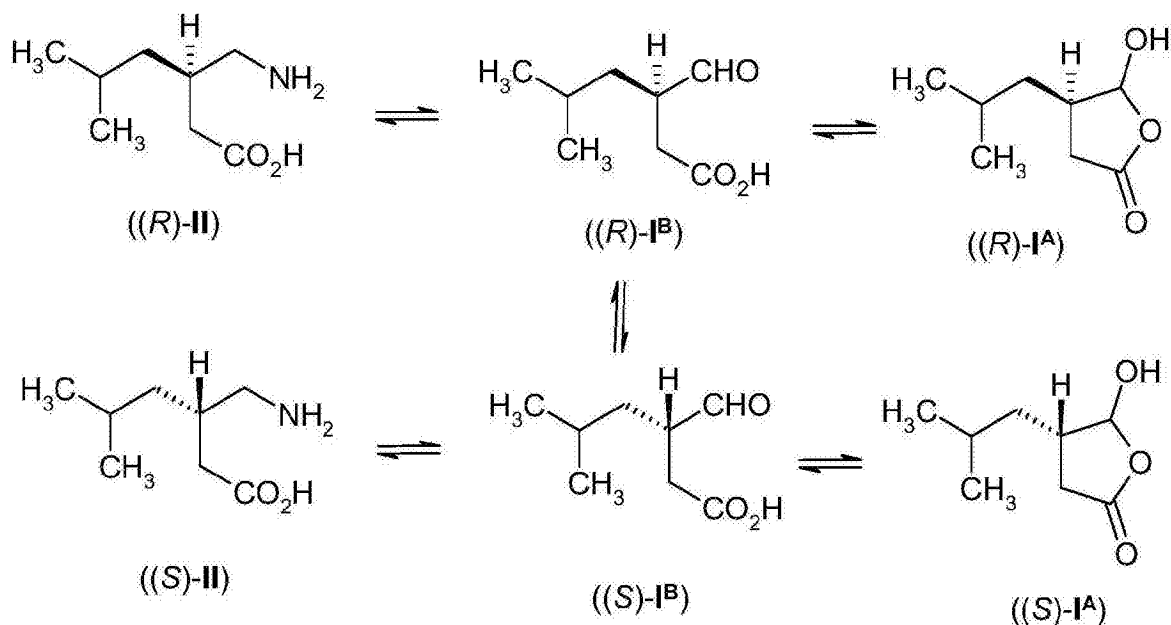


[0305] 还原步骤可化学地进行,例如通过氢化,但优选使用酶介导的还原例如通过用烯酮还原酶处理来实现。脱羧步骤优选通过用脱羧酶处理化合物来进行。

[0306] 当实施酶介导的转化时,所述酶可以是分离的酶,包括固定在载体上的酶,其可以是部分分离的酶制剂例如细胞匀浆,或者其可以是非分离的酶,在该情况下使用全细胞制备物。细胞可包括天然表达所需的酶的细胞和已被操纵以便表达所需的酶的细胞。

[0307] 式(I^A)的化合物的酶介导的还原性胺化是可逆的,因此用转氨酶或胺氧化酶/亚胺还原酶对3-氨基-5-甲基己酸(II)的处理可导致形成二氢呋喃酮(I^A)。该化合物的开环异构体是化合物(I^B),其是可差向异构化的。鉴于此,可能的是使用这样的酶将(R)-II)转化为(S)-II)或者增加(R)-II)和(S)-II)的混合物的光学纯度。

[0308]



实施例

[0309] 本发明通过其中使用下列缩写和定义的下列非限制性实施例举例说明：

- | | | |
|--------|--------------------|----------|
| [0310] | bp | 沸点 |
| [0311] | CPME | 环戊基甲醚 |
| [0312] | d | 双峰 |
| [0313] | DIW | 去离子水 |
| [0314] | dd | 双二重峰 |
| [0315] | eq or eq. | 当量 |
| [0316] | e.e.or ee | 对映体过量 |
| [0317] | ES ⁺ | 正模式电喷雾电离 |
| [0318] | EtOAc | 乙酸乙酯 |
| [0319] | EtOH | 乙醇 |
| [0320] | GC | 气相色谱 |
| [0321] | GC/MS | 气相色谱/质谱 |
| [0322] | HOAc | 乙酸 |
| [0323] | HPLC | 高效液相色谱法 |
| [0324] | Hr或h | 小时 |
| [0325] | ¹ H NMR | 质子核磁共振波谱 |
| [0326] | L | 升 |
| [0327] | LCMS | 液相色谱/质谱 |
| [0328] | M | 多重峰 |
| [0329] | mbar | 毫巴 |
| [0330] | MeOH | 甲醇 |
| [0331] | min | 分钟 |

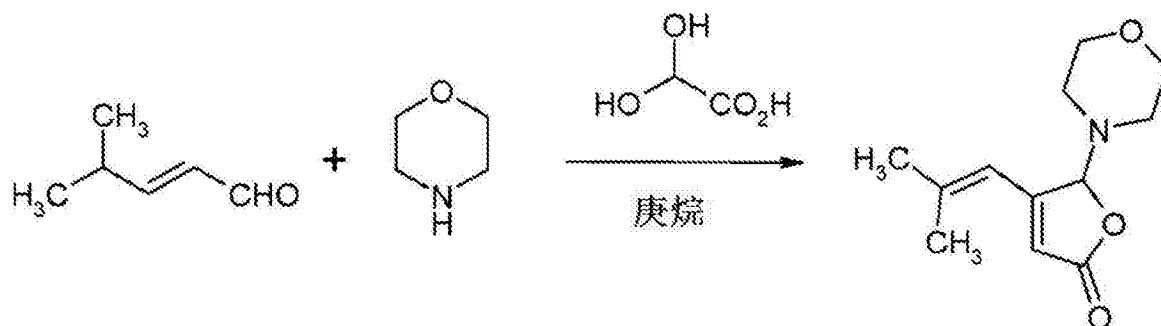
[0332]	mL	毫升
[0333]	mmol	毫摩尔
[0334]	mol	摩尔
[0335]	Mp	熔点
[0336]	MTBE	甲基叔丁基醚
[0337]	NAD ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(氧化的)
[0338]	NADP ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化的)
[0339]	NADH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(还原的)
[0340]	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原的)
[0341]	PLP	磷酸吡哆醛
[0342]	ppm	百万分率
[0343]	pTsOH	对甲苯磺酸
[0344]	q	四重峰
[0345]	qNMR	定量核磁共振波谱
[0346]	R _f	滞留因子
[0347]	RT	室温
[0348]	s	单峰
[0349]	t	三重峰
[0350]	ThDP	二磷酸硫胺
[0351]	TLC	薄层色谱
[0352]	TsOH	甲苯磺酸(=pTsOH)
[0353]	UPLC	超高效液相色谱
[0354]	XRD	X射线衍射结晶学
[0355]	δ	化学位移

[0356] 原样使用商业化学品,除非另有说明。薄层色谱在预涂覆塑料板(Merck硅石 60F254)上进行,并使用UV光和KMnO₄浸渍显影。质子(¹H)和碳(¹³C) NMR光谱在Varian INOVA 300MHz光谱仪上记录。化学位移相对于四甲基硅烷引述并视情况而定参照残留溶剂峰。除非另外指出,否则使用Agilent 1200HPLC系统进行手性HPLC分析,并使用Chemstation软件处理数据,或用Varian半制备/分析性HPLC使用Galaxie软件进行。

[0357] 实施例1

[0358] 从4-甲基-2-戊烯醛制备4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-5H-2-呋喃酮

[0359]



[0360] 将乙醛酸 (29.6g, 0.2mol) 在水中的50%溶液加入到已被预冷却至0-10℃的吗啉 (17.8g, 0.2mol) 和庚烷 (75mL) 的二相搅拌混合物中。保持温度低于10℃。将混合物升温至20℃并加入4-甲基-2-戊烯醛 (19.6g, 0.2mol)。将混合物在45℃搅拌20h。形成了大量固体。在环境温度下加入水 (100mL), 并将混合物搅拌2h。用环戊基甲醚 (100mL) 萃取混合物, 用水 (100mL) 洗涤有机溶液两次, 并浓缩以留下30.4g的粗产物。将该固体通过从甲醇 (100mL) 重结晶来纯化以提供17.7g (40%) 纯的4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-5H-2-呋喃酮。

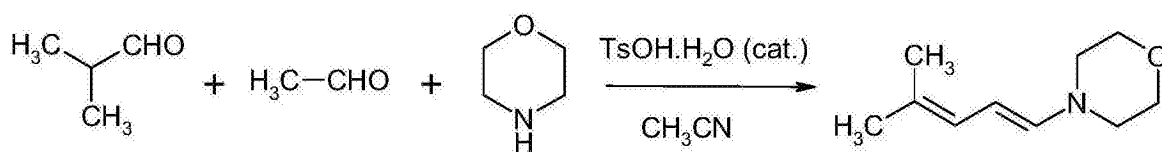
[0361] GC/MS: m/z = 223

[0362] ^1H NMR: δ 6.0 (s, 1H); 5.9 (s, 1H); 5.5 (s, 1H), 3.7 (d, 4H), 2.7 (d, 4H), 2.00 (s, 3H), 1.95 (s, 3H)。

[0363] 实施例2

[0364] 4-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)吗啉的制备

[0365]



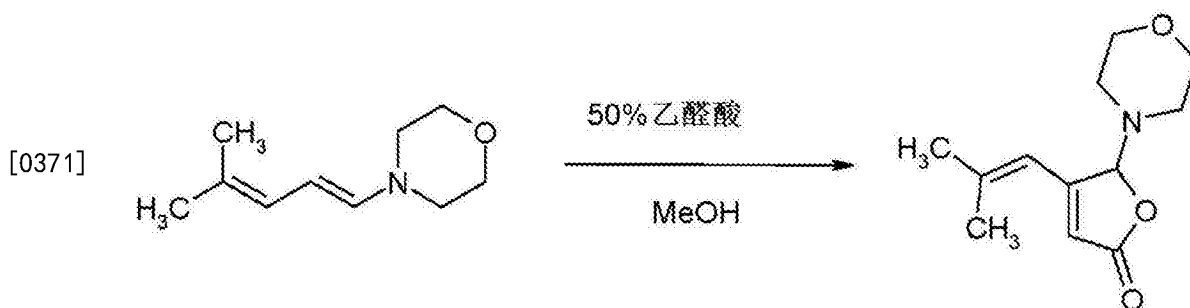
[0366] 将异丁醛 (46.90g, 0.65mol, 1.43eq.) 在乙腈 (300mL) 中搅拌。将吗啉 (56.63g, 0.65mol, 1.43eq.) 随后pTsOH (8.63g, 0.1当量) 在室温下缓慢加入至异丁醛溶液。将乙腈 (100mL) 中乙醛 (20g, 0.454mol) 的溶液于1h内在监控在50℃的内部温度下逐滴加入。完成添加后, 将混合物在50℃搅拌30min, 然后冷却至室温, 随后在真空中蒸发溶剂以产生橙色油状物 (123.3g)。通过定量NMR使用苯甲酸苄酯作为内标对粗产物的含量测定为40%, 这给出了所需二烯胺的65%的产率。

[0367] GC/MS: m/z = 167

[0368] ^1H NMR: δ 6.01 (d, 1H); 5.69 (d, 1H); 5.31 (dd, 1H), 3.70 (m, 4H), 2.89 (m, 4H), 1.71 (s, 3H), 1.63 (s, 3H)。

[0369] 实施例3

[0370] 从粗4-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)吗啉制备4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-5H-2-呋喃酮



[0372] 将实施例2的粗4-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)吗啉二烯胺 (123.3g, 40% 含量测定) 在室温下溶解在甲醇 (300mL) 中。完全溶解后, 加入乙醛酸 (50wt%, 60g, 1.1eq), 并在50℃下将所得的二相混合物搅拌18h。将反应混合物冷却到室温, 并通过旋转蒸发除去溶剂。将残留物分隔在乙酸乙酯 (200mL) 和饱和碳酸钠溶液 (200mL) 之间。将水相用乙酸乙酯 (100mL) 萃取并用盐水洗涤合并的有机物并蒸发至稠油状物, 将其静置固化 (89.0g, 由qNMR

含量测定67%,60%产率)。

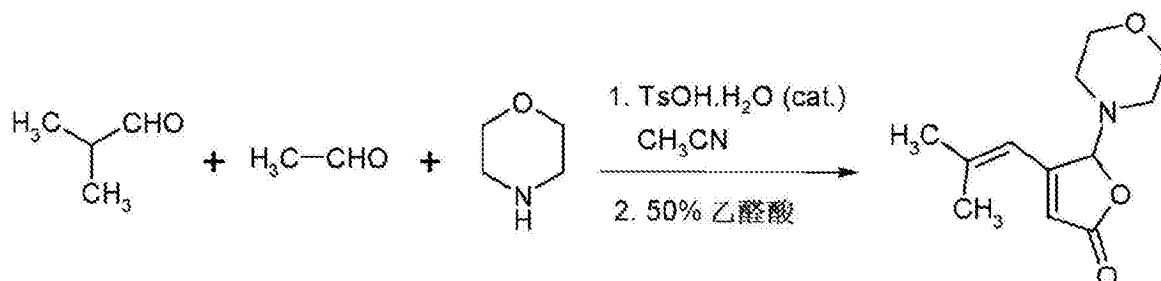
[0373] GC/MS:m/z=223

[0374] NMR:如实施例1。

[0375] 实施例4

[0376] 从异丁醛和乙醛在一锅中制备4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-5H-2-呋喃酮。

[0377]

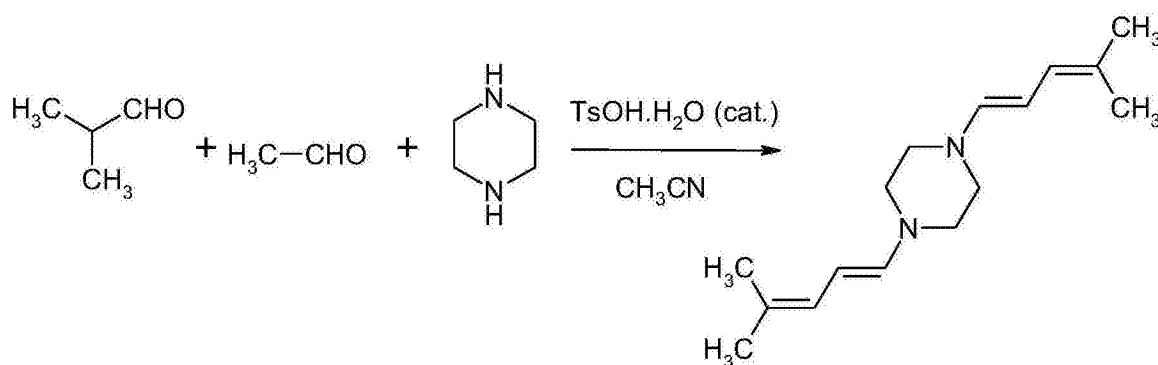


[0378] 将异丁醛(102.90g,1.43mol)在乙腈(600mL)中搅拌。将吗啉(124.3g,1.43mol)随后pTsOH(19.0g,0.1当量)在室温下缓慢加入至异丁醛溶液。将在乙腈(150mL)中乙醛(44.05g,1.0mol)的溶液于1hr内在监控在50℃的内部温度下逐滴加入。完成添加后,将混合物在50℃搅拌30min,然后冷却至<10℃。加入乙醛酸(50wt%,211.3g,1.43mol),并在50℃下将所得的二相混合物搅拌18h。将反应混合物冷却到室温,并通过旋转蒸发除去溶剂。将残留物分隔在乙酸乙酯(1L)和饱和碳酸钠溶液(1L)之间。将水相用乙酸乙酯萃取并用盐水洗涤合并的有机物并蒸发至稠油状物,将其静置固化(166g)。在室温下用MTBE研磨粗产物。将产物通过过滤收集并用MTBE洗涤以产生与实施例1中制备的材料相同的纯的4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-5H-2-呋喃酮(84g,37%产率)。粗固体(166g)的分析表明约50%产率。

[0379] 实施例5

[0380] 1,4-双-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)哌嗪的制备

[0381]



[0382] 制备哌嗪(43.0g,0.5mol)和4-甲苯磺酸一水合物(4.4g,0.023mol)在乙腈(600mL)中的溶液。将该溶液加热至50℃并在10min内加入异丁醛(100mL,1.10mol)。该溶液在颜色上变为橙红色并且出现瞬态白色沉淀。随后通过注射泵在3h内于50℃下加入乙醛(30.8g,0.70mol)在乙腈(30mL)中的溶液。将形成的悬浮液在50℃下搅拌0.5h。除去溶剂,并将残余的固体在-5℃下从甲醇(500ml)分离出。将其过滤并用冷甲醇洗涤并干燥以提供52.9g(60%)的1,4-二-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)哌嗪。

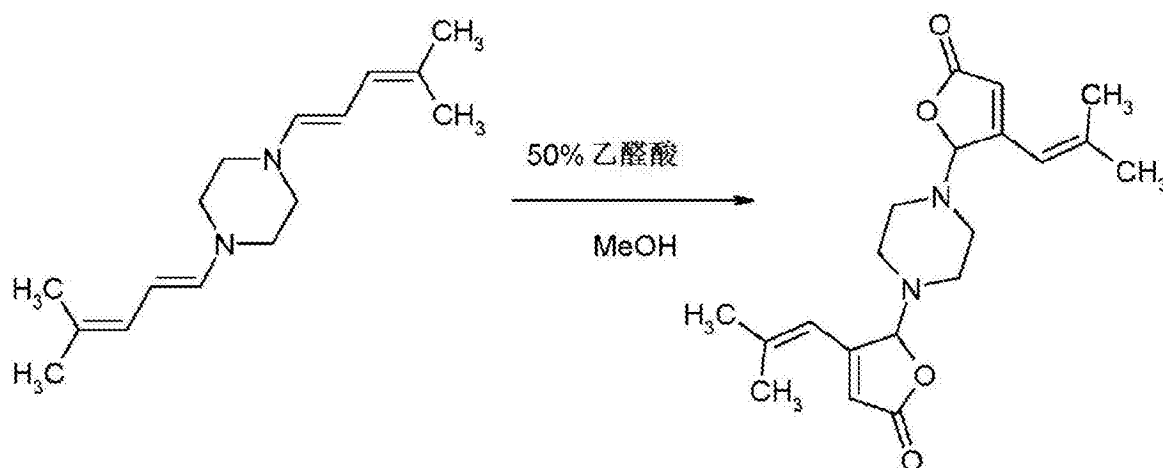
[0383] GC/MS:m/z=246.

[0384] ^1H NMR: δ 6.00 (d, 2H); 5.70 (d, 2H); 5.28 (dd, 2H); 2.92 (s, 8H); 1.73 (s, 6H); 1.68 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 140.6 (C), 126.3 (CH), 123.4 (CH), 100.2 (CH), 48.2 (CH_2), 25.8 (CH_3), 18.1 (CH_3).

[0385] 实施例6

[0386] 从1,4-双-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)哌嗪制备5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮)。

[0387]



[0388] 将1,4-双-(4-甲基-1,3-戊二烯-1-基)哌嗪 (37.3g, 0.151mol; 参见实施例5) 加入到甲醇 (300ml) 中。将温度调节至34℃, 并迅速 (在5min内) 加入乙醛酸 (44.9g, 0.302mol) 在水中的50%溶液。将所得悬浮液在45℃下搅拌15h; 冷却至0-10℃进行2h, 并过滤。该固体用甲醇 (100mL) 洗涤并干燥以提供纯的5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮) (32.3g, 60%)。可以从母液通过浓缩获得额外的5%。

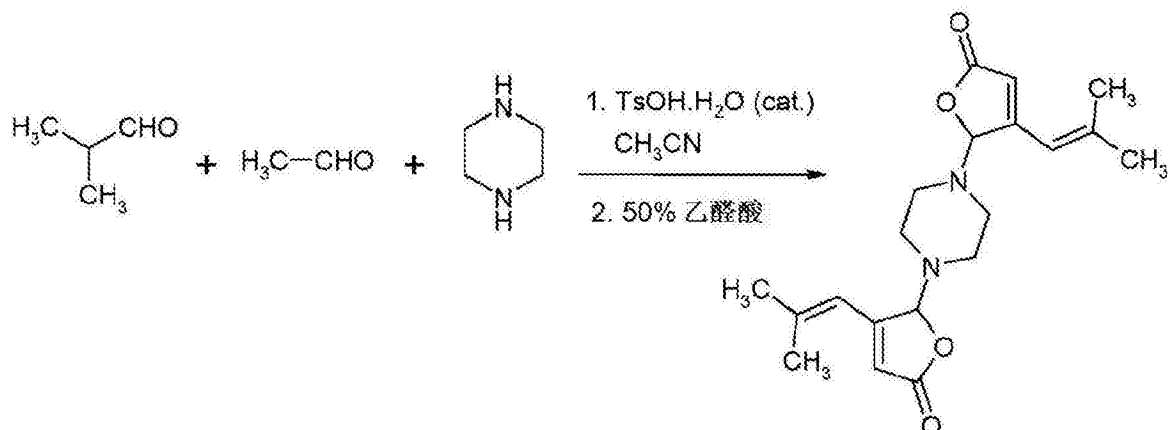
[0389] ^1H NMR: δ 5.96 (d, 2H), 5.87 (d, 2H), 5.56 (m, 2H), 2.71 (s, 8H), 2.07-1.90 (m, 12H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.3 (C), 159.2 (C), 150.9 (C), 116.6 (CH), 115.4 (CH), 99.2 (CH), 46.7 (CH_2), 28.2 (CH_3), 21.4 (CH_3).

[0390] 此反应还可在异丙醇、乙腈-水、甲苯-水或在庚烷水中以类似的产量进行。

[0391] 实施例7

[0392] 从异丁醛和乙醛在一锅中制备5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮)。

[0393]



[0394] 将对甲苯磺酸 (6.5g, 0.03mol) 加入到哌嗪 (59g, 0.69mol) 在乙腈 (240mL) 中的溶液中。将反应加热至 50℃ 并搅拌直至观察到固体溶解, 随后加入异丁醛 (138mL, 1.51mol)。在将乙醛 (60mL, 1.07mol) 在乙腈 (30mL) 中的溶液通过注射泵在 3h 内加入到容器之前, 将反应物保持在 50℃。完成添加后, 将反应搅拌另外 30 分钟随后将乙醛酸 (148g, 1.0mol) 在水中的 50% w/w 溶液在 5min 内添加到反应混合物中, 接着加入水 (50mL)。然后将反应加热至 70℃ 进行 2h, 然后至 50℃ 过夜。然后将反应冷却至 5℃, 并保持 30 分钟。沉淀 5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2(5H)-酮) 并通过过滤分离, 并用乙腈 (2×100mL) 洗涤以产生所需产物 (126g, 93.5% 含量测定, 从乙醛 66% 的产率)。

[0395] 实施例 8

[0396] 5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2(5H)-酮) 的无溶剂制备

[0397] 将异丁醛 (79g, 100mL, 1.1mol) 加入到 3 颈圆底烧瓶中, 将氩气通过该系统进行冲洗。将哌嗪 (43g, 0.5mol) 和 TsOH-H₂O (4.4g; 0.023mol) 分成含有哌嗪 (10.75g) 和 TsOH-H₂O (1.1g) 的 4 等份。第一部分哌嗪 (10.75g) 的加入导致从 24℃ 至 35℃ 的放热。随后加入第一部分 TsOH (1.1g)。将反应物搅拌, 直至所有哌嗪溶解 (t = 35℃), 在此之后加入第二部分哌嗪 (10.75g), 随后加入 TsOH (1.1g) (t = 41℃)。继续搅拌, 直到所有哌嗪溶解 (t = 41℃), 接着加入第三部分哌嗪 (10.75g), 随后加入 TsOH (1.1g)。在第 3 次加入后产生澄清的溶液, 随后加入第四部分哌嗪 (10.75g) 和 TsOH-H₂O, 然后加入 TsOH (1.1g) (t = 52℃)。完成添加后将反应物在 50℃ 下搅拌 30min。

[0398] 另一烧瓶 (50mL) 中, 加入乙醛 (30.8g, 39mL, 0.7mol), 并置于冰水浴 (0-2℃) 中。将乙醛烧瓶经由隔片通过套管连接至 3 颈烧瓶。随后使氩气流以确保乙醛的加入在 3h 内完成的速率通过乙醛烧瓶。在加入所有的乙醛后, 将反应物在 50℃ 下搅拌 30min, 然后冷却至 40℃ 并以保持温度低于 50℃ 的速度在 45min 内滴加 50% 乙醛酸 (104g, 78mL)。然后加入水 (100mL), 并将反应物加热在 70℃ 进行 5h。将反应物在冰-水浴中冷却至 4℃。将沉淀的产物过滤并用冷水 (100mL) 洗涤滤饼。在 50℃ 下在真空中干燥后获得 88.9g (71%) 的所需产物。沉淀物含有 78.5% 的标题化合物 (HPLC 测定)。

[0399] 实施例 9

[0400] 5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2(5H)-酮) 通过同时加入两种醛的替代制备

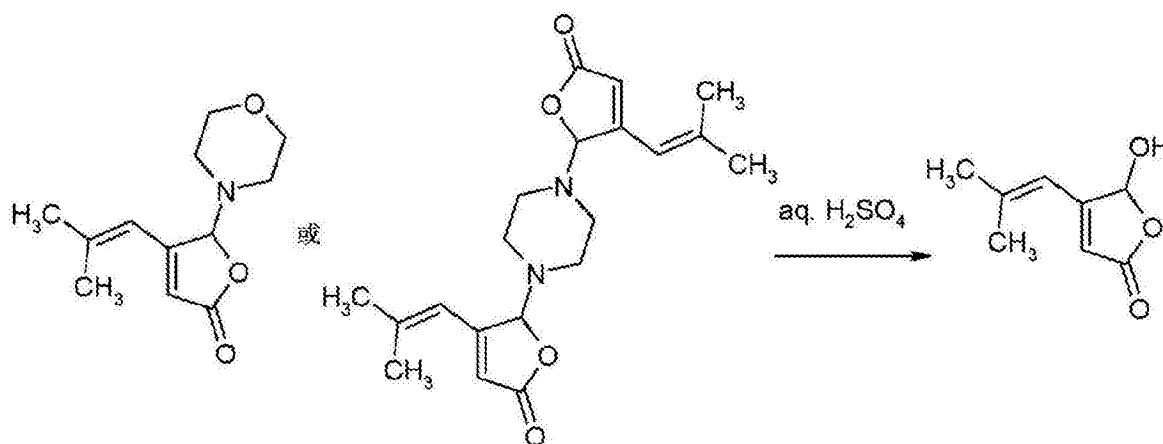
[0401] 将哌嗪 (236.6g) 加入到装有温度计、加料漏斗 (100mL) 和回流冷凝器的干净3L干容器中。将pTsOH (25.3g) 加入到容器中,接着加入乙腈 (550mL)。开启搅拌器并将该容器用氮气惰化。将异丁醛 (150mL, 总装料的27%) 加入到搅拌的哌嗪/pTsOH浆液并观察到温度上升至约43℃。然后将白色悬浮液加热至50℃ (+/-5℃)。将异丁醛 (400mL, 总装料的73%) 和冰冷乙醛 (260mL) 的预混合冰冷溶液加入干净的干燥1L容器中,使该混合物保持在冰浴中。将异丁醛/乙醛混合物以100mL等分试样在50℃下于5-6h内加入到3L容器的内容物中。在加入乙醛期间反应烧瓶的内容物从白色悬浮液改变为酒红色溶液,最后为橙色悬浮液。完成添加后,将悬浮液在50℃下搅拌,进行约0.5至1.0h。

[0402] 将乙醛酸 (50%wt/wt) 水溶液在10-15min内加入到该悬浮液中,温度上升至约75℃。观察到5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双 (4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮) 从溶液结晶。在70℃ (+/-5℃) 下搅拌悬浮液6h,然后在搅拌下冷却至环境温度。然后将该批料冷却至-5至0℃下进行并保持3-4h,随后将悬浮液过滤,用冷甲醇洗涤 (1×500mL) 滤饼,然后用2×500mL的甲醇在环境温度下洗涤。洗涤后的产物在真空干燥箱中在40-50℃下干燥至恒重,得到474g的98%纯的5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双 (4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮) (70%)。

[0403] 实施例10

[0404] 从4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-2 (5H) 呋喃酮或5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双 (4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮) 制备5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮。

[0405]



[0406] 将10%w/w硫酸水溶液 (110g) 加入到4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-2 (5H)-呋喃酮 (20.0g, 0.896mol), 并以回流搅拌该混合物4h或直到TLC (100:3CPME:HOAc) 表明反应完成。混合物在任何时候维持悬浮。然后将其冷却到5℃, 保持2h, 并过滤。用水洗涤白色固体, 并干燥以提供5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮 (12.9g, 93%)。

[0407] 可选择地, 将硫酸 (412g) 的10%w/w水溶液加入到含有5,5'-(哌嗪-1,4-二基) 双 (4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2 (5H)-酮) (60g, 0.167mol) 的容器中。将内容物搅拌, 然后加热以回流。将反应保持在回流下直到起始物质被耗尽, 这由溶解测定。在反应完成后, 将该批料冷却到35℃, 此时靶化合物开始结晶。该浆液进一步被冷却至0-5℃, 然后转移至过滤器。将产物过滤, 用水 (2×100mL) 洗涤, 随后在<50℃下真空干燥, 得到5-羟基-4-(2-甲基

丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮(42.0g,81%)。

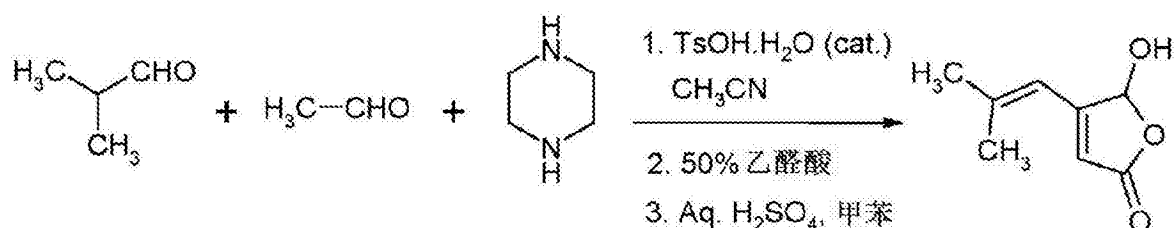
[0408] GC/MS:m/z=154

[0409] ^1H NMR (CDCl_3): δ 6.10 (s, 1H); 5.92 (s, 1H); 5.88 (s, 1H); 5.35 (bs, 1H, O-H); 1.98 (s, 3H); 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.8 (C), 161.4 (C), 152.3 (C), 115.3 (CH), 114.9 (CH), 99.5 (CH), 28.2 (CH_3), 21.4 (CH_3)。

[0410] 实施例11

[0411] 从异丁醛和乙醛以一锅制备5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮。

[0412]

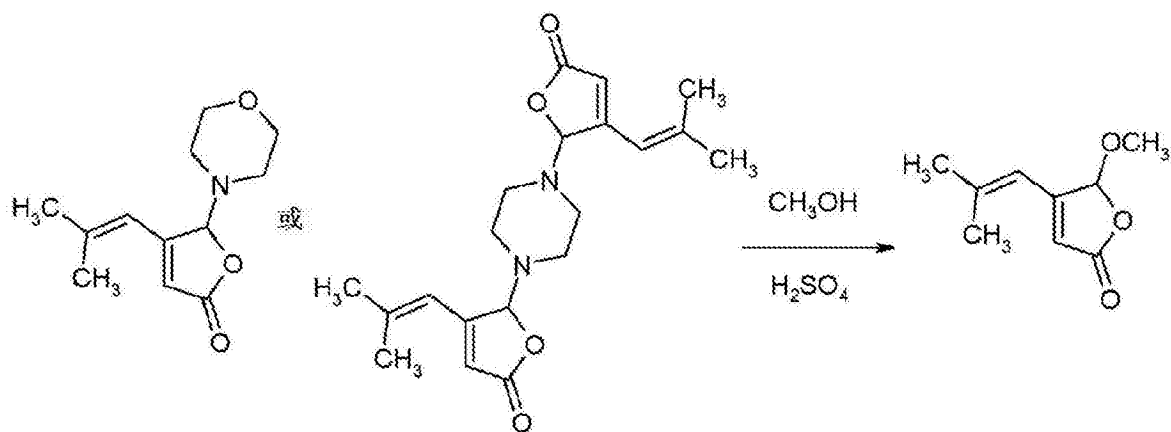


[0413] 将哌嗪(43.0g,0.5mol)和异丁醛(200mL)的混合物在Dean-Stark下回流直至收集理论量的水(18ml)。将过量的异丁醛溜出以留下1,4-双(2-甲基丙烯-1-基)哌嗪的结晶块。将其溶解于乙腈(1.2L)并加入额外的异丁醛(100mL,1.0mol)。加入额外的哌嗪(4.4g),接着加入p-甲苯磺酸(4.4g,23.2mmol)。将温度调节到40℃并在4h内加入乙醛(44g,1.0mol)在乙腈(40ml)中的溶液。将反应混合物在40℃下1h和在环境温度下搅拌4h。将乙腈溜出,并将残余物悬浮于甲苯(400mL)。在0.5h内加入50%乙醛酸(148g)和水(150ml)的混合物。然后将混合物在45℃下搅拌15h。产生了固体沉淀。加入稀硫酸(10%,1L),并使混合物回流3h。产生二相混合物。分离甲苯相。其含有通过分析约50%产率(基于乙醛)的5-羟基-4-(2-甲基丙烯-1-基)-2-呋喃酮。

[0414] 实施例12

[0415] 5-甲氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮的制备

[0416]



[0417] 将4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-2-(5H)-呋喃酮(7.70g,34.5mmol)用 H_2SO_4 (4mL,2.2eq.)在MeOH(50mL)中以回流搅拌3h直至起始材料消失(通过GC)。将反应混合物冷却到室温。然后将溶剂真空蒸发并将残余物用EtOAc(50mL)稀释。用 H_2O (3×50mL)洗涤有机相。然后真空蒸发溶剂,得到为橙色油状物(5.50g,95%)的5-甲氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮,其可无需纯化地使用。

[0418] 可选择地,将5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮)(130g,363mmol)和MeOH(690mL)在机械搅拌下加入2L圆底烧瓶以形成悬浮液。于20-25℃在搅拌下滴加浓H₂SO₄(43mL,762mmol),观察到轻微放热,存在的固体的性质从分散和容易混合改变成较稠的浆体。使反应混合物回流5h。在0.5h后观察到完全溶解(橙色液体)。5h后LCMS显示~99%的所需产物。将混合物冷却至室温,静置于哌嗪硫酸盐的结晶。过滤沉积物,用冰冷的MeOH(400mL)洗涤滤饼。将滤液真空浓缩(40℃浴温),将残余物分隔在水(50mL)和MTBE(300mL)之间。分离水层并另外萃取(2x300mL的MTBE)。合并的有机萃取物用饱和的aq. NaHCO₃(200mL)洗涤。MTBE层在搅拌下于Na₂SO₄上干燥1.5h,过滤并蒸发,得到为橙色油状物(120g,98%)的5-甲氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮。

[0419] 在0.2-0.3mbar真空下以bp 100-105℃蒸馏。GC/MS:m/z=168;¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.59(1H,s) 5.88-5.86(1H,m) 5.75(1H,d,J=0.6) 3.53(3H,s) 2.01-2.00(3H,m) 1.97-1.96(3H,m)。¹³C NMR(CDCl₃):171.4(C),159.2(C),151.9(C),115.8(CH),115.2(CH),104.4(CH),56.1(CH₃),28.2(CH₃),21.4(CH₃)。

[0420] 下列化合物由4-(2-甲基-1-丙烯基)-5-吗啉代-2(5H)-呋喃酮根据上述方法的第一种通过用3-甲基丁醇(异戊醇)、n-戊醇(戊基醇)或n-丁醇替换甲醇来制备:

[0421] 实施例12A

[0422] 5-(3-甲基丁氧基)-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮

[0423] 在0.4mbar真空下以bp 139-140℃蒸馏;GC/MS:m/z=224;¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ5.94(1H,s) 5.87-5.84(1H,m) 5.80(1H,s) 3.86-3.80(1H,m) 3.70-3.64(1H,m) 2.00(3H,s) 1.96(3H,s) 1.77-1.66(1H,m) 1.57-1.50(2H,m) 0.93-0.91(3H,m) 0.91-0.89(3H,m)

[0424] 实施例12B

[0425] 4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)-5-戊氧基呋喃-2(5H)-酮

[0426] 在0.08mbar真空下以bp 123-134℃蒸馏;GC/MS:m/z=224;¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ5.94(s,1H);5.86(s,1H);5.80(s,1H);3.84-3.75(m,1H);3.68-3.59(m,1H);2.01(s,3H);1.95(s,3H);1.69-1.59(m,2H);1.38-1.29(m,4H);0.95-0.85(m,3H)

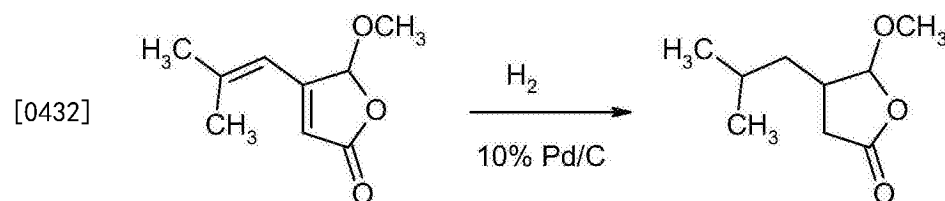
[0427] 实施例12C

[0428] 5-丁氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮

[0429] 在0.05mbar真空下以bp 136-146℃蒸馏;GC/MS:m/z=210;¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ5.94(s,1H);5.86(s,1H);5.80(s,1H);3.85-3.76(m,1H);3.69-3.60(m,1H);2.00(s,3H);1.95(s,3H);1.68-1.58(m,2H);1.45-1.32(m,2H);0.93(t,3H,J=7.4Hz)

[0430] 实施例13

[0431] 5-甲氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮的制备



[0433] 将5-甲氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮(100g,参见实施例12)在MTBE(700mL)中的溶液、5g(5wt%)的10%Pd/C加入到氢化容器中。导入1atm的氢气并在反

应过程中保持压力恒定。在20℃下7h后,将反应物通过硅藻土垫($\phi 60\text{mm}$, $H=30\text{mm}$)过滤并用MTBE ($3\times 50\text{mL}$) 冲洗。将滤液用1M NaHCO_3 溶液(200mL)、水、盐水洗涤,并在 Na_2SO_4 上干燥。除去溶剂后,获得5-甲氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮为无色液体(98g, 96%)。

[0434] GC/MS: $m/z=172$

[0435] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.25 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 0.53H, 主要异构体), 5.04 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 0.26H, 次要异构体), 3.48 (s, 0.92H, 次要异构体), 3.46 (s, 1.66H, 主要异构体), 2.78 (dd, $J=17.7, 8.6\text{Hz}$, 0.33H), 2.59-2.42 (m, 1.27H, 主要异构体), 2.42-2.34 (m, 0.33H, 次要异构体), 2.29 (dd, $J=16.7, 11.8\text{Hz}$, 0.63H, 主要异构体), 2.15 (dd, $J=17.7, 4.6\text{Hz}$, 0.33H, 次要异构体), 1.67-1.31 (m, 2.63H两种异构体), 1.28-1.19 (m, 0.33H, 次要异构体), 0.95-0.86 (m, 6H两种异构体)。 ^{13}C NMR (CDCl_3): 177.7 (C, 主要异构体), 176.04 (C, 次要异构体), 110.1 (CH, 次要异构体), 106.1 (CH, 主要异构体), 57.0 (CH_3 , 次要异构体), 56.6 (CH_3 , 主要异构体), 41.2 (CH_2 , 次要异构体), 39.1 (CH_2 , 次要异构体), 38.3 (CH_2 , 主要异构体), 37.1 (CH_2 , 主要异构体), 33.9 (CH, 次要异构体), 32.8 (CH, 主要异构体), 26.0 (CH, 主要异构体), 25.8 (CH, 次要异构体), 23.0 (CH_3 , 主要异构体), 22.9 (次要异构体), 22.7 (主要异构体), 22.6 (次要异构体)。

[0436] 通过使用相同的一般性方法和分别从实施例12A、12B和12C的化合物起始,还获得了下列化合物:

[0437] 实施例13A

[0438] 5-(3-甲基丁氧基)-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮

[0439] GC/MS: $m/z=228$; ^1H -NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.35 (0.86H, d, $J=5.0\text{Hz}$) 5.13 (0.14H, d, $J=2.7\text{Hz}$) 3.87-3.79 (m, 1H) 3.57-3.45 (m, 1H) 2.58-2.37 (2H, m) 2.35-2.27 (0.79H, m) 2.20-2.11 (0.21H, m) 1.74-1.62 (1H, m) 1.61-1.44 (4H, m) 1.42-1.31 (1H, m) 0.95-0.86 (12H, m)

[0440] 实施例13B

[0441] 4-(2-甲基丙基)-5-戊氧基二氢呋喃-2(3H)-酮

[0442] GC/MS: $m/z=228$; ^1H -NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.35 (0.77H, d, $J=5.0\text{Hz}$) 5.13 (0.23H, d, $J=2.6\text{Hz}$,) 3.83-3.75 (1H, m) 3.55-3.40 (1H, m) 2.59-2.37 (2H, m) 2.32 (0.73H, dd, $J=16.6, 11.8\text{Hz}$) 2.15 (0.27H, dd, $J=17.7, 5.0\text{Hz}$) 1.67-1.45 (4H, m) 1.41-1.25 (5H, m) 0.96-0.86 (9H, m)

[0443] 实施例13C

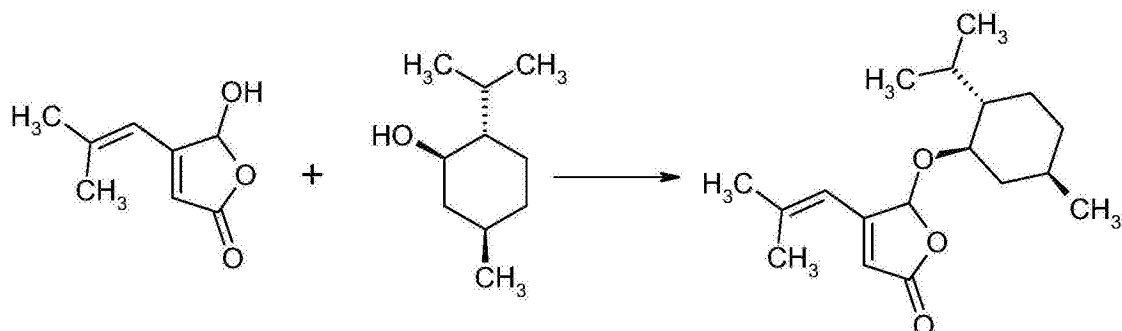
[0444] 5-丁氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮

[0445] GC/MS: $m/z=214$; ^1H -NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.35 (0.8H, d, $J=5.0\text{Hz}$) 5.13 (0.2H, d, $J=2.6\text{Hz}$,) 3.85-3.75 (1H, m) 3.56-3.41 (1H, m) 2.59-2.38 (2H, m) 2.31 (0.76H, dd, $J=16.5, 11.7\text{Hz}$) 2.15 (0.24H, dd, $J=17.6, 5.0\text{Hz}$) 1.66-1.45 (4H, m) 1.43-1.30 (3H, m) 0.95-0.87 (9H, m)

[0446] 实施例14

[0447] 5-(L-孟氧基)-4-(2-甲基-1-丙烯基)-2(5H)-呋喃酮的制备和氢化

[0448]

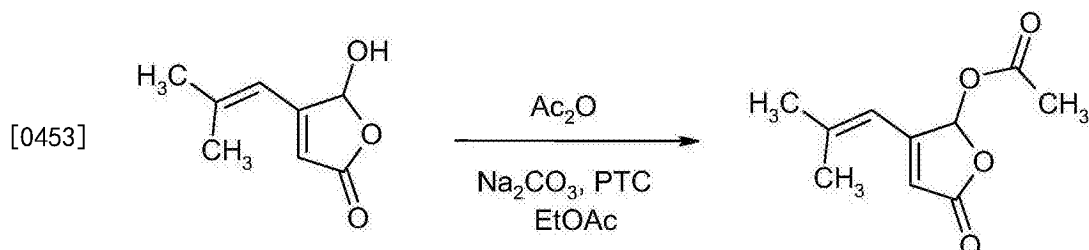


[0449] 将5-羟基-4-(2-甲基-1-丙烯基)-2-呋喃酮(59.5g,0.386mol)、L-薄荷醇(89.5g,1.5当量)和甲磺酸(1.5g)的混合物在70-80℃于真空下(以除去水)搅拌100h。液体物料倾倒(热)于乙腈(450mL)中,并通过冷却、过滤和洗涤分离标题化合物。产率为76.2g(67%)。对于XRD合适的结晶通过丙酮溶液的缓慢蒸发生长。在缩醛碳上的构型为(R)。

[0450] 5-(L-孟氧基)-4-(2-甲基-1-丙烯基)-2-呋喃酮在乙酸乙酯中使用实施例13的条件的氢化产生定量产率的饱和衍生物。通过¹H NMR,该化合物是非对映体的1:1混合物。

[0451] 实施例15

[0452] 5-乙酰氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮的制备

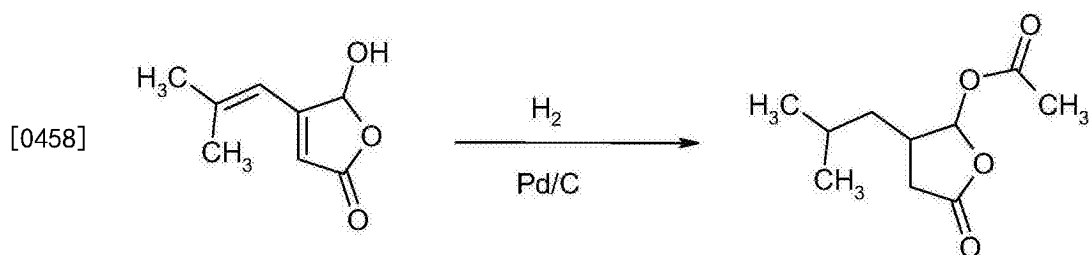


[0454] 将5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮(19g,0.123mol)在乙酸乙酯(100mL)中的悬浮液用固体碳酸钠(13.1g,0.123mol)和四丁基硫酸氢铵(0.5g)处理。一次性加入乙酸酐(18.8g,1.5eq.)。接着发生了温和的放热反应。将混合物搅拌过夜,加入水(100mL),并将有机相分离(水相的pH为6.0)。将乙酸乙酯相用水洗涤并浓缩以留下固体(24.6g,100%)。这通过TLC(100:3CPME:乙酸)纯化。如果该反应在乙酸异丙酯中进行,纯化化合物可通过在水洗涤后冷却乙酸异丙酯溶液中以约70%的产率进行分离。

[0455] m/z:196

[0456] 实施例16

[0457] 5-乙酰氧基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮的氢化

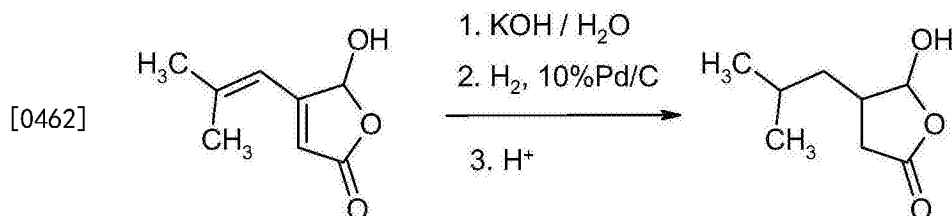


[0459] 实施例34的材料在与实施例13中所概述的相同的条件下氢化以产生>90%产率的5-乙酰氧基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-2(5H)-呋喃酮作为非对映体的1:1混合物。该产物

伴随有约5%的4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢呋喃-2(5H)-酮。该产物可按实施例30进行水解以产生5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮/3-甲酰基-5-甲基己酸。

[0460] 实施例17

[0461] 通过5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮在碱性溶液中的氢化制备5-羟基-4-(2-甲基丙基)二氢呋喃-2(3H)-酮(I^A)



[0463] 将5-羟基-4-(2-甲基丙烯-1-基)-2-呋喃酮(3.35g, 21.7mmol)和水(20mL)加入到氢化器中。随后将氢氧化钾(1.21g, 1eq)加入到容器中,将内容物加热至40℃直到发生溶解。将10%Pd/碳催化剂(0.67g)加入到容器中,随后将反应器内容物在40℃和5barg氢压下氢化。反应完成后,将反应物冷却,并通过过滤除去催化剂。将pH通过加入36%盐酸调节至pH 2并用甲苯洗涤水层以萃取所需的产物。将合并的甲苯萃取物浓缩,得到标题化合物(3.17g, 92%)。

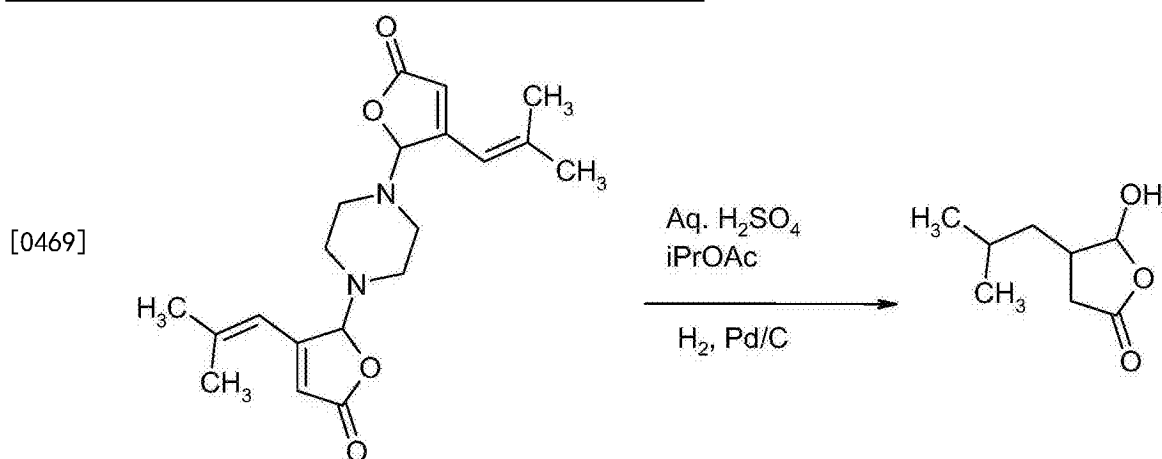
[0464] 实施例18

[0465] 5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮在中性溶液中的氢化

[0466] 将5-羟基-4-(2-甲基丙烯-1-基)-2-呋喃酮用10%w/w的Pd/C催化剂以每克起始材料6mL水进行氢化。(22h, 40℃, 10bar)。在过滤后,油相从水分离。这是5-羟基-4-(2-甲基丙基)二氢呋喃-2(3H)-酮(I^A)和4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2-酮的1:1混合物。化合物(I^A)可以容易地通过酸碱萃取来分离纯化。用2-丙醇在有机溶剂中重复此反应从而产生相对纯的(I^A)。

[0467] 实施例19

[0468] 从5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮)以一锅制备5-羟基-4-(2-甲基丙基)二氢呋喃-2(3H)-酮(I^A)



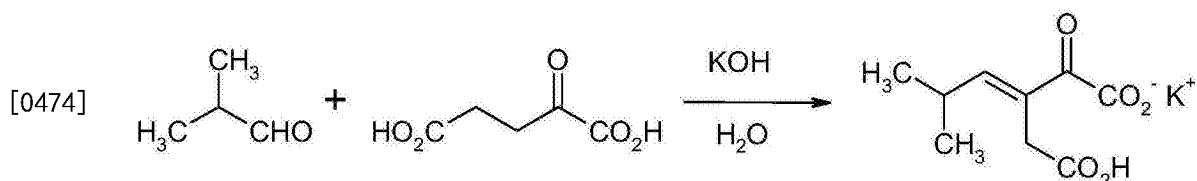
[0470] 将5,5'-(哌嗪-1,4-二基)双(4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮)(50.0g, 0.14mol)加入到含有硫酸(16.0g, 0.163mol)的水(300mL)中。加入乙酸异丙酯(200mL)。加入50%水湿润的5%钯碳(3.0g),并将该混合物在环境温度下氢化(5bar氢)15h。将反应混

合物从催化剂过滤,用乙酸异丙酯(300mL)洗涤-这也被用来洗净容器。将有机相分离,用水(100mL)洗涤并在旋转蒸发器上浓缩以提供38.8g的澄清油状物。这是所需的化合物(I^A)和过度还原内酯(4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2-酮)的混合物。其通过用碳酸钾水溶液萃取并用甲苯洗涤来容易地纯化。碳酸钾萃取物用甲酸酸化,得到所需产物(I^A)(25.6g,58%)。

[0471] ¹H NMR(添加了K₂CO₃的D₂O): δ9.5(1H), 2.8(m, 2H), 2.40(m, 2H), 1.55(m, 2H), 1.30(m, 2H), 0.95(m, 6H)。

[0472] 实施例20

[0473] 3-亚异丁基-2-氧代戊二酸单钾盐的制备。

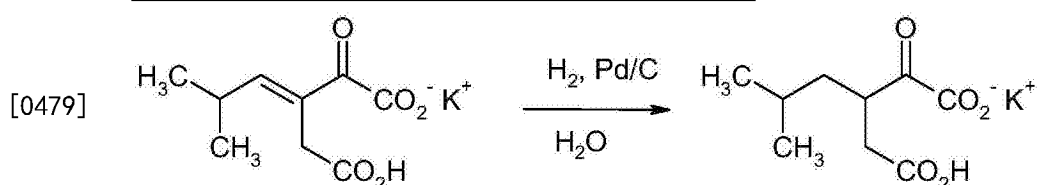


[0475] 向2L圆底瓶加入300g α-酮戊二酸和450mL冰水。在搅拌和冷却下将450mL水中的314g氢氧化钾加入,保持瓶温低于25℃。将反应器置于氮气下并在50hrs内0.2mL/min加入异丁醛。将所得的两相黄色溶液分离,并用100mL MTBE洗涤。将下层水相pH调节至3.2-3.4,并在真空65℃下浓缩至1/3体积。在冷却至<5℃后,收集所得的固体,并用若干小体积的水洗涤,干燥后得到230g含有60%的3-亚异丁基-2-氧代戊二酸单钾盐和剩余物KCl的白色固体。

[0476] ¹H NMR(于pH 8-10, 400MHz下的D₂O) δ6.4(d, 1H), 3.3(s, 2H), 2.7(m, 1H), 0.96(d, 6H)。 ¹³C NMR(于pH 8-10, 400MHz下的D₂O) δ23(2CH₃), 31(CH), 35(CH₂), 133(C), 164(CH), 170(C), 176(C), 182(C)。

[0477] 实施例21

[0478] 3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸单钾盐的制备



[0480] 将如实施例20中产生的3-亚异丁基-2-氧代戊二酸单钾盐的水溶液调节到pH 6-8,加入5%Pd/C,并将该溶液在10bar H₂25℃下氢化10小时。催化剂通过过滤除去,将溶液的pH调节至pH 3.8。将混合物冷却至<5℃,过滤并用少量的冷水洗涤。所得白色结晶在40℃进行真空干燥,得到标题化合物,286g,经2个步骤58%的产率。

[0481] ¹H NMR(于pH 8-10, 400MHz下的D₂O) δ3.5(m, 1H), 2.5(dd, 1H), 2.3(dd, 1H), 1.6-1.5(m, 2H), 1.3-1.2(m, 1H), 0.9(d, 6H)。 ¹³C NMR(于pH 8-10, 400MHz下的D₂O) δ21.7(CH₃), 22.2(CH₃), 25.5(CH), 38.4(CH₂), 39.3(CH₂), 43.4(CH), 167.8(C), 170.6(C), 180.7(C)。

[0482] 实施例22

[0483] 脱羧酶在大肠杆菌(E.coli)中的表达

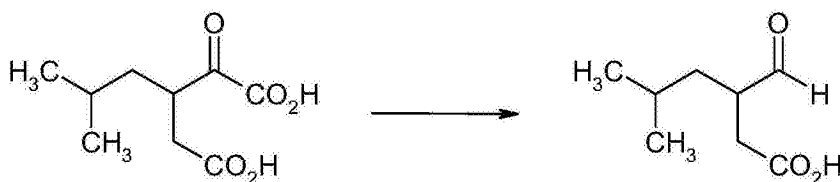
[0484] 使用PubMed来搜索关于具有广谱活性的脱羧酶的文献。使用KEGG(京都基因和基因组百科全书)程序来搜索具有对在结构上与3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸或3-亚异丁基-2-氧代戊二酸有几分相似性的化合物的活性的微生物脱羧酶。根据对具有一些结构相

似性的化合物的活性的报道,选择七类脱羧酶进行研究。所述脱羧酶类是谷氨酸脱羧酶、二氨基庚酸脱羧酶、吡啶丙酮酸脱羧酶、支链 α -酮酸脱羧酶、芳香族-L-氨基酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶和苯甲酰甲酸脱羧酶。选择了经证实的或推定的脱羧酶的基因的41种序列。所述基因经密码子优化用于在大肠杆菌中表达,通过GeneArt (Germany)、DNA2.0 (Menlo Park, CA USA) 或Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA USA) 合成,克隆到表达载体pSTRC52 (Pfizer Inc., USA) 中,并放入表达株E.coli BDG62 (Pfizer Inc., USA) 中(下表1)。从来自适当生物体的基因组DNA通过PCR扩增两种基因并克隆到同一表达载体和大肠杆菌菌株中。四种脱羧酶购自Sigma并在3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸上测试活性。

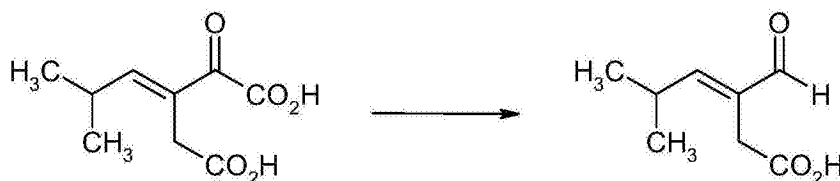
[0485] 含有克隆的脱羧酶基因的各大肠杆菌菌株在具有适当抗生素的LB肉汤中过夜生长。将少量(50 μ L-100 μ L)过夜种子培养物用于接种20mm直径培养管中具有适当抗生素的4.0mL Terrific Broth培养基。将培养物在32 $^{\circ}$ C和300rpm下生长在振荡培养箱中。生长5h后加入IPTG至0.4mM的最终浓度以诱导酶的表达。将培养物放回培养箱和并生长另外19h。

[0486] 实施例23

[0487] 用脱羧酶脱羧3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸钾盐和3-亚异丁基-2-氧代戊二酸钾盐



[0488]



[0489] 使用如实施例22中制备的大肠杆菌细胞对重组脱羧酶测试3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸(XV)和3-亚异丁基-2-氧代戊二酸(XII)的脱羧。反应(1mL)在37 $^{\circ}$ C下使用脱羧酶(60mg湿细胞)、50mM 3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸或3-亚异丁基-2-氧代戊二酸、ThDP(0.1mM)和MgSO₄(2.5mM)在磷酸钾缓冲液(100mM, pH值6.4)中进行。3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸和3-亚异丁基-2-氧代戊二酸的脱羧由UPLC测定法来测定。将反应物的等分试样(0.1mL)用0.5mL磷酸钾缓冲液(100mM, 用磷酸调节至pH 2.2)和0.3mL的2,4-二硝基苯肼溶液(1M HCl:乙腈, 3:1, v/v中, 20mM)在50 $^{\circ}$ C下处理30min。将衍生化的样品用0.5mL乙腈稀释, 过滤并通过在Agilent Eclipse Plus C18(100mm x 3.0mm, 1.8 μ m)柱上的UPLC分析, 用水:乙腈(55:45, v/v)中0.1%的三氟乙酸以1.1mL/min洗脱。将该柱保持在40 $^{\circ}$ C和将流出液在360nm和ES⁺质谱上监测。阳性结果由来自3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸的3-甲酰基-5-甲基己酸或来自3-亚异丁基-2-氧代戊二酸的3-甲酰基-5-甲基己(methylhex)-3-烯酸的峰的存在指示。分析的结果示于表1中。

[0490] 表1

[0491]

酶名称	生物来源	对 (XV) 的 反应	对 (XII) 的 反应
-----	------	----------------	-----------------

[0492]

酶名称	生物来源	对 (XV) 的 反应	对 (XII) 的 反应
谷氨酸脱羧酶			
Aa gad	金黄节杆菌 (<i>Arthrobacter aureus</i>)	— ^a	NT ^b
Rs gad	红 球 菌 属 RHA1(<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1)	—	NT
Sc gad	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)	—	NT
Dz gad	水稻基腐病菌 (<i>Dickeya zeae</i>)	—	NT
Pa gad	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	—	NT
Mm gad	海分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>)	—	NT
UT gad	UTI89 宏基因组 DNA	—	NT
Rm gad	<i>Ralstonia metallidurans</i>	—	NT
Re gad	富养产碱菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)	—	NT
Xn gad	嗜线虫致病杆菌 (<i>Xenorhabdus nematophila</i>)	—	NT
Pd gad	美人鱼发光杆菌 (<i>Photobacterium damsela</i>)	—	NT
支链 α -酮酸脱羧酶			
Pa bkd	<i>Photobacterium asymbiotica</i>	—	—
Sv bkdA	弗吉尼亚链霉菌 (<i>Streptomyces virginiae</i>)	—	—
LI kdcA	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	+	+

[0493]

酶名称	生物来源	对 (XV) 的 反应	对 (XII) 的 反应
吲哚丙酮酸脱羧酶			
Ss ipd	腐生性葡萄球菌 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	—	+
Dd ipd	脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>)	+	+
Bm ipd	脱硫弧菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	—	—
Dv ipd	普通脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)	—	—
Aa ipd	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	—	—
Ab ipd	巴西固氮螺菌 (<i>Azospirillum brasilense</i>)	—	—
Bs ipd	短根瘤菌属 BTai1 (<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTai1)	—	—
NC ipd	NC10 细菌	—	—
Rr ipd	红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)	—	—
芳香族-L-氨基酸脱羧酶			
Ab ded	鲍氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	—	—
Bp ded	鲍氏不动杆菌 (<i>Bacillus pumilus</i>)	—	—
Cg ded	粘金黄杆菌 (<i>Chryseobacterium gleum</i>)	—	—
As ded	厌氧粘细菌属 Fw109-5	—	—

[0494]

酶名称	生物来源	对 (XV) 的 反应	对 (XII) 的 反应
	<i>(Anaeromyxobacter sp. Fw109-5)</i>		
Bs dcd	伯霍尔德杆菌属 383 (<i>Burkholderia sp. 383</i>)	+	—
Cs dcd	蓝丝菌属 PCC 8801 (<i>Cyanothece sp. PCC 8801</i>)	—	—
赖氨酸脱羧酶			
Cr lysA	<i>Candidatus Carsonella ruddii</i>	—	—
Dt lysA	嗜热网球菌 (<i>Dictyoglomus thermophilum</i>)	—	—
Sa lysA	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	—	—
苯甲酰甲酸脱羧酶			
Rp bfd	沼泽红假单胞菌 (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	+	+
Sc bfd	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)	+	+
Rc bfd	蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	—	—
Pp bfd	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)	+	+
Ms bfd	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	—	—
As bfd	节杆菌属 FB24 (<i>Arthrobacter sp. FB24</i>)	+	+
Pb bfd	假单胞菌 (<i>Pseudomonas brassicacearum</i>)	+	+

酶名称	生物来源	对 (XV) 的 反应	对 (XII) 的 反应
Ct bfd	睾酮丛毛单胞菌 (<i>Comamonas testosterone</i>)	+	+
Dd bfd	脱硫弧菌	+	+
Rj bfd	<i>Rhodococcus jostii</i>	+	+
Pf bfd	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	+	+
[0495] 纯化的酶 (购自 Sigma-Aldrich)			
L-组氨酸 脱羧酶	乳杆菌属 30a (<i>Lactobacillus</i> 30a)	—	NT
L-赖氨酸 脱羧酶	<i>Bacterium cadaveris</i>	—	NT
L-酪氨酸 脱羧酶	粪链球菌 (<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>)	—	NT
丙酮酸脱 羧酶	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	—	NT

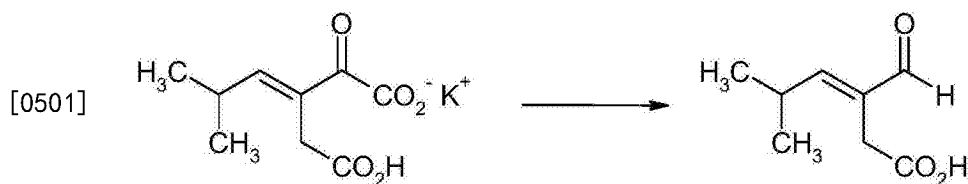
[0496] ^a-: 未检测到适当的产物

[0497] ^b NT: 未测试

[0498] ^c+: 检测到相应的产物

[0499] 实施例24

[0500] 3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸的制备



[0502] 在250mL圆底烧瓶中加入80g的包含表达恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 苯甲酰甲酸脱羧酶 (见例23) 的大肠杆菌的细胞浓缩物。向该溶液中加入3-亚异丁基-2-氧代戊二酸单钾盐 (10g, 参见实施例20) 在50mL水中的pH 6.2调节的溶液以及0.5g硫酸镁和0.5g焦磷酸硫胺素。将所得的pH 6.2浆液加热至50℃并搅拌145hrs, 用浓HCl保持pH调节在6.2和7.2之间。将反应混合物冷却至室温并离心。将倒出水溶液用50mL MTBE在最小的搅动下洗涤。将水相的pH调节到4, 并通过硅藻土过滤。滤液在最小的搅拌下用50mL MTBE萃取三次。将MTBE在无水硫酸钠上干燥并浓缩成粘稠的红色油状物。此油状物用几份热己烷萃取; 将合并的己烷冷却至<0°, 将所得的晶体进行分离, 并在空气中干燥, 得到3-甲酰基-5-甲基

己-3-烯酸为白色固体 (0.6g)。

[0503] ^1H NMR (于pH 8-10, 400MHz 下的 D_2O) δ 9.2 (s, 1H), 6.6 (d, 1H), 3.1 (s, 2H), 2.7 (m, 1H), 1 (d, 6H)

[0504] 实施例25

[0505] 烯酮还原酶同源物在大肠杆菌中的表达

[0506] 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) (西红柿) 12-氧代植二烯酸还原酶1 (12-氧代植二烯酸 reductase 1) (OPR1) 的基因所对应的DNA序列检索自Genbank数据库 (登录号ACQ9XG54) 并通过GeneArt (Germany) 合成。将序列进行密码子优化用于在大肠杆菌中表达, 并亚克隆到大肠杆菌表达质粒pSTRC18 (Pfizer Inc., USA) 中。蛋白质序列示于下文。如所指导的将OPR1表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 并将过夜培养物在LB+链霉素培养基中温育。LB培养物用于接种表达培养物 (LB, M9Y或TB), 其在37°C (210rpm) 下温育。在培养物达到合适的生物量浓度 (在A600下OD 1) 后, 加入IPTG (1mM) 并将培养物再温育20h (30°C, 210rpm)。细胞通过离心 (4000×g, 30min, 4°C) 收获并储存在-20°C。

[0507] BLASTP程序被用于在NCBI非冗余蛋白质序列数据库中搜索与来自番茄的12-氧代植二烯酸还原酶1 (OPR1) 相关的基因序列。选择了相关基因的三十八种序列, 进行密码子优化用于在大肠杆菌中表达, 并亚克隆到pET28b (+) 大肠杆菌表达质粒 (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) 中。如所指导的将OPR1相关的表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中并将过夜培养物在LB+卡那霉素培养基中生长。LB培养物用于接种生长在在过夜表达即时TB培养基 (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) 中的表达培养物。将培养物在30°C下温育20h。细胞通过离心 (4000×g, 30min, 4°C) 收获并储存在-20°C。

[0508] 番茄 (西红柿) 12-氧代植二烯酸还原酶1蛋白质序列:

[0509]

```
MENKVVEEKQ VDKIPLMSPC KMGKFELCHR VVLAPLTRQR SYGYIPQPHA  
ILHYSQRSTN GLLIGEATV ISETGIGYKD VPGIWTKEQV EAWKPIVDAV  
HAKGGIFFCQ IWHVGRVSNK DFQPNGEDPI SCTDRGLTPQ IRSNGIDIAH  
FTRPRRLTTD EIPQIVNEFR VAARNAIEAG FDGVEIHGAH GYLIDQFMKD  
QVNDRSCKYG GSLENRCRFA LEIVEAVANE IGSDRVGIRI SPFAHYNEAG  
DTNPTALGLY MVESLNKYDL AYCHVVEPRM KTAWEKIECT ESLVPMRKAY  
KGTFIVAGGY DREDGNRALI EDRADLVAYG RLFISNPDLP KRFELNAPLN  
KYNRDTFYTS DPIVGYPDYP FLETMT (SEQ ID NO. 8)
```

[0510] 番茄 (西红柿) 12-氧代植二烯酸还原酶1密码子优化序列:

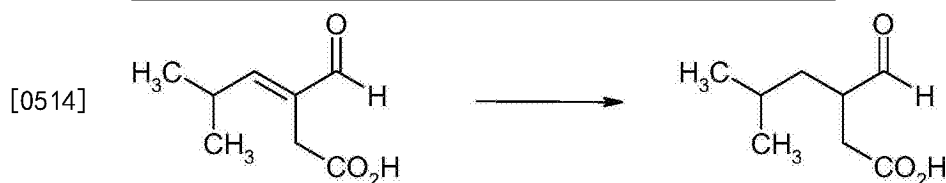
[0511]

```
ATGGAACAAAGTTGTGGAAGAAAAACAGGTTGATAAAATCCCGCTGATGAGCCCGTGTAATGGGTAAATTCGA  
GCTGTGTCATCGCGTTGTACTGGCACCGCTGACTCGTCAGCGTTCTTATGGTTACATTCGCGAGCCGCACGCAATCC  
TGCATTACTCTCAGCGCAGCACCAACGGTGGCCTGCTGATCGGTGAAGCAACCGTGATCAGCGAACTGGCATCGGT  
TACAAAGATGTGCCGGGTATCTGGACGAAAGAGCAGGTTGAGGCCTGGAACCGATCGTCGACGCGGTGCATGCCAA
```

AGGTGGTATTTTCTTTTGTGATCTGGCACGTTGGTCGTGTATCCAACAAAGATTTTCAGCCGAACGGCGAAGATC
CGATTTTCTGTACTGACCGCGGCCTGACCCCGCAGATCCGTTCCAACGGCATTGACATTGCCCACTTCACCCGTCCA
CGTCGCCTGACTACTGACGAGATTCCGCAGATCGTGAACGAGTTCCGCGTTGCAGCGCGTAATGCTATTGAAGCGGG
TTTCGATGGCGTCGAGATTTCATGGTGCCACGGTTACCTGATCGACCAATTCATGAAAGACCAAGTTAACGACCGCA
GCGATAAGTATGGCGGTTCTCTGGAGAACCGTTGTCGCTTCGCGCTGGAAATCGTTGAAGCAGTAGCCAACGAGATT
GGCTCCGACCGTGTTGGTATCCGTATCTCTCCATTCGCACACTACAACGAAGCGGGCGACACTAACCCGACCGCACT
GGGCTGTATATGGTGGAGAGCCTGAATAAATACGACCTGGCGTATTGTCACGTGGTCGAGCCGCGCATGAAAACCG
CCTGGGAAAAGATTGAGTGACCGAAAGCCTGGTGCCGATGCGTAAAGCCTACAAAGGCACCTTCATCGTAGCTGGT
GGCTACGACCGTGAAGACGGTAACCGCGCTCTGATCGAAGACCGTGCCGACCTGGTTGCGTACGGTCGTCTGTTTCAT
CAGCAACCCAGACCTGCCGAAGCGTTTTTGAAGTGAACGCTCCGCTGAACAAATACAACCGTGACACTTTCTACACTT
CCGACCCGATCGTTGGTTACACCGATTACCCGTTTCTGGAAACTATGACTTAATAA (SEQ ID NO.9)

[0512] 实施例26

[0513] 用重组还原酶还原(E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸



[0515] 使用如实施例25中制备的大肠杆菌细胞对重组烯酮还原酶测试(E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸的还原。反应(0.5mL)在30℃下使用大肠杆菌细胞(100mg湿细胞/mL)、NADPH(10mM)、NADH(10mM)和(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸(10mM)在磷酸钾缓冲液(100mM,pH值7.0)中进行。16h后,将乙腈(0.5mL)加入各反应,将所得的混合物离心(2000rpm x 5min)。将所得的上清液的等分试样(0.1mL)用0.1mL磷酸钾缓冲液(100mM,用磷酸调节至pH 2.2)和0.225mL的2,4-二硝基苯肼溶液(1M HCl:乙腈,3:1,v/v中,20mM)在50℃下处理30min。将衍生化的样品用0.225mL乙腈稀释,并通过在Phenomenex Lux 5 μ 直链淀粉-2柱(250mm x 4.6mm id)上的HPLC分析,用水:乙腈(65:35,v/v)中0.1%的三氟乙酸以2mL/min洗脱。将该柱保持在50℃并将流出液在360nm上监测。HPLC分析的结果示于表2中。

[0516] 表2

[0517]

条目	酶名称/来源	登录号	%转化率 ¹
1	老黄酶 1/卡尔酵母 (<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>)	Q02899	6.5
2	老黄酶 2/酿酒酵母	Q03558	9.2
3	老黄酶 3/酿酒酵母	P41816	8.6
4	NADH:黄素还原酶/运动发 酵单胞菌(<i>Zymomonas mobilis</i>)	Q5NLA1	85.0
5	延胡索酸还原酶/冷海希瓦 氏菌(<i>Shewanella frigidimarina</i>)	Q07WU7	3.4
6	季戊四醇四硝酸酯还原酶 / 阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	Q6JL81	85.6
7	未命名的酶/拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	BAH57049	3.7
8	丙烯醇脱氢酶/烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	BAA89423	5.0
9	青蒿醛 δ -11(13) 还原酶/青 蒿(<i>Artemisia annua</i>)	1WLY_A	37.1
10	2-卤代丙烯酸酯还原酶/伯	NP_390263	4.2

[0518]

条目	酶名称/来源	登录号	%转化率 ¹
	霍尔德杆菌属 WS(<i>Burkholderia sp. WS</i>)		
11	NADPH 脱氢酶/枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)亚种 subtilis str. 168	YP_390263	82.8
12	NADH:黄素还原酶/NADH 氧化酶/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_001664021	54.9
13	未命名的酶/酪丁酸梭菌(<i>Clostridium tyrobutyricum</i>)	CAA71086	6.0
14	未命名的酶/ <i>Moorella thermoautotrophica</i>	Q2RGT7	4.8
15	氧代植二烯酸还原酶(OPR1)/番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Q9XG54	31.4
16	氧代植二烯酸还原酶(OPR3)/番茄	Q9FEW9	15.7
17	N-乙基马来酰亚胺还原酶/宋氏志贺菌(<i>Shigella sonnei</i>)	Q3Z206	100.0
18	12-氧代植二烯酸还原酶/玉蜀黍(<i>Zea mays</i>)	Q49HE0	100.0
19	12-氧代植二烯酸还原酶/玉蜀黍	Q49HE4	100.0
20	未命名的酶/葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	A5BF80	7.5
21	未命名的酶/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	100.0

[0519]

条目	酶名称/来源	登录号	%转化率 ¹
22	12-氧代植二烯酸还原酶/拟南芥	Q8GYB8	100.0
23	12-氧代植二烯酸还原酶/蓖麻子 (Castor bean)	B9SK95	5.4
24	NADH:黄素还原酶/NADH氧化酶/ <i>Klebsiella variicola</i>	D0YIM0	100.0
25	未命名的酶/变栖克雷伯氏菌 (<i>Citrobacter koseri</i>)	A8AH31	100.0
26	N-乙基马来酰亚胺还原酶/柠檬酸杆菌属 (<i>Citrobacter sp.</i>)	C1M473	100.0
27	N-乙基马来酰亚胺还原酶/柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter rodentium</i>)	D2THI8	100.0
28	N-乙基马来酰亚胺还原酶/副伤寒沙门菌 (<i>Salmonella paratyphi</i>)	Q5PH09	100.0
29	N-乙基马来酰亚胺还原酶/ <i>Cronobacter turicensis</i>	C9Y3L1	100.0
30	未命名的酶/斯氏普罗威登斯菌 (<i>Providencia stuartii</i>)	B2Q290	100.0
31	NADPH 脱氢酶/ <i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6CI57	9.1
32	N-乙基马来酰亚胺还原酶/解脂耶氏酵母 (<i>Pseudomonas putida</i>)	Q88I29	17.4
33	12-氧代植二烯酸还原酶/毕赤酵母 (<i>Pichia stipitis</i>)	150864790	7.8

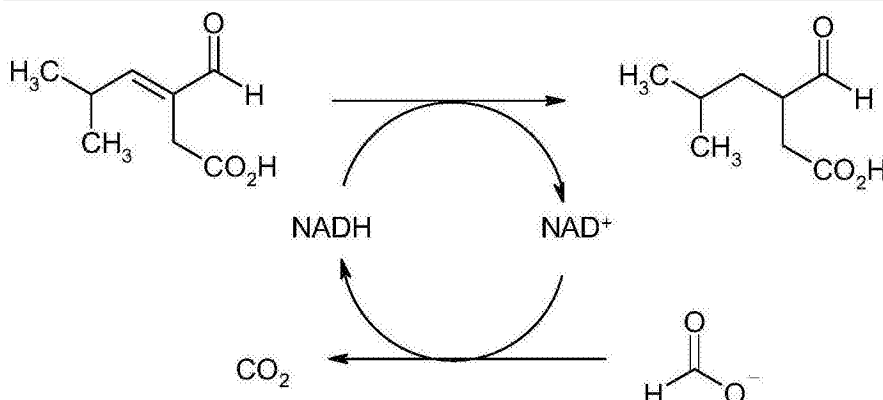
[0520]

条目	酶名称/来源	登录号	%转化率 ¹
34	NAPDH 脱氢酶/毕赤酵母	126131638	12.6
35	未命名的酶/季也蒙毕赤酵母 (<i>Pichia guilliermondii</i>)	146393506	21.6
36	未命名的酶/光滑念珠菌 (<i>Candida glabrata</i>)	50293551	36.5
37	未命名的酶/汉氏德巴利氏酵母 (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	50405397	9.1
38	未命名的酶/嗜热地芽孢杆菌 HTA426 (<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426)	Q5KXG9	100.0
39	氧代植二烯酸还原酶 (OPR2)/番茄	Q9XG54	14.0
(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸至 3-甲酰基-5-甲基己酸的 ¹ %转化率			

[0521] 实施例27

[0522] 用重组还原酶和甲酸脱氢酶还原 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸

[0523]



[0524] 用NAD⁺和甲酸脱氢酶对重组烯酮还原酶评价 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸的还原。烯酮还原酶表达在如实施例25中描述的大肠杆菌细胞中。甲酸脱氢酶如下在大肠杆菌细胞中表达:按所指导的将pET26b甲酸脱氢酶表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene,Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA) 中并将过夜培养物生长在LB+卡那霉素培养基中。LB培养物用于接种在过夜表达即时TB培养基+卡那霉素 (Novagen,EMD Chemicals,Gibbstown,NJ,USA) 中生长的表达培养物。将培养物在30℃下温育20h,细胞通过离心 (4000×g,30min,4℃) 收获并储存在-20℃。氧代植二烯酸还原酶3 (登录号Q9FEW9)

的变体 (D74M) 如下在大肠杆菌细胞中表达:如所指导的使用来自Stratagene (La Jolla, CA,USA) 的QuikChange定点突变试剂盒来产生氧代植二烯酸还原酶3变体D74M。引物从Integrated DNA Technologies (Coralville,IA,USA) 订购。如所指导的将pSTRC18氧代植二烯酸还原酶3 (OPR3) 表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene,Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA) 中并将过夜培养物生长在扩增肉汤+链霉素 (Zymo Research,Irvine,CA,USA) 中。LB培养物用于接种在过表达肉汤+链霉素 (Zymo Research,Irvine,CA,USA) 中生长的表达培养物。将培养物在23℃下温育20h,细胞通过离心 (4000×g,30min,4℃) 收获并储存在-20℃

[0525] 反应 (0.5mL) 在30℃下使用烯酮还原酶 (40mg湿细胞/mL)、甲酸脱氢酶 (80mg湿细胞/mL)、NAD⁺ (0.02mM)、甲酸铵 (30mM) 和 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸 (20mM) 在磷酸钾缓冲液 (100mM,pH 7.0) 中进行。24h后,用0.025mL的4N盐酸酸化反应混合物并用1mL乙酸乙酯萃取。将乙酸乙酯萃取液 (0.5mL) 的等分试样 (0.5mL) 在无水硫酸钠上干燥并用甲醇 (0.02mL) 和 (三甲基硅烷基) 重氮甲烷 (0.01mL的在乙醚中的2M溶液) 处理以将羧酸部分衍生化至其相应的甲基酯。将衍生化的样品通过在Chiraldex™ G-TA柱 (30M x 0.25mm柱,柱温度:135℃等温,注射器温度:200℃,载气:氮,流速大约1mL/min) 上的GC分析,得到表3所示的结果。

[0526] 表3

[0527]

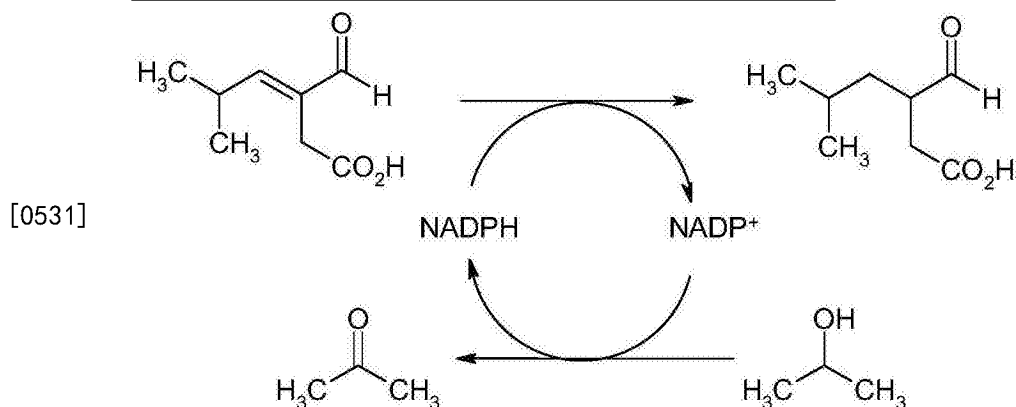
条目	酶名称/来源	登录号	% 转化率 1
----	--------	-----	------------

[0528]

条目	酶名称/来源	登录号	% 转化率 ₁
1	NADH:黄素还原酶/运动发酵单胞菌	Q5NLA1	23.8
2	季戊四醇四硝酸酯还原酶/阴沟肠杆菌	Q6JL81	19.6
3	NADPH 脱氢酶/枯草芽孢杆菌亚种 subtilis str. 168	YP_390263	17.0
4	NADH:黄素还原酶/NADH 氧化酶/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_00166402 1	15.9
5	氧代植二烯酸还原酶(OPR 3) 变体 D74M/番茄		43.5
6	N-乙基马来酰亚胺还原酶/宋氏志贺菌	Q3Z206	24.0
7	未命名的酶/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	31.8
8	N-乙基马来酰亚胺还原酶/柠檬酸杆菌属(<i>Citrobacter sp.</i>)30_2	C1M473	22.8
9	N-乙基马来酰亚胺还原酶/ <i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703	C9Y3L1	26.3
10	未命名的酶/嗜热地芽孢杆菌 HTA426	Q5KXG9	21.7
11	12-氧代植二烯酸还原酶(OPR1)/番茄	Q9XG54	39.8
(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸至 3-甲酰基-5-甲基己酸的 ¹ % 转化率(所有反应产生(S)-和(R)-对映体的约 1: 1 的混合物)			

[0529] 实施例28

[0530] 用重组还原酶还原 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸



[0532] NADP⁺和短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 醇脱氢酶 (X-zye) 对重组烯酮还原酶评价 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸的还原。烯酮还原酶表达在如实施例25中描述的大肠杆菌细胞中。如实施例27中所描述的制备氧代植二烯酸还原酶3 (OPR3) 的变体 (D74M)。反应 (0.5mL) 在30℃下使用烯酮还原酶 (40mg湿细胞/mL)、短乳杆菌醇脱氢酶 (32U/mL) NADP⁺ (0.02mM)、2-丙醇 (3vol%) 和 (E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸 (20mM) 在磷酸钾缓冲液 (100mM, pH 7.0) 中进行。24h后, 用0.025mL的4N HCl酸化反应混合物并用1mL乙酸乙酯萃取。将乙酸乙酯萃取液 (0.5mL) 的等分试样 (0.5mL) 在无水硫酸钠上干燥并用甲醇 (0.02mL) 和 (三甲基硅烷基) 重氮甲烷 (0.01mL的在乙醚中的2M溶液) 处理以将羧酸部分衍生化至其相应的甲基酯。将衍生化的样品通过在Chiraldex™ G-TA柱 (30M x 0.25mm柱, 柱温度: 135℃等温, 注射器温度: 200℃, 载气: 氮, 流速大约1mL/min) 上的GC分析, 得到表4所示的结果。

[0533] 表4

[0534]

条目	酶名称/来源	登录号	% 转化率 1
1	NADH:黄素还原酶/运动发酵单胞菌	Q5NLA1	73.0
2	季戊四醇四硝酸酯还原酶/	Q6JL81	100.0

[0535]

条目	酶名称/来源	登录号	% 转化率 ₁
	阴沟肠杆菌		
3	NADPH 脱氢酶/枯草芽孢杆菌亚种 <i>subtilis</i> str. 168	YP_390263	100.0
4	NADH:黄素还原酶/NADH 氧化酶/ <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	YP_001664021	100.0
5	氧代植二烯酸还原酶(OPR 3) 变体 D74M/番茄		96.8
6	N-乙基马来酰亚胺还原酶/宋氏志贺菌	Q3Z206	100.0
7	未命名的酶/ <i>Populus trichocarpa</i>	B9MWG6	100.0
8	N-乙基马来酰亚胺还原酶/柠檬酸杆菌属(<i>Citrobacter sp.</i>)30_2	C1M473	100.0
9	N-乙基马来酰亚胺还原酶/ <i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703	C9Y3L1	99.5
10	未命名的酶/嗜热地芽孢杆菌 HTA426	Q5KXG9	100.0
11	12-氧代植二烯酸还原酶(OPR1)/番茄	Q9XG54	34.3
(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸至 3-甲酰基-5-甲基己酸的 ¹ % 转化率(所有反应产生(S)-和(R)-对映体的约 1: 1 的混合物)			

[0536] 实施例29

[0537] 3-甲酰基-5-甲基己酸的制备

[0538] 在反应容器中加入7.5mL的磷酸钾缓冲液(0.1M,pH7.0)、8.4mg NADP⁺、0.2mL短乳杆菌醇脱氢酶(32U/mL,X-zyme)、0.3mL 2-丙醇、季戊四醇四硝酸酯还原酶(大肠杆菌细胞在磷酸钾缓冲液中的2mL的200mg/mL悬浮液)和156mg (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸,并在40℃下搅拌。6.75h后,将反应混合物离心并将上清液用4N HCl调节至pH 2,并用乙酸乙酯(2×10mL)萃取。将乙酸乙酯萃取液在无水硫酸镁上干燥,过滤并减压浓缩,得到141mg的无色油状物(89%产率)。

[0539] ¹H NMR(于pH 8-10下的D₂O) δ2.53-2.43(m,2H),2.34-2.28(m,1H),1.53-1.42(m,1H),1.41-1.34(m,1H),1.20-1.12(m,1H),0.76(d,3H),0.74(d,3H)。

[0540] 实施例30

[0541] 用重组ω-转氨酶将3-甲酰基-5-甲基己酸生物转化至普瑞巴林。



[0543] 用各种重组转氨酶评价3-甲酰基-5-甲基己酸用以形成普瑞巴林的氨基转移。来自河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)的重组ω-转氨酶如下表达在大肠杆菌中:按所指导的将pET28bω-转氨酶表达构建体转化到BL21(DE3)大肠杆菌(Stratagene,Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)中并将过夜培养物生长在LB+卡那霉素培养基中。LB培养物用于接种在过夜表达即时TB+卡那霉素培养基(Novagen,EMD Chemicals,Gibbstown,NJ,USA)中生长的表达培养物。将培养物在30℃下温育20h,细胞通过离心(4000×g,30min,4℃)收获并储存在-20℃。

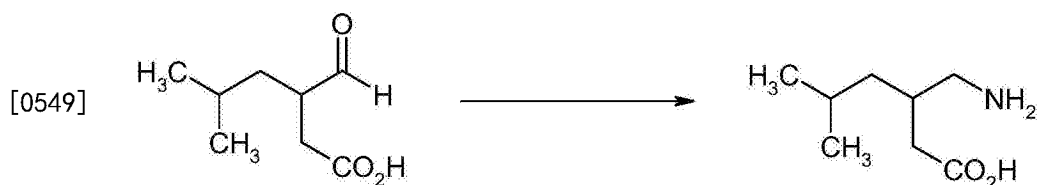
[0544] 反应(0.5mL)在30℃下在磷酸钾缓冲液(100mM,pH 7.0)、磷酸吡哆醛(2mM)、异丙胺(150mM)、3-甲酰基-5-甲基己酸(50mM)和来自河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)或脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)的ω-转氨酶(40mg湿细胞/mL)中进行。24h后,用0.4mL乙腈:水(1:1,v/v)稀释反应样品(0.1mL)。将稀释的反应样品的等分试样(0.05mL)用饱和碳酸氢钠水溶液(0.01mL)和Marfey试剂(N-α-(2,4-二硝基-5-氟苯基)丙氨酰胺,乙腈中0.2mL的5g/L溶液)在40℃下处理。1h后,将衍生化反应应用0.01mL的1N盐酸水溶液终止,用0.23mL的乙腈稀释。衍生的反应样品通过UPLC(柱:BEH C18,50mm x 2.1mm id,梯度洗脱:在5min内70%A:30%B至55%A:45%B(A=1%三乙胺(使用磷酸的pH3);B=乙腈),流速:0.8mL/min,柱温度:30℃,检测:210-400nm)分析,得到表5所示的结果。

[0545] 表5

[0546]

条目	酶	登录号	%产率 普瑞巴林	%ee (S)- 普瑞巴林
1	河流弧菌 ω -转氨酶	AEA39183	37.5	60.6
2	红假单胞菌 ω -转氨酶	YP_001043908	24	84.4
3	脱氮副球菌 ω -转氨酶	YP_917746	44	60.6

[0547] 实施例31

[0548] 用重组 ω -转氨酶将3-甲酰基-5-甲基己酸生物转化至普瑞巴林。

[0550] 对河流弧菌的重组变体测试3-甲酰基-5-甲基己酸用以形成普瑞巴林的还原性胺化。河流弧菌 ω -转氨酶(登录号AEA39183)的变体如下表达在大肠杆菌中:按所指导的使用来自Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的QuikChange定点突变试剂盒来产生河流弧菌 ω -转氨酶变体。引物从Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) 订购。按所指导的将pET28b ω -转氨酶表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中并将过夜培养物生长在LB+卡那霉素培养基中。LB培养物用于接种在过夜表达即时TB+卡那霉素培养基 (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) 中生长的表达培养物。将培养物在30℃下温育20h,细胞通过离心(4000 $\times$ g, 30min, 4℃)收获并储存在-20℃。

[0551] 反应(0.5mL)在30℃下使用磷酸吡哆醛(2mM)、异丙胺(300mM)、3-甲酰基-5-甲基己酸(100mM)和河流弧菌 ω -转氨酶野生型或变体(40mg湿细胞/mL)在磷酸钾缓冲液(100mM, pH 7.0)中进行。28h后,用0.4mL乙腈:水(1:1, v/v)稀释反应样品(0.1mL)。将稀释的反应样品的等分试样(0.05mL)用饱和碳酸氢钠水溶液(0.01mL)和Marfey试剂(N- α -(2, 4-二硝基-5-氟苯基)丙氨酰胺,乙腈中0.2mL的5g/L溶液)在40℃下处理。1h后,将衍生化反应应用0.01mL的1N盐酸水溶液终止,用0.23mL的乙腈稀释。衍生的反应样品通过UPLC(柱:BEH C18, 50mm $\times$ 2.1mm id, 梯度洗脱:在5min内70%A:30%B至55%A:45%B (A=1%三乙胺(使用磷酸的pH3);B=乙腈),流速:0.8mL/min,柱温度:30℃,检测:210-400nm)分析,得到表6所示的结果。

[0552] 表6

[0553]

条目	河流弧菌 ω -转氨酶变体	% 转化率	% ee
1	W57F/K163L/R415F	6.1	81.1
2	Y165F	9.5	75.3
3	W147N	10.0	75.0
4	A228G	32.3	74.9
5	N166V	16.6	74.5
6	W57F/A228G	33.3	73.9
7	V156M	13.2	70.3
8	S159A	7.9	70.2

[0554]

条目	河流弧菌 ω -转氨酶变体	% 转化率	% ee
9	W57F/R415F	10.7	68.5
10	R415F	11.8	68.1
11	M59N	10.1	68.0
12	P301K	19.1	67.6
13	Y113F	7.9	65.2
14	F86G	32.1	64.1
15	I254V	32.1	64.0
16	H326N	15.9	63.8
17	C414I	10.1	63.0
18	W57F/K163L/V153A	46.1	41.2
19	W57F/K163L	43.5	36.1
20	D21Y	45.1	34.2
21	W57F/D21Y	46.3	34.0
22	M294V	42.4	33.2
23	W57F/M294V	41.2	32.5
24	W57F/V177I	39.9	29.0
25 ¹	Vat 565	20.0	90.5
26 ¹	Vfat665	15.0	93.1
27 ¹	Vfat701	9.0	94.4
28 ¹	Vfat707	7.5	95.7
29 ¹	Vfat747	50.0	97.5
30 ¹	Vfat825	75.0	95.7
31 ¹	Vfat 850	81.3	94.6
32 ¹	Vfat 875	80.5	95.1
33 ¹	Vfat888 ²	95.0	95.5

[0555] 注-1: 条目25至33-反应使用400mM的3-甲酰基-5-甲基己酸、3mM PLP、800mM IPM在45℃下进行。

[0556] 2:Vfat 888:

[0557] DNA序列

[0558]

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CCAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACGGTGTAAC
GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCGGCCTGCCGTGCCGGGTTTCGTTACCTGAC
CTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCCGAGCTGG
AGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA
AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACGCCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGGCGAAACGCCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCAGCGGTACCCCGGTGGGTTCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACACCTGTACCGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCCCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGTGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.10)

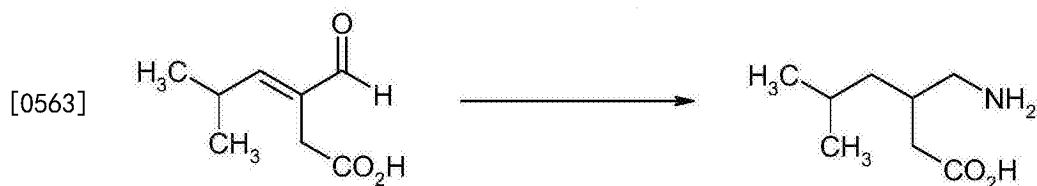
[0559] 氨基酸序列

[0560]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAACAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGV
AVSASMTGLPYNSVFLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELAKRLE
TAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.2)

[0561] 实施例32

[0562] (E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸的酶促还原至3-甲酰基-5-甲基己酸和用 ω -转
氨酶原位转化为普瑞巴林



[0564] (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸至3-甲酰基-5-甲基己酸的使用季戊四醇四硝酸
酯还原酶的还原和至普瑞巴林的原位转化用各种 ω -转氨酶进行评价。来自河流弧菌、球形

红细菌和脱氮副球菌的重组 ω -转氨酶如下表达在大肠杆菌中:按所指导的将pET28b ω -转氨酶表达构建体转化到BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene,Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA) 中并将过夜培养物生长在LB+卡那霉素培养基中。LB培养物用于接种在过夜表达即时TB+卡那霉素培养基 (Novagen,EMD Chemicals,Gibbstown,NJ,USA) 中生长的表达培养物。将培养物在30℃下温育20h,细胞通过离心 ($4000\times g$,30min,4℃) 收获并储存在-20℃。

[0565] 反应 (0.5mL) 在30℃下使用季戊四醇四硝酸酯还原酶 (40mg湿细胞/mL)、短乳杆菌醇脱氢酶 (32U/mL)、NADP⁺ (0.02mM)、2-丙醇 (3vol%)、磷酸吡哆醛 (2mM)、异丙胺 (100mM)、(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸 (20mM) 和来自河流弧菌、红假单胞菌或脱氮副球菌的 ω -转氨酶 (40mg湿细胞/mL) 在磷酸钾缓冲液 (100mM,pH 7.0) 中进行。43h后,用0.1mL乙腈:水 (1:1,v/v) 稀释反应样品 (0.1mL)。将稀释的反应样品的等分试样 (0.1mL) 用饱和碳酸氢钠水溶液 (0.01mL) 和Marfey试剂 (N- α -(2,4-二硝基-5-氟苯基) 丙氨酰胺,乙腈中0.4mL的5g/L溶液) 在40℃下处理。1h后,将衍生化反应用0.1mL的1N盐酸水溶液终止。衍生的反应样品通过UPLC (柱:BEH C18,50mm x2.1mm id,梯度洗脱:在5min内70%A:30%B至55%A:45%B (A=1%三乙胺 (使用磷酸的pH3);B=乙腈),流速:0.8mL/min,柱温度:30℃,检测:210-400nm) 分析,得到表7所示的结果。

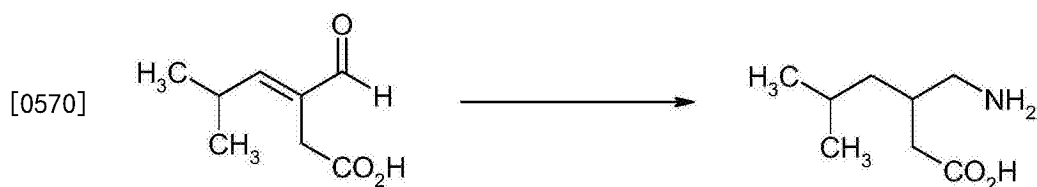
[0566] 表7

[0567]

条目	酶	登录号	%产率 普瑞巴林	%ee (S)- 普瑞巴林
1	河流弧菌 ω -转氨酶	AEA39183	60.8	42.0
2	红假单胞菌 ω -转氨酶	YP_001043908	60.4	54.6
3	脱氮副球菌 ω -转氨酶	YP_917746	33.6	61.5

[0568] 实施例33

[0569] (E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸的酶促还原至3-甲酰基-5-甲基己酸和用河流弧菌 ω -转氨酶原位转化为普瑞巴林



[0571] (E)-3-甲酰基-5-甲基己-3-烯酸至3-甲酰基-5-甲基己酸的使用季戊四醇四硝酸酯还原酶的还原和至普瑞巴林的原位转化用河流弧菌转氨酶的变体进行评价。河流弧菌 ω -转氨酶 (登录号AEA39183) 的变体如下表达在大肠杆菌中:按所指导的使用来自

Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的 QuikChange 定点突变试剂盒来产生河流弧菌 ω -转氨酶变体。引物从 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) 订购。按所指导的将 pET28b ω -转氨酶表达构建体转化到 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中并将过夜培养物生长在 LB+卡那霉素培养基中。LB 培养物用于接种在过夜表达即时 TB+卡那霉素培养基 (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) 中生长的表达培养物。将培养物在 30℃ 下温育 20h, 细胞通过离心 (4000 $\times$ g, 30min, 4℃) 收获并储存在 -20℃。

[0572] 反应 (0.5mL) 在 30℃ 下使用季戊四醇四硝酸酯还原酶 (40mg 湿细胞/mL)、短乳杆菌醇脱氢酶 (32U/mL)、NADP⁺ (0.1mM)、2-丙醇 (3vol%)、磷酸吡哆醛 (2mM)、异丙胺 (300mM)、(E)-3-甲酰基-5-甲基己-2-烯酸 (100mM) 和河流弧菌 ω -转氨酶野生型或变体 (40mg 湿细胞/mL) 在磷酸钾缓冲液 (100mM, pH 7.0) 中进行。48h 后, 用 0.18mL 乙腈:水 (1:1, v/v) 稀释反应样品 (0.02mL)。将稀释的反应样品的等分试样 (0.1mL) 用饱和碳酸氢钠水溶液 (0.01mL) 和 Marfey 试剂 (N- α -(2,4-二硝基-5-氟苯基) 丙氨酰胺, 乙腈中 0.4mL 的 5g/L 溶液) 在 40℃ 下处理。1h 后, 将衍生化反应用 0.1mL 的 1N 盐酸水溶液终止。衍生的反应样品通过 UPLC (柱: BEH C18, 50mm $\times$ 2.1mm id, 梯度洗脱: 在 5min 内 70%A:30%B 至 55%A:45%B (A=1% 三乙胺 (使用磷酸的 pH3); B=乙腈), 流速: 0.8mL/min, 柱温度: 30℃, 检测: 210-400nm) 分析, 得到表 8 所示的结果。

[0573] 表 8

[0574]

条目	河流弧菌 ω -转氨酶变体	%产率 普瑞巴林	%ee (S)-普瑞巴林
1	M294V	64.8	73.7
2	T268M	47.4	77.8
3	P233L	77.3	71
4	N166V	38.1	73.1
5	C424A	76.5	70.6
6	L100M	83.7	71.4
7	S283A	68.1	71
8	L417M	68.7	71.8
9	Wild-type	62.7	61.5

[0575] 实施例 34

[0576] 河流弧菌 ω -转氨酶的替代变体

[0577] 河流弧菌 ω -转氨酶的下列其它重组变体如下表达在大肠杆菌中: 按所指导的将 pET28b ω -转氨酶表达构建体转化到 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (Stratagene, Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中并将过夜培养物生长在LB+卡那霉素培养基中。LB培养物用于接种在过夜表达即时TB+卡那霉素培养基 (Novagen, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) 中生长的表达培养物。将培养物在30℃下温育20h, 细胞通过离心 (4000 ×g, 30min, 4℃) 收获并储存在-20℃。

[0578] 实施例34a: Vfat906

[0579] DNA序列:

[0580]

ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CgAGCGT GGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGAC
GCAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGA
ACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGG
TGTCTCCATTTCGACAGCGGTTCGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTG
TGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTaaAACGCATACCACGGTGTAAAC
TGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGA
CCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTG
GAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGT
AATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATG
AAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATC
TCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAACGCCTGGA
AACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCggcGGTCACCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTC
TGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCTGGCACCGCGTTTGTAGGAGCGT
CTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAA
AGACAAAGCATCTAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCaaaCGTATCGCTAACACCTGTcagGACCTGG
GCCTGATCTGTAGCgCGCTGGGTCA GTCCGTTATCCTGTGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAG
GCGCAAATGGATGAGATGTTTGACAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID
NO. 11)

[0581] 氨基酸序列:

[0582]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRNNAYHGVT
AVSASMTGLPYNVFGFLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYPDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO. 3)

[0583] 实施例34b: Vfat999

[0584] DNA序列:

[0585]

ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA

CGAGCGTGGTACCGTGTTGTCACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGCTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTTCGACAGCGGTCGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAC
GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGACAACCTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAC
CTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCCGAGCTGG
AGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA
AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACAGCAAACGCCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTGCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCATTTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAGGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCGCGCTGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.12)

[0586] 氨基酸序列:

[0587]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGV
AVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCATALKAIIDVVMNEGLAENVRRLLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.4)

[0588] 实施例34c:Vfat1010

[0589] DNA序列:

[0590]

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CGAGCGTGGTACCGTGTTGTCACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGCTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACCTGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTTCGACAGCGGTCGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAC
GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTATGCCGACAACCTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAC
CTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCCGAGCTGG
AGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA

AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGCACTGAGCAAACGCCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTGCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAGGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.13)

[0591] 氨基酸序列:

[0592]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANGLYNMVAGFDHKGLIDAACAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGMPHNSVFLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPALSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPFILTAEQMDMFDKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.5)

[0593] 实施例34d:Vfat1020

[0594] DNA序列:

[0595]

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CGAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTGTATGTCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAC
GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGGG
TTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGG
AGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA
AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACAGCAAACGCCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTGCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAGGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.14)

[0596] 氨基酸序列:

[0597]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDFKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.6)

[0598] 实施例34e:Vfat1030

[0599] DNA序列:

[0600]

ATGAATAAACCAAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CGAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGGACGTCCACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACCTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGCTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTGTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTCGACAGCGGTGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACGGTGTAAC
GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCCGGCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAG
CTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCGCGAGCTGG
AGGAAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA
AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTGAAGCAACGCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTTGCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCTGGCACCGCGTTTGGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAGGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA (SEQ ID NO.15)

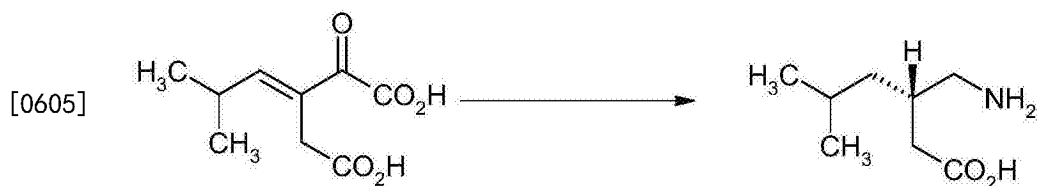
[0601] 氨基酸序列:

[0602]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAKAQYE
RFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRQNAYHGVT
AVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEPVMGAGGV
IPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILGPELSKRLE
TAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGFMWALEAVK
DKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDFKLEKALDKVFAEVA (SEQ ID
NO.7)

[0603] 实施例35

[0604] 3-亚异丁基-2-氧代戊二酸至普瑞巴林的生物转化

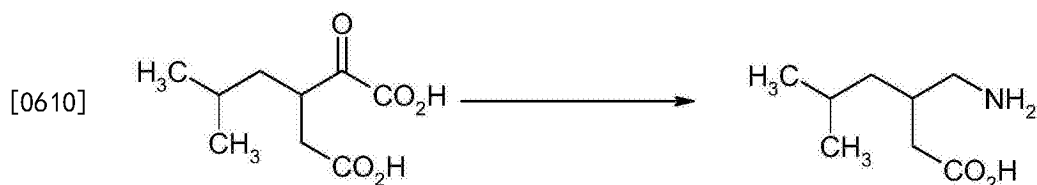


[0606] 将恶臭假单胞菌苯甲酰脱羧酶、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 季戊四醇四硝酸酯还原酶、短乳杆菌醇脱氢酶和河流弧菌 ω -转氨酶克隆到表达载体 pDSTRC52 (Pfizer Inc., USA) 中, 并放入表达株大肠杆菌 BDG62 (Pfizer Inc., USA) 中。生长培养物并如实施例 22 中所描述的诱导酶产生。酶表达由聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 Novex 凝胶和染色剂 (Invitrogen Corporation Carlsbad, California) 测定。

[0607] 反应 (1.0 mL) 在 40°C 下使用恶臭假单胞菌脱羧酶、河流弧菌转氨酶、短乳杆菌醇脱氢酶、阴沟肠杆菌季戊四醇四硝酸酯还原酶和 NADP (0.1 mM) 在磷酸钾缓冲液 (100 mM, pH 6.4) 中于一室中进行。200 μ L 1 M 3-亚异丁基-2-氧代戊二酸, 100 μ L 1 mM ThDp+25 mM MgSO₄, 40 μ L 50 mM 的 PLP, 30 μ L 异丙醇, 250 μ L 2 M 异丙胺。调节 pH 至 6.4 进行 24 h, 然后将 pH 调整至 6.8 进行另外的 24 h。将反应物的等分试样 (0.5 mL) 用 1 M 碳酸氢钠水溶液 (0.05 mL) 和 Marfey 试剂 (N- α -(2,4-二硝基-5-氟苯基) 丙氨酰胺, 乙腈中 0.5 mL 的 5 g/L 溶液) 在 40°C 下处理。1 h 后, 将衍生化反应用 0.05 mL 的 1 N 盐酸水溶液终止。衍生的反应样品通过 UPLC (柱: Agilent Eclipse Plus C18 柱 (100 mm x 3.0 mm, 1.8 μ m) 过滤和分析, 用水: 乙腈 (60:40, v/v) 中的 0.1% 三氟乙酸在 1.3 mL/min 下洗脱。将柱保持在 30°C 和并将流出液在 340 nm 和 ES⁺ 质谱上监测。该反应产生了少量的普瑞巴林, 其中 82% 为所需的 S-异构体。

[0608] 实施例 36

[0609] 3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸至普瑞巴林的生物转化



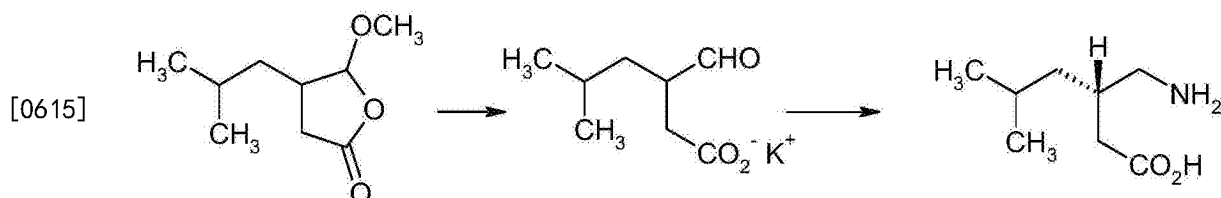
[0611] 将恶臭假单胞菌苯甲酰脱羧酶和河流弧菌 ω -转氨酶克隆到表达载体 pDSTRC52 (Pfizer Inc., USA) 中, 并放入表达株大肠杆菌 BDG62 (Pfizer Inc., USA) 中。生长培养物并如实施例 22 中所描述的诱导酶产生。酶表达由聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 Novex 凝胶和染色剂 (Invitrogen Corporation Carlsbad, California) 测定。

[0612] 反应 (2.0 mL) 在 40°C 下使用来自 24 小时发酵罐的 500 μ L 培养物 (42.5 mg 干细胞重) (恶臭假单胞菌脱羧酶和河流弧菌 ω -转氨酶克隆到一个质粒中)、400 μ L 0.5 M 3-(2-甲基丙基)-2-氧代戊二酸、200 μ L 10 $\times$ ThDP (最终为 0.1 mM) 和 MgSO₄ (最终为 2.5 mM)、80 μ L 50 mM PLP (最终为 2 mM)、300 μ L 2 M 异丙胺 (最终为 0.3 M) 在磷酸钾缓冲液 (100 mM, pH 6.4) 中进行。调节 pH 至 6.4, 并在 45°C 下温育 24 小时, 然后将 pH 调整至 6.8 进行另外的 24 h。将反应物的等分试样 (0.5 mL) 用 1 M 碳酸氢钠水溶液 (0.05 mL) 和 Marfey 试剂 (N- α -(2,4-二硝基-5-氟苯基) 丙氨酰胺, 乙腈中 0.5 mL 的 5 g/L 溶液) 在 40°C 下处理。1 h 后, 将衍生化反应用 0.05 mL 的 1 N 盐酸水溶液终止。衍生的反应样品通过 UPLC (柱: Agilent Eclipse Plus C18 柱 (100 mm x

3.0mm, 1.8 μ m) 过滤和分析, 用水: 乙腈 (60:40, v/v) 中的0.1% 三氟乙酸在1.3mL/min下洗脱。将柱保持在30℃和并将流出液在340nm和ES⁺质谱上监测。该反应产生了100 μ g/mL的普瑞巴林, 其中65%为所需的S-异构体。

[0613] 实施例37

[0614] 经由5-甲氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮的水解和酶促氨基转移制备(S)-普瑞巴林



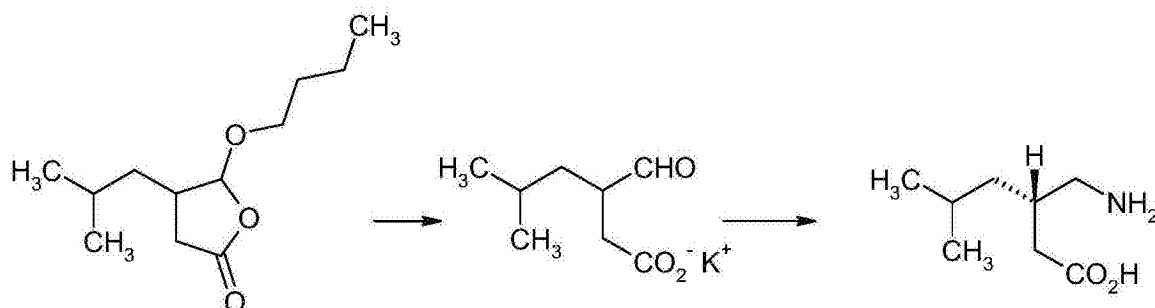
[0616] 将5-甲氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮 (2.58g, 15mmol, 见实施例13) 悬浮于DIW (5.2g) 中并在冰/水浴中冷却。通过注射器在5min内滴加aq KOH (50%w/w, 1.77g, 1.05eq)。将反应物从冰/水浴移出, 并在室温下搅拌90min。使用甲酸将pH调节至7.0。然后将反应混合物用作在随后转氨酶反应中的原料。

[0617] 将转氨酶溶液 (12.5g)、PLP (35mg)、DIW (15mL) 和4.0M异丙胺·HCl aq soln (7.5mL, 30mmol) 加入到100mL烧瓶中并加热到45℃。一次性加入水解反应物接着加入DIW (6mL, 用作容器冲洗)。将反应物的pH用纯异丙胺调节至7.25, 并将反应物在45℃下搅拌直至反应完全。随后将反应混合物加热到55℃的内部温度并将pH用95%的甲酸调节到4.0。加入Darco碳 (125mg), 并将该混合物冷却到室温随后在冰/水上冷却20分钟。然后将混合物通过Whatman纸no. 3过滤。将滤液浓缩至其重量的三分之一, 然后加热至55℃。随后将溶液的pH用50%KOH调节至pH 7.5, 之后将溶液冷却至室温然后在冰/水浴中冷却至0-5℃。在冷却中观察到产物的沉淀。将浆液过滤, 用DIW/EtOH (10mL, 1:1, 0℃) 洗涤。将白色沉淀物在真空烘箱 (45℃) 中干燥12h, 得到(S)-普瑞巴林, 61%产率, 98.6%w/w纯度和99.8%ee (优选的S-异构体)。

[0618] 实施例38

[0619] 经由5-丁氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮的水解和酶促氨基转移制备(S)-普瑞巴林

[0620]



[0621] 将5-丁氧基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮 (3.21g, 15mmol, 见实施例13C) 悬浮于DIW (8.5g) 中并在冰/水浴中冷却。通过注射器在5min内滴加aq KOH (50%w/w, 2.02g, 1.2eq)。将反应物从冰/水浴移出, 并在室温下搅拌90min。随后使用甲酸将pH调节至

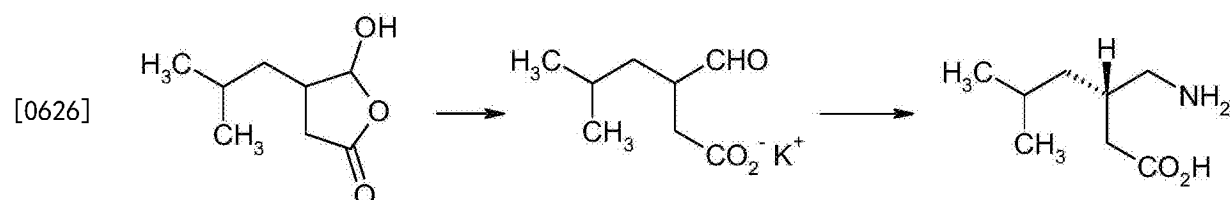
7.0,然后将反应混合物用作在随后转氨酶反应中的原料。

[0622] 将转氨酶溶液 (12.5g)、PLP (35mg)、DIW (15mL) 和 4.0M 异丙胺·HCl 溶液 (7.5mL, 30mmol) 加入到 100mL 烧瓶中并加热到 45℃。一次性加入水解反应物 (见上文) 接着加入 DIW (6mL, 用作容器冲洗)。将反应物的 pH 用纯异丙胺调节至 7.25, 并将反应物在 45℃ 下搅拌。

[0623] 将反应混合物加热到 55℃ 的内部温度并将 pH 用 95% 的甲酸调节到 4.0。加入 Darco 碳 (125mg), 并将该混合物冷却到室温随后在冰/水上冷却 20 分钟。然后将混合物通过 Whatman 纸 no.3 过滤。将滤液浓缩至其重量的三分之一, 然后加热至 55℃。随后将溶液的 pH 用 50% KOH 调节至 pH 7.5, 之后将溶液冷却至室温然后在冰/水浴中冷却至 0-5℃。在冷却中观察到产物的沉淀。将浆液过滤, 用 DIW/EtOH (10mL, 1:1, 0℃) 洗涤。将白色沉淀物在真空烘箱 (45℃) 中干燥 12 小时, 得到 (S)-普瑞巴林, 51% 产率, 98.4% w/w 纯度和 99.9% ee 优选的 S-异构体。

[0624] 实施例 39

[0625] 经由酶促氨基转移由 5-羟基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮制备 (S)-普瑞巴林

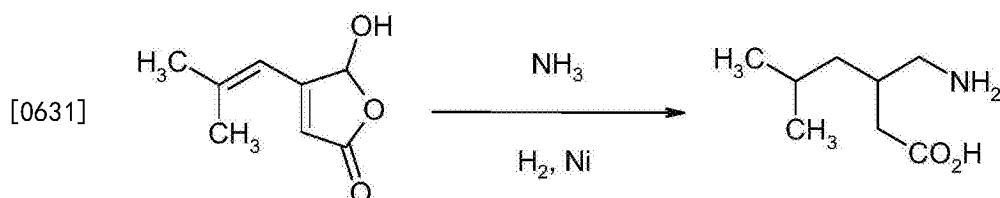


[0627] 将 5-羟基-4-(2-甲基丙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮 (2.0g, 12.5mmol) 悬浮于 DIW (8.5g) 中并在冰/水浴中冷却。在 5min 的过程内分批加入 (0.863g, 6.3mmol)。将反应物从冰/水浴移出, 并在室温下搅拌 90min。使用甲酸将 pH 调节至 7.0, 然后将反应混合物用作在随后转氨酶反应中的原料。

[0628] 将转氨酶溶液 (10.4g)、PLP (30mg)、DIW (12.5mL) 和 aq 4.0M 异丙胺·HCl aq soln (6.3mL, 30mmol) 加入到 100mL 烧瓶中并加热到 45℃。一次性加入水解反应物接着加入 DIW (5mL, 用作容器冲洗)。将反应物的 pH 用纯异丙胺调节至 7.25, 并将反应物在 45℃ 下搅拌。随后将反应混合物加热到 55℃ 的内部温度并将 pH 用 95% 的甲酸调节到 4.0。加入 Darco 碳 (125mg), 并将该混合物冷却到室温随后在冰/水上冷却 20 分钟。然后将混合物通过 Whatman 纸 no.3 过滤。将滤液浓缩至其重量的三分之一, 然后加热至 55℃。随后将溶液的 pH 用 50% KOH 调节至 pH 7.5, 之后将溶液冷却至室温然后在冰/水浴中冷却至 0-5℃。在冷却中观察到产物的沉淀。将浆液过滤, 用 DIW/EtOH (10mL, 1:1, 0℃) 洗涤。将白色沉淀物在真空烘箱 (45℃) 中干燥 12 小时, 得到 (S)-普瑞巴林, 61% 产率, 98.3% w/w 纯度和 99.9% ee 的优选 S-异构体。

[0629] 实施例 40

[0630] 经由 5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基) 呋喃-2(5H)-酮的还原性胺化制备 (R/S)-3-氨基-5-甲基己酸

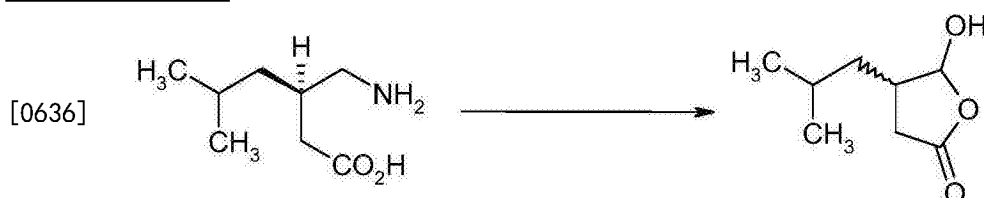


[0632] 将30%氨水溶液中5-羟基-4-(2-甲基丙-1-烯-1-基)呋喃-2(5H)-酮的0.01M溶液在10mol%拉尼镍催化剂的存在下氢化(10bar,环境温度)48h。过滤催化剂,并浓缩溶液以留下固体。通过加入盐酸至甲醇悬浮液分离产物,发现为纯的3-氨基-5-甲基己酸氢氯化物。

[0633] 使用钯作为催化剂产生3-氨基-5-甲基己酸和相应的仲胺3-[(2-羧甲基-4-甲基-戊基氨基)-甲基]-5-甲基-己酸的混合物。

[0634] 实施例41

[0635] 使用转氨酶将R-3-氨基-5-甲基己酸转化为5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮

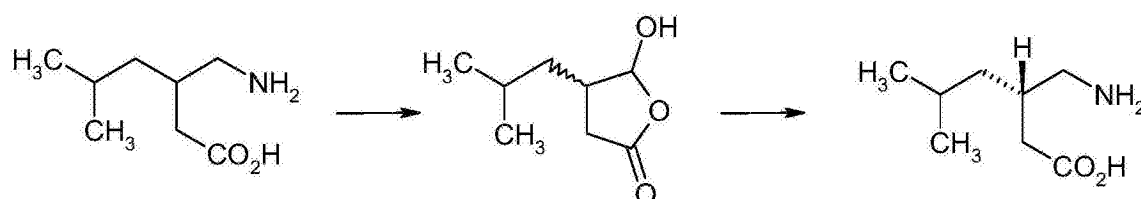


[0637] 将pH7.5/45℃的R-3-氨基-5-甲基己酸在D.I.水中的溶液与含有磷酸吡哆醛(PLP)和丙酮的全细胞制备物或转氨酶裂解物一起搅拌。产生的异丙胺经由氮气吹扫除去。24h后溶液的分析显示具有较低e.e.的3-氨基-5-甲基-己酸和化合物5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮的存在。5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮的手性纯度的降低是由于(4S)-5-羟基-4-(2-甲基丙基)-3,4-二氢-5H-2-呋喃酮至S-普瑞巴林的选择性转化。

[0638] 实施例42

[0639] 使用转氨酶去外消旋rac-普瑞巴林

[0640]



[0641] 将pH7.5的外消旋普瑞巴林在DIW中的溶液用适当的转氨酶裂解物处理。加入PLP,并将该反应在45℃、氮气吹扫下进行12h。然后,加入异丙胺,并将该反应继续进行另外的12h。按实施例38分离产物,得到对映体富集的普瑞巴林。

[0642] 还可能的是使用合适的胺氧化酶/亚胺还原酶系统以辅助因子例如NADP来实现实施例41和42中示例的转化。

[0643] 序列表

[0644] SEQ ID NO.1

[0645] 一般性Vfat aa序列

[0646]

MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHX²⁷RGTVVVTHGEGPYX⁴¹VDVX⁴⁵GRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLIDAAK
AQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTRX¹⁴⁷N
AYHGVTAVSASMTGX¹⁶³PX¹⁶⁵NSVFGLPLPGFVHLX¹⁸⁰CPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAG
FFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGA
VILGPELX³⁰⁴KRLETAIEAIEEFPHGFTAX³²⁴GHPVGCAIALKAIDWMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI
EYRGIGFMWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSX⁴⁰¹RIANTCX⁴⁰⁸DLGLICX⁴¹⁵X⁴¹⁶X⁴¹⁷GQSVILX⁴²⁴PPFILTEAQMD
EMFDKLEKALDKVFAEVA

[0647] X27选自谷氨酰胺(Q)和谷氨酸(E);X41选自异亮氨酸(I)和缬氨酸(V);X45选自天冬酰胺(N)和组氨酸(H);X147选自天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q);X163选自亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M);X165选自酪氨酸(Y)和组氨酸(H);X180选自苏氨酸(T);甘氨酸(G)和丝氨酸(S);X304选自丙氨酸(A)和丝氨酸(S);X324选自甘氨酸(G)和丝氨酸(S);X401选自赖氨酸(K)和谷氨酸(E);X408选自苏氨酸(T)和谷氨酰胺(Q);X415选自丝氨酸(S)和丙氨酸(A);X416选自脯氨酸(P)和丙氨酸(A);X417选自亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M);以及X424选自半胱氨酸(C)和丝氨酸(S)。

[0648] SEQ ID NO.2

[0649] Vfat888aa序列

[0650] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYI VDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
NNAYHGVTAVSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILG
PELAKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF
MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSERIANCTDLGLICSPMGQSVILCPPFILTEAQMD EMFDKLEKALDKVFAEVA

[0651] SEQ ID NO.3

[0652] Vfat906aa序列

[0653] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYI VDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
NNAYHGVTAVSASMTGLPYNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILG
PELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF
MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILCPPFILTEAQMD EMFDKLEKALDKVFAEVA

[0654] SEQ ID NO.4

[0655] Vfat999aa序列

[0656] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTN SGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
QNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRGTGNTWGCVTYDFTPDAI ISSKNLTAGFFPVGAVILG
PELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF

MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSALGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

[0657] SEQ ID NO.5

[0658] Vfat1010aa序列

[0659] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
QNAYHGVTAVSASMTGMPHNSVFGLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILG
PALSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF
MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

[0660] SEQ ID NO.6

[0661] Vfat1020aa序列

[0662] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYVVDVNGRRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
QNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLGCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILG
PELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF
MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICAAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

[0663] SEQ ID NO.7

[0664] Vfat1030aa序列

[0665] MNKPQSWEARAETYSLYGFTDMPSLHERGTVVVTHGEGPYIVDVHGRYLDANSGLYNMVAGFDHKGLI
DAAKAQYERFPGYHSFFGRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSGRVFYTNSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPQKRKILTR
QNAYHGVTAVSASMTGLPHNSVFGLPLPGFVHLSCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAE
PVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKNLTAGFFPVGAVILG
PELSKRLETAIEAIEEFPHGFTAGGHPVGCAIALKAIDVVMNEGLAENVRRRLAPRFEERLKHIAERPNI GEYRGIGF
MWALEAVKDKASKTPFDGNLSVSKRIANTCQDLGLICSAMGQSVILSPPFILTEAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA

[0666] SEQ ID NO.8

[0667] 番茄(西红柿)12-氧代植二烯酸还原酶1蛋白质序列:

[0668] MENKVVEEKQVDKIPLMSPCKMGKFELCHRVVLAPLTRQRSYGYIPQHAILHYSQRSTNGLLIGEAT
VISETGIGYKDVPGIWTKEQVEAWKPIVDAVHAKGGIFFCQIWHVGRVSNKDFQPNGEDPISCTDRGLTPQIRSNGI
DIAHFTRPRRLTTDEIPQIVNEFRVAARNAIEAGFDGVEIHGAHGYLIDQFMKDQVNDKSDKYGGSLENRCRFALEI
VEAVANEIGSDRVGIRISPFAYHNEAGDTNPALGLYMVESLNKYDLAYCHVVEPRMKTAWEKIECTESLVPMRKAY
KGTFIVAGGYDREDGNRALIEDRADLVAYGRLFISNPDLPKRFELNAPLNKYNRDTFYTSDPIVGYTDYPFLETMT

[0669] SEQ ID NO.9

[0670] 番茄(西红柿)12-氧代植二烯酸还原酶1密码子优化序列:

[0671] ATGGAACAAAGTTGTGGAAGAAAAACAGGTTGATAAAATCCCGCTGATGAGCCCGTGTAATGGGT
AAATTCGAGCTGTGTCATCGCGTTGTAAGTGGCACCCTGCTGATCGGTGAAGCAACCGTGATCAGCGAACTG
CGCAATCCTGCATTACTCTCAGCGCAGCACCAACGGTGGCCTGCTGATCGGTGAAGCAACCGTGATCAGCGAACTG
GCATCGGTTACAAAGATGTGCCGGGTATCTGGACGAAAGAGCAGGTTGAGGCCTGGAACCGATCGTCGACGCGGTG
CATGCCAAAGGTGGTATTTTCTTTTGTGATCTGGCACGTTGGTCGTATCCAACAAAGATTTTCAGCCGAACGG

CGAAGATCCGATTTCTGTACTGACCGCGGCCTGACCCCGCAGATCCGTTCCAACGGCATTGACATTGCCCACTTCA
CCCGTCCACGTGCGCTGACTACTGACGAGATTCCGCAGATCGTGAACGAGTTCGCGGTTGCAGCGCGTAATGCTATT
GAAGCGGGTTTCGATGGCGTCGAGATTCATGGTGCCACGGTTACCTGATCGACCAATTCATGAAAGACCAAGTTAA
CGACCGCAGCGATAAGTATGGCGGTTCTCTGGAGAACCGTTGTCGCTTCGCGCTGGAATCGTTGAAGCAGTAGCCA
ACGAGATTGGCTCCGACCGTGTTGGTATCCGTATCTCTCCATTTCGCACACTACAACGAAGCGGGCGACACTAACCCG
ACCGCACTGGGCCTGTATATGGTGGAGAGCCTGAATAAATACGACCTGGCGTATTGTCACGTGGTTCGAGCCGCGCAT
GAAAACCGCCTGGGAAAAGATTGAGTGACCGAAAAGCCTGGTGCCGATGCGTAAAGCCTACAAAGGCACCTTCATCG
TAGCTGGTGGCTACGACCGTGAAGACGGTAACCGCGCTCTGATCGAAGACCGTGCCGACCTGGTTGCGTACGGTCGT
CTGTTTCATCAGCAACCCAGACCTGCCGAAGCGTTTTGAACTGAACGCTCCGCTGAACAAATACAACCGTGACACTTT
CTACACTTCCGACCCGATCGTTGGTTACACCGATTACCGTTTTCTGGAAACTATGACTTAATAA

[0672] SEQ ID NO.10

[0673] Vfat 888DNA序列

[0674] ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCA
TCTCTGCACCAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGACGTCAACGGTCGCCGTTA
CCTGGACGCAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCC
AGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTTATGCTGAGCGAGAACTG
GTAGAGGTGTCTCCATTTCGACAGCGGTCGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAA
AATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTAACAACGCATACCACG
GTGTAACGTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTT
CACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATC
TCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGC
GATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGGCGAAAC
GCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTACGGCCAGCGGTCACCCGGTGGGTTCGCGT
ATCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCTGGCACCGCGTTTTGA
GGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGG
CTGTGAAAGACAAAGCATCTAAAACCCATTTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCGAGCGTATCGCTAACACCTGTACC
GACCTGGGCCTGATCTGTAGCCCGATGGGTCACTCCGTTATCCTGTGCCCCCGGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAAT
GGATGAGATGTTTGGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

[0675] SEQ ID NO.11

[0676] Vfat 906DNA序列

[0677]

ATGAATAAACCACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCATCTCTGCA
CgAGCGTGGTACCGTGGTTGTCACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGACGTCAACGGTCGCCGTTACCTGGACG
CAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCAGTACGAA
CGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTTATGCTGAGCGAGAACTGGTAGAGGT
GTCTCCATTTCGACAGCGGTCGCGTGTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAAAATGCTGT
GGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTaacAACGCATACCACGGTGTAAC

GCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGTACAACCTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTTACCTGAC
CTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCCGAGCTGG
AGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGGGCGGCGTA
ATCCCCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATCTCTGATGA
AGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGCGATCATCT
CCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTACGCAAAACGCTGGAA
ACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCggcGGTCACCCGGTGGGTTCGCTATCGCTCT
GAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGAGGAGCGTC
TGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGGCTGTGAAA
GACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCaaaCGTATCGCTAACACCTGTcagGACCTGGG
CCTGATCTGTAGCgCGCTGGGTGAGTCCGTTATCCTGTGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAATGGATGAGA
TGTTTGACAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

[0678] SEQ ID NO.12

[0679] Vfat 999DNA序列

[0680] ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCA
TCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTA
CCTGGACGCAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCC
AGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTTATGCTGAGCGAGAACTG
GTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAA
AATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACG
GTGTAACGTGCTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTT
CACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATC
TCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGC
GATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTACGCAAAAC
GCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCGGTGGGTTCGCT
ATCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGA
GGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGG
CTGTGAAAGACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTGAG
GACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGTGGGTGAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAAT
GGATGAGATGTTTGACAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

[0681] SEQ ID NO.13

[0682] Vfat 1010DNA序列

[0683] ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCA
TCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGACGTCAACGGTCGCCGTTA
CCTGGACGCAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCCC
AGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTTATGCTGAGCGAGAACTG
GTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAA

AATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACG
GTGTAAGTGTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTATGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTT
CACCTGACCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATC
TCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGC
GATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGCACTGAGCAAAAC
GCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTTGCGCT
ATCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGA
GGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGG
CTGTGAAAGACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAG
GACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAAT
GGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

[0684] SEQ ID NO.14

[0685] Vfat 1020DNA序列

[0686] ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCA
TCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACGTGGTGGACGTCAACGGTCGCCGTTA
CCTGGACGCAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCC
AGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTGTATGCTGAGCGAGAACTG
GTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTGCGGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAA
AATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGCAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACG
GTGTAAGTGTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTT
CACCTGGGTTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTGCTCGTCTGGCCCG
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATC
TCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGC
GATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAACCTGAGCAAAAC
GCCTGGAAACGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTACCCCGGTGGGTTGCGCT
ATCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGA
GGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGG
CTGTGAAAGACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAG
GACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTGAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAAT
GGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

[0687] SEQ ID NO.15

[0688] Vfat 1030DNA序列

[0689] ATGAATAAACACAAAGCTGGGAAGCGCGTGCTGAACTTACTCTCTGTACGGCTTCACTGATATGCCA
TCTCTGCACGAGCGTGGTACCGTGGTTGTACCCACGGCGAGGGCCCATACATCGTGACGTCCACGGTCGCCGTTA
CCTGGACGCAAACTCCGGCCTGTACAATATGGTTGCCGGCTTCGACCACAAGGTCTGATCGACGCAGCAAAGGCC
AGTACGAACGCTTCCCGGGTTACCATAGCTTCTTCGGTCGTATGTCTGATCAAACGTGTATGCTGAGCGAGAACTG

GTAGAGGTGTCTCCATTCGACAGCGGTCGCGTGTTCTATACTAACTCCGGCTCCGAGGCTAACGATACTATGGTGAA
AATGCTGTGGTTTCTGCACGCCGCAGAGGGCAAGCCGCAAAAACGAAAATCCTGACTCGTCAAAACGCATACCACG
GTGTAAGTGTGTTTCCGCTTCCATGACGGGTCTGCCGCACAACTCTGTATTCGGCCTGCCGCTGCCGGGTTTCGTT
CACCTGAGCTGTCCGCACTATTGGCGTTACGGCGAAGAAGGTGAAACCGAAGAGCAGTTTGTTGCTCGTCTGGCCCG
CGAGCTGGAGGAACTATCCAACGTGAAGGCGCGGACACGATTGCGGGCTTCTTTGCTGAGCCGGTCATGGGCGCGG
GCGGCGTAATCCCGCCGGCGAAAGGTTACTTCCAGGCGATCCTGCCGATTCTGCGTAAGTACGACATCCCGGTTATC
TCTGATGAAGTTATCTGCGGCTTTGGTCGTACCGGTAATACTTGGGGTTGCGTTACCTATGACTTCACCCCGGATGC
GATCATCTCCAGCAAAAATCTGACCGCCGGTTTCTTTCCGGTTGGTGCTGTGATTCTGGGTCCGGAAGTGAAGCAAC
GCCTGGAACCGGCGATCGAAGCTATCGAAGAGTCCCGCACGGCTTTACGGCCGGCGGTCACCCGGTGGGTTGCGCT
ATCGCTCTGAAAGCAATCGATGTTGTGATGAATGAGGGTCTGGCAGAGAACGTGCGCCGCCTGGCACCGCGTTTTGA
GGAGCGTCTGAAACACATTGCCGAACGTCCGAACATCGGTGAATATCGTGGCATCGGTTTTATGTGGGCACTGGAGG
CTGTGAAAGACAAAGCATCTAAAACCCCATTCGATGGTAATCTGTCTGTGAGCAAACGTATCGCTAACACCTGTCAG
GACCTGGGCCTGATCTGTAGCGCGATGGGTCAGTCCGTTATCCTGAGCCCGCCGTTTCATCCTGACCGAGGCGCAAAT
GGATGAGATGTTTGACAAACTGGAGAAGGCTCTGGACAAAGTCTTTGCGGAGGTGGCGTAA

IIC152328序列表

序列表

- <110> PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS
O' NEILL, PADRAIG MARY
DEBARGE, SEBASTIEN
ERDMAN, DAVID THOMAS
KUMAR, RAJESH
KARMILOWICZ, MICHAEL JOHN
- <120> 用于制备普瑞巴林的方法和中间体
- <130> PC71999A
- <150> US 61/805786
<151> 2013-03-27
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 河流弧菌酶的修饰
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (27)..(27)
<223> Xaa(27)选自谷氨酰胺(Gln)和谷氨酸(Glu)
- [0001] <220>
<221> 杂项特征
<222> (41)..(41)
<223> Xaa(41)选自异亮氨酸(Ile)和缬氨酸(Val)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (45)..(45)
<223> Xaa(45)选自精氨酸(Asn)和组氨酸(His)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (147)..(147)
<223> Xaa(147)选自精氨酸(Asn)和谷氨酰胺(Gln)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (163)..(163)
<223> Xaa(163)选自亮氨酸(Leu)和甲硫氨酸(Met)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (165)..(165)
<223> Xaa(165)选自酪氨酸(Tyr)和组氨酸(His)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (180)..(180)
<223> Xaa(180)选自苏氨酸(Thr); 甘氨酸(Gly)和丝氨酸(Ser)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (304)..(304)
<223> Xaa(304)选自丙氨酸(Ala)和丝氨酸(Ser)
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (324)..(324)
<223> Xaa(324)选自甘氨酸(Gly)和丝氨酸(Ser)

<220>
 <221> 杂项特征
 <222> (401)..(401)
 <223> Xaa(401)选自赖氨酸(Lys)和谷氨酸(Glu)

 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> (408)..(408)
 <223> Xaa(408)选自苏氨酸(Thr)和谷氨酰胺(Gln)

 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> (415)..(415)
 <223> Xaa(415)选自丝氨酸(Ser)和丙氨酸(Ala)

 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> (416)..(416)
 <223> Xaa(416)选自proline (Pro)和丙氨酸(Ala)

 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> (417)..(417)
 <223> Xaa(417)选自亮氨酸(Leu)和甲硫氨酸(Met)

 <220>
 <221> 杂项特征
 <222> (424)..(424)
 <223> Xaa(424)选自半胱氨酸(Cys)和丝氨酸(Ser)

<400> 1

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
1 5 10 15

[0002]

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Xaa Arg Gly Thr Val Val
20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Xaa Val Asp Val Xaa Gly Arg Arg
35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
50 55 60

His Lys Gly Leu Ile Asp Ala Ala Lys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Pro
65 70 75 80

Gly Tyr His Ser Phe Phe Gly Arg Met Ser Asp Gln Thr Val Met Leu
85 90 95

Ser Glu Lys Leu Val Glu Val Ser Pro Phe Asp Ser Gly Arg Val Phe
100 105 110

Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Met Val Lys Met Leu
115 120 125

Trp Phe Leu His Ala Ala Glu Gly Lys Pro Gln Lys Arg Lys Ile Leu
130 135 140

Thr Arg Xaa Asn Ala Tyr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met
145 150 155 160

Thr Gly Xaa Pro Xaa Asn Ser Val Phe Gly Leu Pro Leu Pro Gly Phe
165 170 175

	Val His Leu Xaa Cys Pro His Tyr Trp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Glu	180	185	190
	Thr Glu Glu Glu Phe Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Leu Glu Glu Thr	195	200	205
	Ile Gln Arg Glu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Phe Phe Ala Glu Pro	210	215	220
	Val Met Gly Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Ala Lys Gly Tyr Phe Gln	225	230	235
	Ala Ile Leu Pro Ile Leu Arg Lys Tyr Asp Ile Pro Val Ile Ser Asp	245	250	255
	Glu Val Ile Cys Gly Phe Gly Arg Thr Gly Asn Thr Trp Gly Cys Val	260	265	270
	Thr Tyr Asp Phe Thr Pro Asp Ala Ile Ile Ser Ser Lys Asn Leu Thr	275	280	285
	Ala Gly Phe Phe Pro Val Gly Ala Val Ile Leu Gly Pro Glu Leu Xaa	290	295	300
	Lys Arg Leu Glu Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro His Gly	305	310	315
[0003]	Phe Thr Ala Xaa Gly His Pro Val Gly Cys Ala Ile Ala Leu Lys Ala	325	330	335
	Ile Asp Val Val Met Asn Glu Gly Leu Ala Glu Asn Val Arg Arg Leu	340	345	350
	Ala Pro Arg Phe Glu Glu Arg Leu Lys His Ile Ala Glu Arg Pro Asn	355	360	365
	Ile Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val	370	375	380
	Lys Asp Lys Ala Ser Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser	385	390	395
	Xaa Arg Ile Ala Asn Thr Cys Xaa Asp Leu Gly Leu Ile Cys Xaa Xaa	405	410	415
	Xaa Gly Gln Ser Val Ile Leu Xaa Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala	420	425	430
	Gln Met Asp Glu Met Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val	435	440	445
	Phe Ala Glu Val Ala	450		
	<210> 2			
	<211> 453			

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 2

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Gln Arg Gly Thr Val Val
20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Ile Val Asp Val Asn Gly Arg Arg
35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
50 55 60

His Lys Gly Leu Ile Asp Ala Ala Lys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Pro
65 70 75 80

Gly Tyr His Ser Phe Phe Gly Arg Met Ser Asp Gln Thr Val Met Leu
85 90 95

Ser Glu Lys Leu Val Glu Val Ser Pro Phe Asp Ser Gly Arg Val Phe
100 105 110

[0004]

Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Met Val Lys Met Leu
115 120 125

Trp Phe Leu His Ala Ala Glu Gly Lys Pro Gln Lys Arg Lys Ile Leu
130 135 140

Thr Arg Asn Asn Ala Tyr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met
145 150 155 160

Thr Gly Leu Pro Tyr Asn Ser Val Phe Gly Leu Pro Leu Pro Gly Phe
165 170 175

Val His Leu Thr Cys Pro His Tyr Trp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Glu
180 185 190

Thr Glu Glu Gln Phe Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Leu Glu Glu Thr
195 200 205

Ile Gln Arg Glu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Phe Phe Ala Glu Pro
210 215 220

Val Met Gly Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Ala Lys Gly Tyr Phe Gln
225 230 235 240

Ala Ile Leu Pro Ile Leu Arg Lys Tyr Asp Ile Pro Val Ile Ser Asp
245 250 255

Glu Val Ile Cys Gly Phe Gly Arg Thr Gly Asn Thr Trp Gly Cys Val
260 265 270

Thr Tyr Asp Phe Thr Pro Asp Ala Ile Ile Ser Ser Lys Asn Leu Thr
275 280 285

Ala Gly Phe Phe Pro Val Gly Ala Val Ile Leu Gly Pro Glu Leu Ala
290 295 300

Lys Arg Leu Glu Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro His Gly
305 310 315 320

Phe Thr Ala Ser Gly His Pro Val Gly Cys Ala Ile Ala Leu Lys Ala
325 330 335

Ile Asp Val Val Met Asn Glu Gly Leu Ala Glu Asn Val Arg Arg Leu
340 345 350

Ala Pro Arg Phe Glu Glu Arg Leu Lys His Ile Ala Glu Arg Pro Asn
355 360 365

Ile Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val
370 375 380

Lys Asp Lys Ala Ser Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser
385 390 395 400

Glu Arg Ile Ala Asn Thr Cys Thr Asp Leu Gly Leu Ile Cys Ser Pro
405 410 415

[0005]

Met Gly Gln Ser Val Ile Leu Cys Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala
420 425 430

Gln Met Asp Glu Met Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val
435 440 445

Phe Ala Glu Val Ala
450

<210> 3

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 3

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Glu Arg Gly Thr Val Val
20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Ile Val Asp Val Asn Gly Arg Arg
35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
50 55 60

	His	Lys	Gly	Leu	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Gln	Tyr	Glu	Arg	Phe	Pro	
	65					70					75					80	
	Gly	Tyr	His	Ser	Phe	Phe	Gly	Arg	Met	Ser	Asp	Gln	Thr	Val	Met	Leu	
				85					90						95		
	Ser	Glu	Lys	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Pro	Phe	Asp	Ser	Gly	Arg	Val	Phe	
				100					105					110			
	Tyr	Thr	Asn	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Asn	Asp	Thr	Met	Val	Lys	Met	Leu	
			115					120					125				
	Trp	Phe	Leu	His	Ala	Ala	Glu	Gly	Lys	Pro	Gln	Lys	Arg	Lys	Ile	Leu	
		130					135					140					
	Thr	Arg	Asn	Asn	Ala	Tyr	His	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Met	
	145				150					155						160	
	Thr	Gly	Leu	Pro	Tyr	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Phe	
				165					170						175		
	Val	His	Leu	Thr	Cys	Pro	His	Tyr	Trp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	
			180						185					190			
	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Val	Ala	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Glu	Glu	Thr	
		195					200						205				
[0006]	Ile	Gln	Arg	Glu	Gly	Ala	Asp	Thr	Ile	Ala	Gly	Phe	Phe	Ala	Glu	Pro	
	210					215					220						
	Val	Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Pro	Ala	Lys	Gly	Tyr	Phe	Gln	
	225				230					235						240	
	Ala	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	Arg	Lys	Tyr	Asp	Ile	Pro	Val	Ile	Ser	Asp	
				245					250						255		
	Glu	Val	Ile	Cys	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	Gly	Asn	Thr	Trp	Gly	Cys	Val	
			260					265						270			
	Thr	Tyr	Asp	Phe	Thr	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Asn	Leu	Thr	
		275						280					285				
	Ala	Gly	Phe	Phe	Pro	Val	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	
		290				295						300					
	Lys	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	His	Gly	
	305				310					315						320	
	Phe	Thr	Ala	Gly	Gly	His	Pro	Val	Gly	Cys	Ala	Ile	Ala	Leu	Lys	Ala	
				325					330					335			
	Ile	Asp	Val	Val	Met	Asn	Glu	Gly	Leu	Ala	Glu	Asn	Val	Arg	Arg	Leu	
			340					345					350				
	Ala	Pro	Arg	Phe	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	His	Ile	Ala	Glu	Arg	Pro	Asn	
		355					360					365					

Ile Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val
370 375 380

Lys Asp Lys Ala Ser Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser
385 390 395 400

Lys Arg Ile Ala Asn Thr Cys Gln Asp Leu Gly Leu Ile Cys Ser Ala
405 410 415

Leu Gly Gln Ser Val Ile Leu Cys Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala
420 425 430

Gln Met Asp Glu Met Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val
435 440 445

Phe Ala Glu Val Ala
450

<210> 4
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 4

[0007]

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Glu Arg Gly Thr Val Val
20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Val Val Asp Val Asn Gly Arg Arg
35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
50 55 60

His Lys Gly Leu Ile Asp Ala Ala Lys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Pro
65 70 75 80

Gly Tyr His Ser Phe Phe Gly Arg Met Ser Asp Gln Thr Val Met Leu
85 90 95

Ser Glu Lys Leu Val Glu Val Ser Pro Phe Asp Ser Gly Arg Val Phe
100 105 110

Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Met Val Lys Met Leu
115 120 125

Trp Phe Leu His Ala Ala Glu Gly Lys Pro Gln Lys Arg Lys Ile Leu
130 135 140

Thr Arg Gln Asn Ala Tyr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met
145 150 155 160

	Thr	Gly	Leu	Pro	His	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Phe	
					165					170					175		
	Val	His	Leu	Thr	Cys	Pro	His	Tyr	Trp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	
			180						185					190			
	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Val	Ala	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Glu	Glu	Thr	
			195					200					205				
	Ile	Gln	Arg	Glu	Gly	Ala	Asp	Thr	Ile	Ala	Gly	Phe	Phe	Ala	Glu	Pro	
		210					215					220					
	Val	Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Pro	Ala	Lys	Gly	Tyr	Phe	Gln	
	225					230					235					240	
	Ala	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	Arg	Lys	Tyr	Asp	Ile	Pro	Val	Ile	Ser	Asp	
					245					250					255		
	Glu	Val	Ile	Cys	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	Gly	Asn	Thr	Trp	Gly	Cys	Val	
			260						265					270			
	Thr	Tyr	Asp	Phe	Thr	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Asn	Leu	Thr	
			275					280						285			
	Ala	Gly	Phe	Phe	Pro	Val	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	
		290					295					300					
[0008]	Lys	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	His	Gly	
	305					310					315					320	
	Phe	Thr	Ala	Gly	Gly	His	Pro	Val	Gly	Cys	Ala	Ile	Ala	Leu	Lys	Ala	
				325						330					335		
	Ile	Asp	Val	Val	Met	Asn	Glu	Gly	Leu	Ala	Glu	Asn	Val	Arg	Arg	Leu	
			340						345					350			
	Ala	Pro	Arg	Phe	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	His	Ile	Ala	Glu	Arg	Pro	Asn	
			355					360					365				
	Ile	Gly	Glu	Tyr	Arg	Gly	Ile	Gly	Phe	Met	Trp	Ala	Leu	Glu	Ala	Val	
		370				375						380					
	Lys	Asp	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Pro	Phe	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Val	Ser	
	385					390					395					400	
	Lys	Arg	Ile	Ala	Asn	Thr	Cys	Gln	Asp	Leu	Gly	Leu	Ile	Cys	Ser	Ala	
				405						410				415			
	Leu	Gly	Gln	Ser	Val	Ile	Leu	Ser	Pro	Pro	Phe	Ile	Leu	Thr	Glu	Ala	
			420						425					430			
	Gln	Met	Asp	Glu	Met	Phe	Asp	Lys	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Lys	Val	
		435						440					445				
	Phe	Ala	Glu	Val	Ala												
		450															

<210> 5
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 5

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Glu Arg Gly Thr Val Val
 20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Ile Val Asp Val Asn Gly Arg Arg
 35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
 50 55 60

His Lys Gly Leu Ile Asp Ala Ala Lys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Pro
 65 70 75 80

Gly Tyr His Ser Phe Phe Gly Arg Met Ser Asp Gln Thr Val Met Leu
 85 90 95

Ser Glu Lys Leu Val Glu Val Ser Pro Phe Asp Ser Gly Arg Val Phe
 100 105 110

[0009]

Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Met Val Lys Met Leu
 115 120 125

Trp Phe Leu His Ala Ala Glu Gly Lys Pro Gln Lys Arg Lys Ile Leu
 130 135 140

Thr Arg Gln Asn Ala Tyr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met
 145 150 155 160

Thr Gly Met Pro His Asn Ser Val Phe Gly Leu Pro Leu Pro Gly Phe
 165 170 175

Val His Leu Thr Cys Pro His Tyr Trp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Glu
 180 185 190

Thr Glu Glu Gln Phe Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Leu Glu Glu Thr
 195 200 205

Ile Gln Arg Glu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Phe Phe Ala Glu Pro
 210 215 220

Val Met Gly Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Ala Lys Gly Tyr Phe Gln
 225 230 235 240

Ala Ile Leu Pro Ile Leu Arg Lys Tyr Asp Ile Pro Val Ile Ser Asp
 245 250 255

Glu Val Ile Cys Gly Phe Gly Arg Thr Gly Asn Thr Trp Gly Cys Val
 260 265 270
 Thr Tyr Asp Phe Thr Pro Asp Ala Ile Ile Ser Ser Lys Asn Leu Thr
 275 280 285
 Ala Gly Phe Phe Pro Val Gly Ala Val Ile Leu Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300
 Lys Arg Leu Glu Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro His Gly
 305 310 315 320
 Phe Thr Ala Gly Gly His Pro Val Gly Cys Ala Ile Ala Leu Lys Ala
 325 330 335
 Ile Asp Val Val Met Asn Glu Gly Leu Ala Glu Asn Val Arg Arg Leu
 340 345 350
 Ala Pro Arg Phe Glu Glu Arg Leu Lys His Ile Ala Glu Arg Pro Asn
 355 360 365
 Ile Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val
 370 375 380
 Lys Asp Lys Ala Ser Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Lys Arg Ile Ala Asn Thr Cys Gln Asp Leu Gly Leu Ile Cys Ser Ala
 405 410 415
 Met Gly Gln Ser Val Ile Leu Ser Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala
 420 425 430
 Gln Met Asp Glu Met Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val
 435 440 445
 Phe Ala Glu Val Ala
 450

[0010]

<210> 6
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 6

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Glu Arg Gly Thr Val Val
 20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Val Val Asp Val Asn Gly Arg Arg
 35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp

	50	55	60	65	70	75	80
	His Lys Gly Leu Ile	Asp Ala Ala Lys Ala	Gln Tyr Glu Arg Phe	Pro			
	Gly Tyr His Ser Phe	Phe Gly Arg Met Ser	Asp Gln Thr Val Met	Leu			
	Ser Glu Lys Leu Val	Glu Val Ser Pro Phe	Asp Ser Gly Arg Val	Phe			
	Tyr Thr Asn Ser Gly	Ser Glu Ala Asn Asp	Thr Met Val Lys Met	Leu			
	Trp Phe Leu His Ala	Ala Glu Gly Lys Pro	Gln Lys Arg Lys Ile	Leu			
	Thr Arg Gln Asn Ala	Tyr His Gly Val Thr	Ala Val Ser Ala Ser	Met			
	Thr Gly Leu Pro His	Asn Ser Val Phe Gly	Leu Pro Leu Pro Gly	Phe			
	Val His Leu Gly Cys	Pro His Tyr Trp Arg	Tyr Gly Glu Glu Gly	Glu			
[0011]	Thr Glu Glu Gln Phe	Val Ala Arg Leu Ala	Arg Glu Leu Glu Glu	Thr			
	Ile Gln Arg Glu Gly	Ala Asp Thr Ile Ala	Gly Phe Phe Ala Glu	Pro			
	Val Met Gly Ala Gly	Gly Val Ile Pro Pro	Ala Lys Gly Tyr Phe	Gln			
	Ala Ile Leu Pro Ile	Leu Arg Lys Tyr Asp	Ile Pro Val Ile Ser	Asp			
	Glu Val Ile Cys Gly	Phe Gly Arg Thr Gly	Asn Thr Trp Gly Cys	Val			
	Thr Tyr Asp Phe Thr	Pro Asp Ala Ile Ile	Ser Ser Lys Asn Leu	Thr			
	Ala Gly Phe Phe Pro	Val Gly Ala Val Ile	Leu Gly Pro Glu Leu	Ser			
	Lys Arg Leu Glu Thr	Ala Ile Glu Ala Ile	Glu Glu Phe Pro His	Gly			
	Phe Thr Ala Gly Gly	His Pro Val Gly Cys	Ala Ile Ala Leu Lys	Ala			
	Ile Asp Val Val Met	Asn Glu Gly Leu Ala	Glu Asn Val Arg Arg	Leu			

Ala Pro Arg Phe Glu Glu Arg Leu Lys His Ile Ala Glu Arg Pro Asn
 355 360 365

Ile Gly Glu Tyr Arg Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val
 370 375 380

Lys Asp Lys Ala Ser Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser
 385 390 395 400

Lys Arg Ile Ala Asn Thr Cys Gln Asp Leu Gly Leu Ile Cys Ala Ala
 405 410 415

Met Gly Gln Ser Val Ile Leu Ser Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala
 420 425 430

Gln Met Asp Glu Met Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val
 435 440 445

Phe Ala Glu Val Ala
 450

<210> 7
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 7

[0012]

Met Asn Lys Pro Gln Ser Trp Glu Ala Arg Ala Glu Thr Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Tyr Gly Phe Thr Asp Met Pro Ser Leu His Glu Arg Gly Thr Val Val
 20 25 30

Val Thr His Gly Glu Gly Pro Tyr Ile Val Asp Val His Gly Arg Arg
 35 40 45

Tyr Leu Asp Ala Asn Ser Gly Leu Tyr Asn Met Val Ala Gly Phe Asp
 50 55 60

His Lys Gly Leu Ile Asp Ala Ala Lys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Pro
 65 70 75 80

Gly Tyr His Ser Phe Phe Gly Arg Met Ser Asp Gln Thr Val Met Leu
 85 90 95

Ser Glu Lys Leu Val Glu Val Ser Pro Phe Asp Ser Gly Arg Val Phe
 100 105 110

Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Met Val Lys Met Leu
 115 120 125

Trp Phe Leu His Ala Ala Glu Gly Lys Pro Gln Lys Arg Lys Ile Leu
 130 135 140

Thr Arg Gln Asn Ala Tyr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met

	145		150		155		160
	Thr Gly Leu Pro His	Asn Ser Val Phe	Gly Leu Pro Leu Pro Gly Phe				
		165		170		175	
	Val His Leu Ser Cys	Pro His Tyr Trp	Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Glu				
		180		185		190	
	Thr Glu Glu Gln Phe	Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Leu Glu Glu Thr					
		195		200		205	
	Ile Gln Arg Glu Gly	Ala Asp Thr Ile Ala Gly Phe Phe Ala Glu Pro					
		210		215		220	
	Val Met Gly Ala Gly	Gly Val Ile Pro Pro Ala Lys Gly Tyr Phe Gln					
		225		230		235	
	Ala Ile Leu Pro Ile	Leu Arg Lys Tyr Asp Ile Pro Val Ile Ser Asp					
		245		250		255	
	Glu Val Ile Cys Gly	Phe Gly Arg Thr Gly Asn Thr Trp Gly Cys Val					
		260		265		270	
	Thr Tyr Asp Phe Thr	Pro Asp Ala Ile Ile Ser Ser Lys Asn Leu Thr					
		275		280		285	
[0013]	Ala Gly Phe Phe Pro	Val Gly Ala Val Ile Leu Gly Pro Glu Leu Ser					
		290		295		300	
	Lys Arg Leu Glu Thr	Ala Ile Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro His Gly					
		305		310		315	
	Phe Thr Ala Gly Gly	His Pro Val Gly Cys Ala Ile Ala Leu Lys Ala					
		325		330		335	
	Ile Asp Val Val Met	Asn Glu Gly Leu Ala Glu Asn Val Arg Arg Leu					
		340		345		350	
	Ala Pro Arg Phe Glu	Glu Arg Leu Lys His Ile Ala Glu Arg Pro Asn					
		355		360		365	
	Ile Gly Glu Tyr Arg	Gly Ile Gly Phe Met Trp Ala Leu Glu Ala Val					
		370		375		380	
	Lys Asp Lys Ala Ser	Lys Thr Pro Phe Asp Gly Asn Leu Ser Val Ser					
		385		390		395	
	Lys Arg Ile Ala Asn	Thr Cys Gln Asp Leu Gly Leu Ile Cys Ser Ala					
		405		410		415	
	Met Gly Gln Ser Val	Ile Leu Ser Pro Pro Phe Ile Leu Thr Glu Ala					
		420		425		430	
	Gln Met Asp Glu Met	Phe Asp Lys Leu Glu Lys Ala Leu Asp Lys Val					
		435		440		445	

Phe Ala Glu Val Ala
450

<210> 8
<211> 376
<212> PRT
<213> 番茄

<400> 8

Met Glu Asn Lys Val Val Glu Glu Lys Gln Val Asp Lys Ile Pro Leu
1 5 10 15

Met Ser Pro Cys Lys Met Gly Lys Phe Glu Leu Cys His Arg Val Val
20 25 30

Leu Ala Pro Leu Thr Arg Gln Arg Ser Tyr Gly Tyr Ile Pro Gln Pro
35 40 45

His Ala Ile Leu His Tyr Ser Gln Arg Ser Thr Asn Gly Gly Leu Leu
50 55 60

Ile Gly Glu Ala Thr Val Ile Ser Glu Thr Gly Ile Gly Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Val Pro Gly Ile Trp Thr Lys Glu Gln Val Glu Ala Trp Lys Pro Ile
85 90 95

[0014]

Val Asp Ala Val His Ala Lys Gly Gly Ile Phe Phe Cys Gln Ile Trp
100 105 110

His Val Gly Arg Val Ser Asn Lys Asp Phe Gln Pro Asn Gly Glu Asp
115 120 125

Pro Ile Ser Cys Thr Asp Arg Gly Leu Thr Pro Gln Ile Arg Ser Asn
130 135 140

Gly Ile Asp Ile Ala His Phe Thr Arg Pro Arg Arg Leu Thr Thr Asp
145 150 155 160

Glu Ile Pro Gln Ile Val Asn Glu Phe Arg Val Ala Ala Arg Asn Ala
165 170 175

Ile Glu Ala Gly Phe Asp Gly Val Glu Ile His Gly Ala His Gly Tyr
180 185 190

Leu Ile Asp Gln Phe Met Lys Asp Gln Val Asn Asp Arg Ser Asp Lys
195 200 205

Tyr Gly Gly Ser Leu Glu Asn Arg Cys Arg Phe Ala Leu Glu Ile Val
210 215 220

Glu Ala Val Ala Asn Glu Ile Gly Ser Asp Arg Val Gly Ile Arg Ile
225 230 235 240

Ser Pro Phe Ala His Tyr Asn Glu Ala Gly Asp Thr Asn Pro Thr Ala
245 250 255

Leu Gly Leu Tyr Met Val Glu Ser Leu Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Tyr
 260 265 270
 Cys His Val Val Glu Pro Arg Met Lys Thr Ala Trp Glu Lys Ile Glu
 275 280 285
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Pro Met Arg Lys Ala Tyr Lys Gly Thr Phe
 290 295 300
 Ile Val Ala Gly Gly Tyr Asp Arg Glu Asp Gly Asn Arg Ala Leu Ile
 305 310 315 320
 Glu Asp Arg Ala Asp Leu Val Ala Tyr Gly Arg Leu Phe Ile Ser Asn
 325 330 335
 Pro Asp Leu Pro Lys Arg Phe Glu Leu Asn Ala Pro Leu Asn Lys Tyr
 340 345 350
 Asn Arg Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Asp Pro Ile Val Gly Tyr Thr Asp
 355 360 365
 Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Met Thr
 370 375

<210> 9
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> 番茄

[0015]

<400> 9
 atggaaaaca aagttgtgga agaaaaacag gttgataaaa tcccgeigat gagccccgtg 60
 aaaaatggga aattcgagct gtgtcatcgc gttgtaetgg caccgeigac tcgtcagcgt 120
 tcctatgggtt acattccgca gccgcacgca atcctgcatt actctcagcg cagcaccac 180
 gggtggcctgc tgcacggtga agcaaccgtg atcagcgaaa ctggcatcgg ttacaaagat 240
 gtgccgggta tcggacgaa agagcagggt gaggcctgga aaccgatcgt cgacgcgggtg 300
 catgccaaag gtggtatttt ctttgtcag atctggcagc ttggtcgtgt atccaacaaa 360
 gattttcage cgaacggcga agatccgatt tctgtactg accgcggcct gaccccgcag 420
 atccgttcca accgcattga cattgccac ttcaccgcgc cactgcct gactactgac 480
 gagattccgc agatcgtgaa cgagttccgc gttgcagcgc gtaatgctat tgaagcgggt 540
 ttcatggcgc tcgagattca tgggtgccac ggttacctga tcgaccaatt catgaaagac 600
 caagttaacg accgcagcga taagtatgge ggttctctgg agaaccgttg tcgtctcgcg 660
 ctggaaatcg ttgaagcagt agccaacgag attggctccg accgtgttgg tatccglatc 720
 tctccattcg cacactacaa cgaagcgggc gacactaacc cgaccgcact gggcctgtat 780
 atggtggaga gctgaataa atacgacctg gctattgtc acgtggtcga gccgcgatg 840
 aaaaccgcct gggaaaagat tgagtcacc gaaagcctgg tgccgatcgc taaagcctac 900
 aaaggcacct tcatcgtage tgggtgctac gaccgtgaag accgtaaccg cgctctgate 960
 gaagaccgtg ccgacctggt tgcgtacggt cgtctgttca tcagcaaccc agacctgccg 1020
 aagcgttttg aactgaacgc tccgtgaac aaatacaacc gtgacacttt ctacacttcc 1080
 gacccgatcg ttggttacac cgattaccgg ttcttgaaa ctatgaetta ataa 1134

<210> 10
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 10
 atgaataaac cacaaagctg ggaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggttcact 60
 gatatgcat ctctgcacca gcgtggtacc gtggttgta cccacggcga ggcccatac 120
 aicgtggacg tcaacggtcg ccgttacctg gacgcaaact ccggcctgta caatatggtt 180
 gccggttcg accacaaggg tctgatcgac gcagcaaagg ccagtagca acgttccc 240
 ggttacata gcttcttcgg tctgtatgct gatcaaacig ttatgctgag cgagaaactg 300
 gtagagggtg ctccattcga cagcggtcgc gtgtctata cttaactccg ctccgaggt 360
 aacgatacta tggtagaaat gctgtggttt ctgcacgccg cagagggcaa gccgcaaaa 420
 cgcaaaatcc tgactcgtaa caacgcatac cagcgtgtaa ctgcgtttc cgttccatg 480
 accggtctgc cgtacaactc tgtattcggc ctgcgcctgc cgggtttcgt tcactgacc 540
 tgtccgcact attggcggtt cggcgaagaa ggtgaaaccg aagagcagtt tgttgctcgt 600
 ctggcccgcg agctggagga aactatccaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcctc 660
 ttgtctgagc cggtcattgg cgcggcgccg gtaatccgcg cggcgaagg ttacttccag 720
 gcgatccgc cgattctgcg taagtacgac atcccggtta tctctgatga agttatctgc 780
 ggttttggtc gtaccggtaa tacttgggtt tgcgttaact atgacttcac ccggatgcg 840
 atcatctcca gcaaaaatct gaccgcgggt ttctttccgg ttggtgctgt gattctgggt 900
 ccggaactgg cgaaacgcct ggaaacggcg atcgaagcta tcgaagagtt ccgcacggc 960
 ttacggcca cgggtcaccg ggtgggttgc gctatcctc tgaaagcaat cgatgttgtg 1020
 atgaatgagg gtctggcaga gaacgtgcgc cgcctggcac cgcgttttga ggagcgtctg 1080
 aaacacattg ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggtt tatgtggca 1140
 ctggaggctg tgaaagacaa agcatctaaa acccattcgt atggtaatct gtctgtgagc 1200
 gagcgtatcg cttaacacctg taccgacctg gccctgatct gtagcccgat gggtcagtc 1260
 gttatctgt gcccgccgtt cactctgacc gaggcgcaa tggatgagat gtttgacaaa 1320
 ctggagaagg ctctggacaa agtctttgcg gaggtggcgt aa 1362

[0016]

<210> 11
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 11
 atgaataaac cacaaagctg ggaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggttcact 60
 gataatgcat ctctgcacga gcgtggtacc gtggttgta cccacggcga ggcccatac 120
 atcgtggacg tcaacggtcg ccgttacctg gacgcaaact ccggcctgta caatatggtt 180
 gccggttcg accacaaggg tctgatcgac gcagcaaagg ccagtagca acgttccc 240

```

ggttaccata gcttcttcgg tcgtatgtct gatcaaacig ttatgctgag cgagaaactg 300
gtagagggtgt ctccattcga cagcggctgc gtgtcttata ctaactccgg ctccgaggct 360
aacgatacta tggtgaaaaat gctgtggttt ctgcacgccg cagagggcaa gccgcaaaaa 420
cgcaaaaatcc tgactcgtaa caacgcatac caccggtgaa ctgctgtttc cgttccatg 480
acgggtctgc cgtacaactc tgtattcggc ctgccgtgc cgggtttcgt tcacctgacc 540
tgtccgcaact attggcgtaa cggcgaagaa ggtgaaaccg aagagcagtt tgttgctcgt 600
ctggcccgcg agctggagga aactatccaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcttc 660
tttgctgagc cggctcatggg cgcgggcggc gtaatccgc cggcgaaagg ttacttccag 720
gcgactctgc cgattctgcg taagtacgac atcccggtta tctctgatga agttatctgc 780
ggctttggtc gtaccggtaa tacttgggtt tgcgttaact atgacttcac cccggatgcg 840
atcatctcca gcaaaaatct gaccgccggt ttctttccgg ttggtgctgt gattctgggt 900
ccggaactga gcaaaagcct ggaacggcg atcgaagcta tcgaagagtt cccgcacggc 960
tttacggccg ggggtcaccg ggtgggttgc gctatcgctc tgaagcaat cgaigtgtg 1020
atgaatgagg gtctggcaga gaacgtgcgc cgcctggcac cgcgttttga ggagcgtctg 1080
aaacacatig ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggttt tatgtggcga 1140
ctggaggctg tgaagacaa agcatctaaa acccattcg atggtaatct gtctgtgagc 1200
aaacgtatcg ctaacacctg tcaggacctg ggcctgatct gtacgcgctt gggtcagtc 1260
gttatctctg gccgcgctt catctgacc gaggcgcaa tggatgagat gtttgacaaa 1320
ctggagaagg ctctggacaa agtctttgcg gaggtggcgt aa 1362

```

[0017]

<210> 12
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

```

<400> 12
atgaataaac cacaanctg gnaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggttccact 60
gatatgcaat ctctgcacga gcgtggtacc gtggttgica cccacggcga gggcccatc 120
gtggtggacg tcaacggteg ccgttacctg gacgcaact cggcctgta caatatggtt 180
gccggcttgc accacaaggg tctgatcgac gcagcaagg cccagtacga acgttcccg 240
ggttaccata gcttcttcgg tcgtatgtct gatcaaacig ttatgctgag cgagaaactg 300
gtagagggtgt ctccattcga cagcggctgc gtgtcttata ctaactccgg ctccgaggct 360
aacgatacta tggtgaaaaat gctgtggttt ctgcacgccg cagagggcaa gccgcaaaaa 420
cgcaaaaatcc tgactcgtaa aaacgcatac caccggtgaa ctgctgtttc cgttccatg 480
acgggtctgc cgcacaactc tgtattcggc ctgccgtgc cgggtttcgt tcacctgacc 540
tgtccgcaact attggcgtaa cggcgaagaa ggtgaaaccg aagagcagtt tgttgctcgt 600
ctggcccgcg agctggagga aactatccaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcttc 660
tttgctgagc cggctcatggg cgcgggcggc gtaatccgc cggcgaaagg ttacttccag 720
gcgactctgc cgattctgcg taagtacgac atcccggtta tctctgatga agttatctgc 780
ggctttggtc gtaccggtaa tacttgggtt tgcgttaact atgacttcac cccggatgcg 840

```


	atcatctcca gcaaaaatct gaccgccggt ttctttccgg ttgggtcgtg gattctgggt	900
	ccggaactga gcaaacgcct ggaaacggcg atcgaagcta tcgaagagtt cccgcacggc	960
	tttacggccg gcggtcaccc ggtgggttgc gctatcgctc tgaaagcaat cgaatgtgtg	1020
	atgaatgagg gcttggcaga gaacgtgcgc cgcttgccac cgcgttttga ggagcgtctg	1080
	aaacacattg ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggtt tatgtgggca	1140
	ctggaggetg tgaaagacaa agcatctaaa accccattcg atggtaatct gtcgtgagc	1200
	aaacgtatcg ctaacacctg tcaggacctg gccctgatct gtagecgcgt gggtcagtcc	1260
	gttatcciga gcccgcgtt cactctgacc gaggcgcaaa tggatgagat gtttgacaaa	1320
	ctggagaagg ctctggacaa agtctttgcg gaggtggcgt aa	1362
	<210> 13	
	<211> 1362	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 河流弧菌酶的修饰	
	<400> 13	
	atgaataaac cacaaagctg ggaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggttcaact	60
	gatatgccat ctctgcacga gcgtgggtacc gtggttgta cccacggcga gggcccatat	120
	atcgtggacg tcaacggctg ccgttacctg gacgcaaaact cgggcctgta caatatggtt	180
	gccggtctcg accacaaggg tctgatcgac gcagcaaaagg cccagtcga acgcttccc	240
[0018]	ggttaccata gcttcttcgg tcgtatgtct gateaaactg ttatgctgag cgagaaactg	300
	gtagaggigt ctccattcga cagcggtegc gtgttctata ctaactccgg ctccgagget	360
	aacgatacta tggtgaaaa gctgtggttt ctgcacgcgc cagagggcaa gccgcaaaaa	420
	cgcaaaatcc tgactcgtca aaacgcatac cacggtgtaa ctgctgttcc cgttccatg	480
	acgggtatgc cgcacaactc tgtattcggc ctgccctgc cgggtttcgt tcacctgacc	540
	tgtccgcact attggcggtta cggcgaagaa ggtgaaaccg aagagcagtt tgttgctcgt	600
	ctggccccgc agctggagga aactatccaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcctc	660
	tttgctgagc cggtcattgg cgcgggcggc gtaatccgc cggcgaaagg ttacttcag	720
	gcgactctgc cgattctcgc taagtacgac atcccggta tctctgatga agttatctgc	780
	ggctttggtc gtaccggtaa tacttggggt tgcgttacct atgacttcac cccggatgcg	840
	atcatctcca gcaaaaatct gaccgccggt ttctttccgg ttgggtcgtg gattctgggt	900
	ccggcaactga gcaaacgcct ggaaacggcg atcgaagcta tcgaagagtt cccgcacggc	960
	tttacggccg gcggtcaccc ggtgggttgc gctatcgctc tgaaagcaat cgaatgtgtg	1020
	atgaatgagg gcttggcaga gaacgtgcgc cgcttgccac cgcgttttga ggagcgtctg	1080
	aaacacattg ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggtt tatgtgggca	1140
	ctggaggetg tgaaagacaa agcatctaaa accccattcg atggtaatct gtcgtgagc	1200
	aaacgtatcg ctaacacctg tcaggacctg gccctgatct gtagecgcgt gggtcagtcc	1260
	gttatcciga gcccgcgtt cactctgacc gaggcgcaaa tggatgagat gtttgacaaa	1320
	ctggagaagg ctctggacaa agtctttgcg gaggtggcgt aa	1362

<210> 14
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 14
 atgaataaac cacaaagctg ggaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggcttcact 60
 gatatgccat ctctgcacga gcgtggtacc gtggttgtca cccacggcga gggcccatac 120
 gtggtggacg tcaacggtcg ccgttacctg gacgcaaact ccggcctgta caatatggtt 180
 gccggcttcg accacaaggg tctgategac gcagcaaagg ccagtaega acgcttcccg 240
 ggittaccata gcttcttcgg tcgtatgtct gatcaaacctg ttatgctgag cgagaaactg 300
 gtagagggtg ctccattcga cagcggtcgc gtgttctata ctaactccgg ctccgaggct 360
 aacgatacta tggtagaaaat gctgtgggtt ctgcacgccg cagagggcaa gccgcaaaaa 420
 cgcaaaatec tgactcgtca aaacgcatac cacgggtgta ctgctgttct cgttccatg 480
 acgggtctgc cgcacaactc tgtattcggc ctgccctgc cgggtttcgt teacctgggt 540
 tgtccgcact attggcgta cggcgaagaa ggtagaacgc aagagcagtt tgttgcctgt 600
 ctggcccggg agctggagga aactatecaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcttc 660
 ttctgtgagc cggctcatgg cgcgggcggc gtaatccgc cggcgaaagg ttacttccag 720
 gcgactctgc cgallctgcg taagtacgac atcccggtta tctctgatga agttatctgc 780
 ggctttgggt gtaccggtaa tacttggggt tgcgttacct atgacttca cccggatgcg 840
 [0019] atcatctcca gcaaaaatct gaccgccgtt ttctttccgg ttggtgcctg gattctgggt 900
 ccggaactga gcaaacgctt ggaaacggcg atcgaaagta tcgaagagtt cccgcacggc 960
 tttaacggcg cgggtcaccc ggtgggttgc gctatcgctc tgaaagcaat cgatgttgtg 1020
 atgaatgagg gtctggcaga gaacgtgcgc cgcctggcac cgcgttttga ggagcgtctg 1080
 aaacacattg ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggttt tatgtgggca 1140
 ctggaggctg tgaaagacaa agcatctaaa accccattcg atggtaatct gctctgtagc 1200
 aaacgtatcg ctaacacctg tcaggaccct ggccctgatct gtagecgcgt gggtcagttc 1260
 gttatcttga gcccgccgtt catctgacc gaggcgcaa tggatgagat gtttgacaaa 1320
 ctggagaagg ctctggacaa agtccttgcg gaggtggcgt aa 1362

<210> 15
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 河流弧菌酶的修饰

<400> 15
 atgaataaac cacaaagctg ggaagcgcgt gctgaaactt actctctgta cggcttcact 60
 gatatgccat ctctgcacga gcgtggtacc gtggttgtca cccacggcga gggcccatac 120
 atcgtggacg tccacggtcg ccgttacctg gacgcaaact ccggcctgta caatatggtt 180
 gccggcttcg accacaaggg tctgategac gcagcaaagg ccagtaega acgcttcccg 240
 ggttaccata gcttcttcgg tcgtatgtct gatcaaacctg ttatgctgag cgagaaactg 300

[0020]

gtagagggtgt ctccattcga cagcggtegc gtgttetata ctaactecgg ctccgaggct	360
aacgatacta tggtagaaat gctgtggttt ctgcacgccg cagagggcaa gccgcaaaaa	420
cgcaaaatcc tgactcgtca aaacgcatac cagggtgtaa ctgctgttcc cgttccatg	480
acgggtctgc cgcacaacte tgtattcggc ctgcectgc cgggtttcgt tcaactgagc	540
tgtccgcaat attggcgta cggcgaagaa ggtgaaaccg aagagcagtt tgttgctcgt	600
ctggcccgcg agctggagga aactatccaa cgtgaaggcg cggacacgat tgcgggcttc	660
tttgctgagc cggtcattgg cgcggcgccg gtaatccgc cggcgaaagg ttacttccag	720
ggatctctgc cgtttctgc taagtacgac atcccgtta tctctgatga agttatctgc	780
ggctttggtc gtaccggtaa tacttggggt tgggttacct atgacttcac cccggatgcg	840
atcatctcca gcaaaaatct gaccgcgggt ttctttccgg ttggtgctgt gattctgggt	900
ccggaactga gcaaacgcct ggaaacggcg atcgaagcta tcgaagagtt cccgcacggc	960
tttacggccg gcggtcacc cgtgggttgc gctatcgtc tgaaagcaat cgatgttgtg	1020
atgaatgagg gtctggcaga gaacgtgcgc cgcctggcac cgcgttttga ggagcgtctg	1080
aaacacattg ccgaacgtcc gaacatcggt gaatatcgtg gcacgggttt taigtgggca	1140
ctggaggetg tgaaagacaa agcatctaaa accccattcg atggtaatct gtctgtgagc	1200
aaacgtatcg ctaacacctg tcaggacctg ggctgatct gtagcgcgat gggtcagtcc	1260
gttatcctga gcccgccgtt catcctgacc gaggcgcaaa tggatgagat gtttgacaaa	1320
ctggagaagg ctctggacaa agtctttgcg gaggtggcgt aa	1362