(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5707344号
(P5707344)

(45)発行日　平成27年4月30日(2015.4.30)　(24)登録日　平成27年3月6日(2015.3.6)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 9/10	(2006.01)	C12N	9/10	ZNA
C12P 13/00	(2006.01)	C12P	13/00	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 59　(全 128 頁)

(21)出願番号	特願2011-552209 (P2011-552209)
(86)(22)出願日	平成22年2月26日(2010.2.26)
(65)公表番号	特表2012-519004 (P2012-519004A)
(43)公表日	平成24年8月23日(2012.8.23)
(86)国際出願番号	PCT/US2010/025685
(87)国際公開番号	WO2010/099501
(87)国際公開日	平成22年9月2日(2010.9.2)
審査請求日	平成25年2月21日(2013.2.21)
(31)優先権主張番号	61/155,902
(32)優先日	平成21年2月26日(2009.2.26)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　502427921
コデクシス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０６３，　レッドウッド　シティ，　ペノブスコット　ドライブ　２００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　サビル，　クリストファー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０６３，　レッドウッド　シティ，　ペノブスコット　ドライブ　２００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トランスアミナーゼ生体触媒

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（「ケトアミド基質」）を、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン（「生成物」）に、変換することができるトランスアミナーゼポリペプチドであって、該トランスアミナーゼポリペプチドが、配列番号４と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：

（１）配列番号２のＸ２２３に対応する残基がＰである；

（２）配列番号２のＸ６９に対応する残基がＧ、Ｃ、Ｔ、ＡまたはＳであり、かつ、配列番号２のＸ２８４に対応する残基がＧである；および

（３）配列番号２のＸ１２２に対応する残基がＭ、Ｉ、ＶまたはＨである、

を含むトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項２】

前記トランスアミナーゼポリペプチドが、配列番号４と少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるか、または、配列番号４と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項３】
前記ケトアミド基質を前記生成物に、
ｉ）規定された反応条件下で、アミノ基ドナーであるイソプロピルアミンの存在下で、２１０ｎｍでのＨＰＬＣ－ＵＶによって検出可能な前記生成物のレベルまで、かつ、該規定された反応条件下で、配列番号４のポリペプチドの活性以上である活性を伴って変換することができ、ここで、該反応条件は、２ｇ／Ｌのケトアミド基質、０．５Ｍのイソプロピルアミン、２２℃、ｐＨ７．５、５％のＤＭＳＯ、１００μＭのリン酸ピリドキサール、および２０ｍｇ／ｍＬのトランスアミナーゼポリペプチドを含む；
ｉｉ）少なくとも９０％の鏡像異性体過剰率で変換することができる；または
ｉｉｉ）少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で変換することができる、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項４】
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
ｉ）Ｘ６９が、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり、Ｘ２２３がＰである；
ｉｉ）Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；
ｉｉｉ）Ｘ６９が、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；あるいは
ｉｖ）Ｘ６９がＣまたはＴであり；Ｘ１２２がＭまたはＩであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；
を含む、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項５】
前記アミノ酸配列が、配列番号２と比較した場合に、以下の残基位置：Ｘ４；Ｘ５；Ｘ８；Ｘ１８；Ｘ２５；Ｘ２６；Ｘ２７；Ｘ２８；Ｘ３０；Ｘ４１；Ｘ４２；Ｘ４８；Ｘ４９；Ｘ５０；Ｘ５４；Ｘ５５；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１１７；Ｘ１２０；Ｘ１２４；Ｘ１２６；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１３８；Ｘ１４６；Ｘ１４８；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１５５；Ｘ１５６；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６４；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０４；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２、Ｘ２９２；Ｘ２９７；Ｘ３０２；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９の１つまたは複数で残基差異をさらに含む、請求項１から４のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項６】
前記残基位置における前記アミノ酸残基差異が、以下：
Ｘ４がＹであり；
Ｘ５がＫであり；
Ｘ８がＰであり；
Ｘ１８が、ＣまたはＩであり；
Ｘ２５がＱであり；
Ｘ２６がＨであり；
Ｘ２７がＴであり；
Ｘ２８がＰであり；
Ｘ３０が、ＱまたはＭであり；
Ｘ４１が、ＨまたはＳであり；
Ｘ４２がＧであり；
Ｘ４８が、Ｑ、Ｄ、Ｖ、Ｇ、またはＡであり；
Ｘ４９がＴであり；
Ｘ５０がＬであり；
Ｘ５４が、ＰまたはＨであり；

Ｘ５５がＶであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、Ｔ、ＹまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１０２が、ＬまたはＫであり；
Ｘ１１７がＧであり；
Ｘ１２０がＹであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；
Ｘ１２６がＴであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１３７が、ＴまたはＩであり；
Ｘ１３８が、ＫまたはＰであり；
Ｘ１４６がＲであり；
Ｘ１４８が、ＡまたはＦであり；
Ｘ１５０が、Ｆ、Ｈ、またはＳであり；
Ｘ１５２が、Ｇ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；
Ｘ１５５が、Ｍ、ＶまたはＴであり；
Ｘ１５６がＱであり；
Ｘ１６０がＬであり；
Ｘ１６３が、ＨまたはＶであり；
Ｘ１６４が、ＶまたはＰであり；
Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１７４がＡであり；
Ｘ１７８がＳであり；
Ｘ１９５が、ＦまたはＱであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０４がＡであり；
Ｘ２０８が、Ｈ、Ｃ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｙ、ＤまたはＳであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１１がＩであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２２５がＹであり；
Ｘ２３０がＶであり；
Ｘ２５２がＦであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９２がＴであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３０２がＡであり；
Ｘ３０６がＬであり；
Ｘ３２１がＰであり；
Ｘ３２９がＨである；
から選択される、請求項５に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項７】

前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ２６がＨであり、かつ／またはＸ６２が、Ｔもしくは Ｆであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ１３６がＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、Ｗ、または Ｉであり；
Ｘ２０９がＬである；
をさらに含む、請求項６に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項８】
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２８２がＳである；
をさらに含む、請求項６から７のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項９】
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、請求項６から８のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項１０】
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；

Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、請求項６から９のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項１１】
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；
Ｘ１２６がＴであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１５０が、Ｆ、Ｈ、またはＳであり；
Ｘ１５２が、Ｇ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；
Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、請求項６から１０のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項１２】
前記アミノ酸配列が、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

【請求項１３】
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号４のポリペプチドより少なくとも５０～１００倍以上の活性を伴って変換することができる、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１４】
前記アミノ酸配列が、配列番号１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、請求項１３に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１５】
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号２２のポリペプチドより少なくとも１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１６】
前記アミノ酸配列が、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、請求項１５に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１７】
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号４８のポリペプチドより少なくとも１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１８】
前記アミノ酸配列が、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、請求項１７に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項１９】
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号５８のポリペプチドより１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、請求項１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項２０】
前記アミノ酸配列が、配列番号６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、請求項１９に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
【請求項２１】

請求項１から２０のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項２２】

１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７の配列に対応する、請求項２１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２３】

請求項２１または２２に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項２４】

制御配列をさらに含む、請求項２３に記載の発現ベクター。

【請求項２５】

前記制御配列がプロモーターを含む、請求項２４に記載の発現ベクター。

【請求項２６】

前記制御配列が分泌シグナルを含む、請求項２４に記載の発現ベクター。

【請求項２７】

請求項２３から２６のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

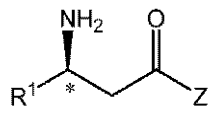
【請求項２８】

Ｅ．ｃｏｌｉである、請求項２７に記載の宿主細胞。

【請求項２９】

＊で印を付けられた立体中心で、示された立体化学配置を有する構造式（Ｉ）の化合物：

【化２２】



(I)

を、反対の鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法であって、式中、

Ｚは、ＯＲ^{2}またはＮＲ^{2}Ｒ^{3}であり；

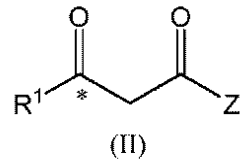
Ｒ^{1}は、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキル、またはヘテロアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；

Ｒ^{2}およびＲ^{3}はそれぞれ独立に、水素、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、またはアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；あるいは

Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、これらが結合している窒素原子と一緒に、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、およびＮＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択される追加のヘテロ原子を任意選択により含有する、４～７員の複素環系を形成し、前記複素環は、非置換であるか、またはオキソ、ヒドロキシ、ハロゲン、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびＣ$_{1\sim4}$アルキルから独立して選択される１～３個の置換基で置換されており、アルキルおよびアルコキシは、非置換であるか、または１～５個のフッ素で置換されており；前記複素環系は、５～６員の飽和もしくは芳香族炭素環系、またはＯ、Ｓ、およびＮＣ$_{0\sim4}$アルキルから選択される１～２個のヘテロ原子を含有する、５～６員の飽和もしくは芳香族複素環系と任意選択により縮合されており、前記縮合環系は、非置換であるか、またはヒドロキシ、アミノ、フッ素、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびトリフルオロメチルから選択される１～２個の置換基で置換されており；

前記方法は、構造式（ＩＩ）のプロキラルケトン

【化２３】



(II)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、請求項１から２０のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

【請求項３０】

R^1がベンジルであり、ベンジルのフェニル基が、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から選択される１～３個の置換基で置換されている、請求項２９に記載の方法。

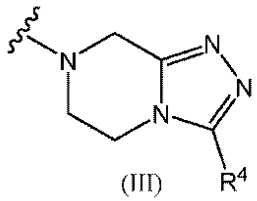
【請求項３１】

ＺがＮR^2 R^3である、請求項２９に記載の方法。

【請求項３２】

ＮR^2 R^3が構造式（ＶＩＩ）の複素環：

【化２４】



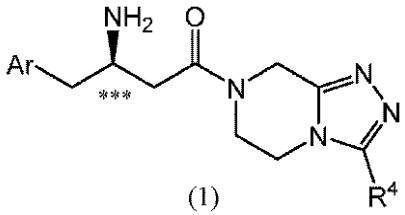
(III)

であり、R^4が水素または$C_{1\sim4}$アルキルであり、前記$C_{1\sim4}$アルキルは、非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換されている、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

＊＊＊で印を付けられた立体中心で、（Ｒ）－配置を有する構造式（１）の化合物：

【化２５】



(1)

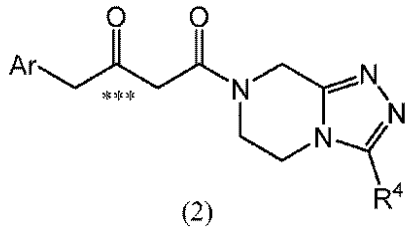
を、反対の（Ｓ）配置を有する鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法であって、式中、

Ａｒは、フェニルであり、前記フェニルは、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から独立して選択される１～５個の置換基で置換されており；

R^4は、水素、または$C_{1\sim4}$アルキルであり、前記$C_{1\sim4}$アルキルは、非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換され；

前記方法は、構造式（２）のプロキラルケトン：

【化２６】



(2)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、請求項１から２０のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

【請求項３４】

Ａｒが、２，５－ジフルオロフェニルまたは２，４，５－トリフルオロフェニルであり、R^4がトリフルオロメチルである、請求項３３に記載の方法。

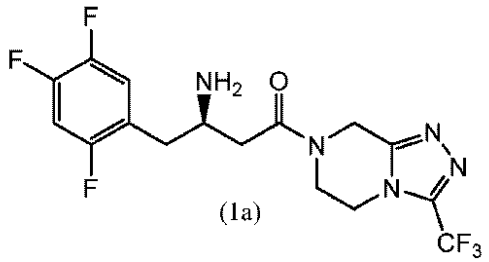
【請求項３５】

Ａｒが２，４，５－トリフルオロフェニルである、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

式（１ａ）の化合物：

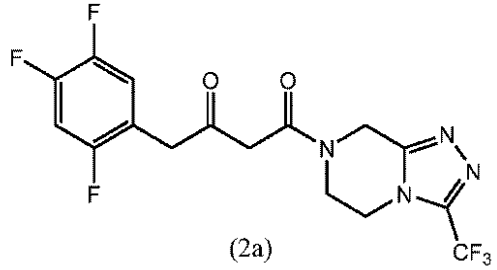
【化２７】



(1a)

を調製するための方法であって、式（２ａ）の基質：

【化２８】



(2a)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、請求項１から２０のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

【請求項３７】

式（Ｉ）の前記化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の前記化合物が、少なくとも９０％の鏡像異性体過剰率で製造される、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。

【請求項３８】

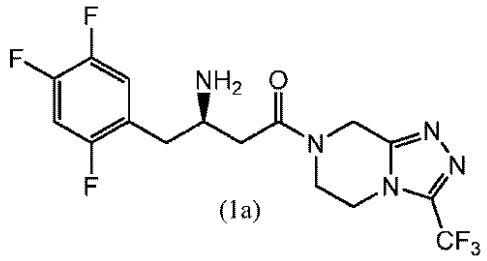
式（Ｉ）の前記化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の前記化合物が、少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で製造される、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。

【請求項３９】

前記アミノ基ドナーが、イソプロピルアミン、アラニン、３－アミノ酪酸、またはメチルベンジルアミンから選択される、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。

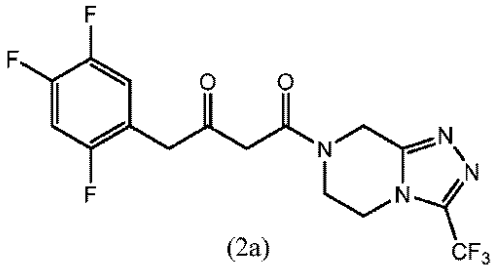
【請求項４０】
前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンである、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記反応のカルボニル副生成物を除去する工程をさらに含む、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。
【請求項４２】
前記アミノ基ドナーがアミノ酸であり、前記カルボニル副生成物がケト酸である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記カルボニル副生成物が、水より高い蒸気圧を有し、前記カルボニル副生成物の除去が、非反応性ガスを用いたスパージングによるもの、または真空を適用することによるものである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記非反応性ガスが窒素ガスである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンであり、前記カルボニル副生成物がアセトンである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記反応条件が、７．０のｐＨ～９．０のｐＨの間である、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。
【請求項４７】
前記反応条件が、８．５のｐＨである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記ｐＨが、イソプロピルアミンを添加することによって維持される、請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】
前記反応条件が、２５℃～５０℃の温度である、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。
【請求項５０】
前記反応条件が、４５℃の温度である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記溶媒がジメチルスルホキシドを含む、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。
【請求項５２】
前記ＤＭＳＯが１０％～５０％（ｖ／ｖ）の間である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記ＤＭＳＯが、３０％ｖ／ｖである、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記反応から構造式（Ｉ）の前記化合物、構造式（１）の前記化合物、または構造式（１ａ）の前記化合物を単離する工程をさらに含む、請求項２９、３３、または３６に記載の方法。
【請求項５５】
構造式（１）の前記化合物、または構造式（１ａ）の前記化合物を、適切な反応溶媒中で、薬学的に許容される酸と前記化合物とを接触させることによって、薬学的に許容される塩に変換する工程をさらに含む、請求項３３または３６に記載の方法。
【請求項５６】
前記薬学的に許容される酸がリン酸であり、前記薬学的に許容される塩がリン酸二水素塩である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記反応溶媒から前記薬学的に許容される塩を結晶化させる工程をさらに含む、請求項

５５に記載の方法。
【請求項５８】
（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンホスフェート（１：１）一水和物を調製するための方法を改善するための方法であって、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、請求項１から２０のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドを用いて、式（１ａ）の化合物を式（２ａ）の生成物に変換する工程を含み、式（１ａ）の前記化合物が、
【化２９】



(1a)

であり、式（２ａ）の化合物が：
【化３０】



(2a)

である、方法。
【請求項５９】
前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンである、請求項５８に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本願は、米国特許法第１１９条（ｅ）項の下、２００９年２月２６日に出願された米国仮特許出願第６１／１５５，９０２号の利益を主張し、この米国仮特許出願の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
技術分野
本開示は、トランスアミナーゼ生体触媒、およびこの生体触媒を使用する方法に関する。
【０００３】
配列表、配列の表、またはコンピュータープログラムに対する参照
配列表の公式の写しは、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩ形式テキストファイルとして、明細書と同時に提出されており、ファイル名は３７６２４７－０３５．ｔｘｔであり、作成日は２０１０年２月２６日であり、ファイルサイズは３６７Ｋｂｙｔｅｓである。

ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出された配列表は、明細書の一部であり、参照により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【０００４】

背景

食事を摂取した後に、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）およびグルコース依存性インスリン分泌性ペプチド（ＧＩＰ）を含む、インクレチンと呼ばれる一群のホルモンが放出される。インクレチンは、グルコース依存様式でインスリン放出を刺激し、グルカゴン放出を抑制し、胃内容排出を遅延させ、飽満を増大させる。インクレチンは、ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ（ＤＰＰ－４）によって急速に分解される。

【０００５】

シタグリプチンは、ＤＰＰ－４を阻害する血糖降下薬のクラスの１つである。ＤＰＰ－４活性を阻害し、それによってインクレチンの不活性化を遅延させることは、グルコースに対するα細胞およびβ細胞の応答性を増大させることによって膵島機能を改善し、グルコース依存性インスリン分泌の改善、不適切なグルカゴン分泌の低減をもたらすように思われる。その血糖降下作用のために、シタグリプチンは、多数の国において２型糖尿病を治療するのに使用することが認可されている。

【０００６】

シタグリプチンを製造するための現在の製造方法は、保護されていないエナミンアミドの非対称水素化を特徴とする（２００８年１２月２３日に発行された、その内容全体が参照により組み込まれている特許文献１；非特許文献１）。５０℃および２５０ｐｓｉで、メタノール中でロジウムＪｏｓｉｐｈｏｓ配位子触媒を使用することにより、約９７％の鏡像異性体過剰率を伴って、遊離塩基としてシタグリプチンが提供される。遊離塩基の結晶化アップグレードにより、９９．５％超の鏡像異性体過剰率、および８４％の収率を伴ってシタグリプチンが得られ、引き続いてリン酸と反応させることによって、エナミンアミド基質から約７９％の全収率で、ＪＡＮＵＶＩＡ（登録商標）中の医薬活性成分（「ＡＰＩ」）であるリン酸シタグリプチン一水和物が得られる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】米国特許第７，４６８，４５９号明細書

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｓｈｕｌｔｚら、２００７年、Ａｃｃ．　Ｃｈｅｍ．　Ｒｅｓ．　４０巻：１３２０～１３２６頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

シタグリプチンの製造方法のさらなる改善が望ましい。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本開示は、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（「ケトアミド基質」）を、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン（「生成物」）に、アミノ基ドナーの存在下で生体触媒変換するための、ポリペプチド、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびこのポリペプチドを使用する方法を提供する。シタグリプチンの米国一般名を有するこの生成物は、ＪＡＮＵＶＩＡ（登録商標）中の活性成分であり、これは、２型糖尿病を治療するた

めに、多くの国において販売承認を受けている。

【００１１】

本発明者らによって測定された天然に存在するトランスアミナーゼは、ケトアミド基質に対して測れる程度に作用しない一方で、本開示の操作されたトランスアミナーゼは、ケトアミド基質の生成物への容易な変換を実施することができる。したがって一態様では、本開示は、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（「ケトアミド基質」）を、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン（「生成物」）に、アミノ基ドナーの存在下で、ＨＰＬＣ－ＵＶ吸光度などの分析技法によって測定可能なレベルまで変換することができる、改善されたトランスアミナーゼに関する。

【００１２】

いくつかの実施形態では、本開示の改善されたトランスアミナーゼは、ケトアミド基質の、配列番号４のポリペプチドの活性と少なくとも等しいか、またはそれ以上の活性を有する生成物への変換を実施することができる。本明細書の実施形態では、改善されたトランスアミナーゼは、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％、またはそれ以上の鏡像異性体過剰率で生成物を形成することができる。

【００１３】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼは、規定反応条件下で、ケトアミド基質の、配列番号４のポリペプチドの活性の少なくとも１．５倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、７５倍、１００倍、１５０倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、１０００倍、１５００倍、２０００倍、または２０００倍超を有する生成物への変換を実施することができる。いくつかの実施形態では、反応条件は、４５℃の温度、および約８．５のｐＨを含む。

【００１４】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナーの存在下で、配列番号２のトランスアミナーゼの活性に対して改善された活性を伴って変換することができ、配列番号４、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、または１０２の参照配列と、少なくとも８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

【００１５】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、Ｘ４；Ｘ５；Ｘ８；Ｘ１８；Ｘ２５；Ｘ２６；Ｘ２７；Ｘ２８；Ｘ３０；Ｘ４１；Ｘ４２；Ｘ４８；Ｘ４９；Ｘ５０；Ｘ５４；Ｘ５５；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ６９；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１１７；Ｘ１２０；Ｘ１２２；Ｘ１２４；Ｘ１２６；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１３８；Ｘ１４６；Ｘ１４８；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１５５；Ｘ１５６；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６４；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０４；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２３；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２、Ｘ２８４；Ｘ２９２；Ｘ２

９７；Ｘ３０２；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９に対応する以下の残基位置で、配列番号２の配列と比較して、１つまたは複数の残基差異を含むアミノ酸配列を含むことができる。指定された残基位置で存在することができる様々なアミノ酸残基の選択についてのガイダンスは、以下に続く詳細な説明において提供されている。

【００１６】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、以下の特徴のうちの少なくとも１つを含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９に対応する残基が、システイン（Ｃ）または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基であり；Ｘ２８４に対応する残基が非極性残基である。

【００１７】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９に対応する残基が、Ｃまたは非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり、かつ／またはＸ２８４に対応する残基が非極性残基であり；Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基である。

【００１８】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９に対応する残基が、Ｃまたは非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基である。

【００１９】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９に対応する残基が、Ｃまたは非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基であり；Ｘ２８４に対応する残基が非極性残基である。

【００２１】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、残基Ｘ６９位、Ｘ１２２位、Ｘ２２３位、およびＸ２８４位の１つまたは複数について本明細書に記載される特徴に加えて、少なくとも以下の特徴をさらに含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基もしくは拘束性残基であり、かつ／またはＸ６２が、芳香族残基もしくは極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基である。

【００２２】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、残基Ｘ６９位、Ｘ１２２位、Ｘ２２３位、およびＸ２８４位の１つまたは複数について本明細書に記載される特徴に加えて、少なくとも以下の特徴をさらに含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２８２が極性残基である。

【００２３】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、残基Ｘ６９位、Ｘ１２２位、Ｘ２２３位、およびＸ２８４位の１つまたは複数について本明細書に記

載される特徴に加えて、少なくとも以下の特徴をさらに含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【００２４】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、残基Ｘ６９位、Ｘ１２２位、Ｘ２２３位、およびＸ２８４位の１つまたは複数について本明細書に記載される特徴に加えて、少なくとも以下の特徴をさらに含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が非極性残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【００２５】

いくつかの実施形態では、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の配列に対応するアミノ酸配列を含む。

【００２６】

さらなる態様では、本開示は、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、トランスアミナーゼポリペプチドを発現するための１つまたは複数の制御配列を有する発現ベクターの一部とすることができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７の配列に対応する配列を含むことができる。

【００２７】

別の態様では、本開示は、操作されたトランスアミナーゼをコードするポリヌクレオチド、または操作されたトランスアミナーゼを発現することができる発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌性宿主細胞とすることができる。宿主細胞は、本明細書に記載される操作されたトランスアミナーゼ酵素を発現させ、単離するために使用することができ、または代わりに、これらは、ケトアミド基質を生成物に変換するために直接使用することができる。

【００２８】

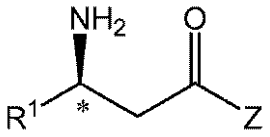
いくつかの実施形態では、全細胞、粗抽出物、単離ポリペプチド、または精製ポリペプチドの形態での操作されたトランスアミナーゼは、個々に、または異なる操作されたトランスアミナーゼの組合せとして使用することができる。

【００２９】

さらなる態様では、本明細書に記載される、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、アミノ基ドナーの存在下で、ある特定のアミノ基アクセプター（例えば、ケトンアクセプター）のアミノ基転移のための方法において使用することができる。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼは、＊で印を付けられた立体中心で、示された立体化学配置を有する構造式（Ｉ）の化合物：

【００３０】

【化１】



(I)

【００３１】

を、反対の鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法において使用することができ、式中、

ＺはＯＲ^{2}またはＮＲ^{2}Ｒ^{3}であり；

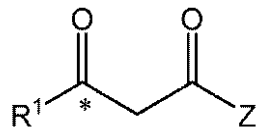
Ｒ^{1}は、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキル、またはヘテロアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；

Ｒ^{2}およびＲ^{3}はそれぞれ独立に、水素、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、またはアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；あるいは

Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、これらが結合している窒素原子と一緒に、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、およびＮＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択される追加のヘテロ原子を任意選択により含有する、４～７員の複素環系を形成し、この複素環は、非置換であるか、またはオキソ、ヒドロキシ、ハロゲン、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびＣ$_{1\sim4}$アルキルから独立して選択される１～３個の置換基で置換されており、アルキルおよびアルコキシは、非置換であるか、または１～５個のフッ素で置換されており；この複素環系は、５～６員の飽和もしくは芳香族炭素環系、またはＯ、Ｓ、およびＮＣ$_{0\sim4}$アルキルから選択される１～２個のヘテロ原子を含有する、５～６員の飽和もしくは芳香族複素環系と任意選択により縮合されており、この縮合環系は、非置換であるか、またはヒドロキシ、アミノ、フッ素、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびトリフルオロメチルから選択される１～２個の置換基で置換されており、この方法は、構造式（ＩＩ）のプロキラルケトン：

【００３２】

【化２】



(II)

【００３３】

を、式（ＩＩ）の化合物を式（Ｉ）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、上記に開示された改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。

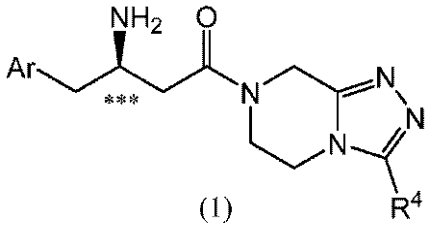
【００３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される、改善された、操作されたトランスア

ミナーゼポリペプチドは、＊＊＊で印を付けられた立体中心で、（Ｒ）－配置を有する構造式（１）の化合物：

【００３５】

【化３】



(1)

【００３６】

を、反対の（Ｓ）配置を有する鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法において使用することができ、式中、

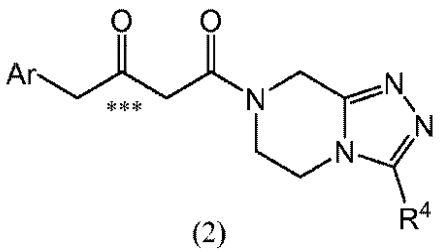
Ａｒは、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から独立して選択される１～５個の置換基で置換されているフェニルであり；

Ｒ^{4}は、水素、または非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換されたＣ$_{1\sim4}$アルキルであり、

この方法は、構造式（２）のプロキラルケトン：

【００３７】

【化４】



(2)

【００３８】

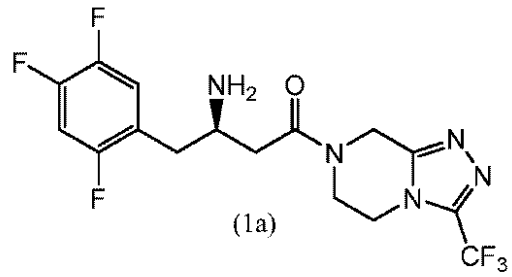
を、式（２）の化合物を式（１）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。この方法のいくつかの実施形態では、式（２）のＡｒは、２，５－ジフルオロフェニルまたは２，４，５－トリフルオロフェニルであり、Ｒ^{4}は、トリフルオロメチルである。この方法のいくつかの実施形態では、式（２）のＡｒは、２，４，５－トリフルオロフェニルである。

【００３９】

いくつかの実施形態では、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、式（１ａ）の化合物、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン：

【００４０】

【化５】



(1a)

【００４１】

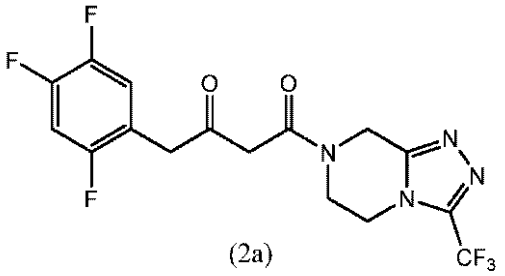
を鏡像体過剰で調製するための方法において使用することができる。

【００４２】

これらの実施形態において、この方法は、構造式（２ａ）のプロキラルケトン、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン）：

【００４３】

【化６】



(2a)

【００４４】

を、式（２ａ）の化合物を式（１ａ）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。

【００４５】

上記方法のいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の化合物は、少なくとも７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上の鏡像異性体過剰率で製造される。この方法のいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の化合物は、少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で製造される。

【００４６】

アミノ基ドナーの選択により、水より高い蒸気圧を有するカルボニル副生成物（例えば、揮発性有機カルボニル化合物などの低沸点副産物）が生じる、上記方法のいくつかの実施形態では、カルボニル副生成物が、反応溶液を非反応性ガス（例えば、窒素）でスパージングすることによって、または真空を適用することにより反応圧力を低下させ、気相中に存在するカルボニル副生成物を除去することによって除去される方法を実施することができる。

【００４７】

上記方法に有用な、改善された、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１

２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。

【００４８】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に開示される操作されたトランスアミナーゼを使用して、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンを調製するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される操作されたトランスアミナーゼポリペプチドと、このケトアミド基質を、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに変換するのに適した反応条件下で接触させる工程を含む。

【００４９】

いくつかの実施形態では、この方法は、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンを、少なくとも９０％の鏡像異性体過剰率で形成することができる。

【００５０】

いくつかの実施形態では、この方法は、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンを、少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で形成することができる。

【００５１】

いくつかの実施形態では、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに変換するための方法は、約５０ｇ／Ｌのケトアミド基質を、約５ｇ／Ｌの本明細書に記載されるトランスアミナーゼと、ｐＨ８．５および４５℃の反応条件下で、１Ｍのイソプロピルアミンの存在下で接触させる工程を含み、２４時間で、ケトアミド基質の少なくとも９０％が生成物に変換される。いくつかの実施形態では、前述の反応を実施することができるトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号８０、８６、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

（項目１）

４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（「ケトアミド基質」）を、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン（「生成物」）に、規定された反応条件下で、アミノ基ドナーであるイソプ

ロピルアミンの存在下で、２１０ｎｍでのＨＰＬＣ－ＵＶによって検出可能な前記生成物のレベルまで変換することができるトランスアミナーゼポリペプチドであって、前記反応条件は、約２ｇ／Ｌのケトアミド基質、約０．５Ｍのイソプロピルアミン、約２２℃、約ｐＨ７．５、約５％のＤＭＳＯ、約１００μＭのリン酸ピリドキサール、および約２０ｍｇ／ｍＬのトランスアミナーゼポリペプチドを含むトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目２）

前記ケトアミド基質を前記生成物に、前記規定された反応条件下で、配列番号４のポリペプチドの活性以上である活性を伴って変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３）

前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を、少なくとも９０％の鏡像異性体過剰率で生成物に変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目４）

前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を、少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で生成物に変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目５）

配列番号４と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１から４のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目６）

前記アミノ酸配列が、Ｘ６２、Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、Ｘ２８２、およびＸ２８４から選択される１つまたは複数の残基位置で、配列番号２と比較した場合に残基差異を含む、項目５に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目７）

前記残基差異が、Ｘ６９、Ｘ１２２、およびＸ２８４から選択される１つまたは複数の残基位置における残基差異と組み合わせて、Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、およびＸ２８２から選択される１つまたは複数の残基位置で発生する、項目５に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目８）

前記アミノ酸配列が、以下の特徴：

Ｘ６９に対応する残基が、システイン（Ｃ）、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；

Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；

Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基であり；

Ｘ２８４に対応する残基が非極性残基である；

の少なくとも１つまたはそれ以上を含む、項目６または７に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目９）

前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：

（１）Ｘ６９に対応する残基が、Ｃ、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり、かつ／あるいはＸ２８４に対応する残基が非極性残基であり；

（２）Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；

（３）Ｘ２２３に対応する残基が拘束性残基である；

を含む、項目８に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目１０）

前記アミノ酸配列が、以下の特徴：

Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基である；

を含む、項目９に記載のトランスアミナーゼポリペプチド：
（項目１１）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ６９が、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり、Ｘ２２３がＰである；
を含む、項目１０に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１２）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基である；
を含む、項目９に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１３）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；
を含む、項目１２に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１４）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基である；
を含む、項目８に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１５）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ６９が、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｍ、Ｉ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；
を含む、項目１４に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１６）
前記アミノ酸配列が、以下の特徴：
Ｘ６９がＣまたはＴであり；Ｘ１２２がＭまたはＩであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである；
を含む、項目９に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１７）
前記アミノ酸配列が、配列番号２と比較した場合に、以下の残基位置：Ｘ４；Ｘ５；Ｘ８；Ｘ１８；Ｘ２５；Ｘ２６；Ｘ２７；Ｘ２８；Ｘ３０；Ｘ４１；Ｘ４２；Ｘ４８；Ｘ４９；Ｘ５０；Ｘ５４；Ｘ５５；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１１７；Ｘ１２０；Ｘ１２４；Ｘ１２６；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１３８；Ｘ１４６；Ｘ１４８；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１５５；Ｘ１５６；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６４；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０４；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２、Ｘ２９２；Ｘ２９７；Ｘ３０２；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９の１つまたは複数で残基差異をさらに含む、項目８から１６のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１８）
前記残基位置における前記アミノ酸残基差異が、以下：
Ｘ４が芳香族残基であり；
Ｘ５が塩基性残基であり；
Ｘ８が拘束性残基であり；
Ｘ１８が、システイン（Ｃ）または脂肪族残基であり；
Ｘ２５が極性残基であり；
Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基であり；

Ｘ２７が極性残基であり；
Ｘ２８が拘束性残基であり；
Ｘ３０が、極性残基または非極性残基であり；
Ｘ４１が、拘束性残基または極性残基であり；
Ｘ４２が非極性残基であり；
Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基または非極性残基であり；
Ｘ４９が極性残基であり；
Ｘ５０が脂肪族残基であり；
Ｘ５４が拘束性残基であり；
Ｘ５５が脂肪族残基であり；
Ｘ６０が芳香族残基であり；
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ９６が脂肪族残基であり；
Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基であり；
Ｘ１１７が非極性残基であり；
Ｘ１２０が芳香族残基であり；
Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；
Ｘ１２６が極性残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基であり；
Ｘ１３８が、塩基性残基または拘束性残基であり；
Ｘ１４６が塩基性残基であり；
Ｘ１４８が、脂肪族残基または芳香族残基であり；
Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基であり；
Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基であり；
Ｘ１５５が、非極性残基または極性残基であり；
Ｘ１５６が極性残基であり；
Ｘ１６０が脂肪族残基であり；
Ｘ１６３が、脂肪族残基または拘束性残基であり；
Ｘ１６４が、脂肪族残基または拘束性残基であり；
Ｘ１６９が脂肪族残基であり；
Ｘ１７４が脂肪族残基であり；
Ｘ１７８が極性残基であり；
Ｘ１９５が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；
Ｘ２０４が脂肪族残基であり；
Ｘ２０８が、システイン（Ｃ）、または拘束性残基、非極性残基、芳香族残基、極性残基、もしくは塩基性残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１１が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がシステイン（Ｃ）であり；
Ｘ２１７が極性残基であり；
Ｘ２２５が芳香族残基であり；
Ｘ２３０が脂肪族残基であり；
Ｘ２５２が芳香族残基であり；
Ｘ２６９が拘束性残基であり；

Ｘ２７３が芳香族残基であり；
Ｘ２８２が極性残基であり；
Ｘ２９２が極性残基であり；
Ｘ２９７が極性残基であり；
Ｘ３０２が、脂肪族残基であり；
Ｘ３０６が、脂肪族残基であり；
Ｘ３２１が拘束性残基であり；
Ｘ３２９が、拘束性残基、または芳香族残基である；
から選択される、項目１７に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目１９）
前記残基位置における前記アミノ酸残基差異が、以下：
Ｘ４がＹであり；
Ｘ５がＫであり；
Ｘ８がＰであり；
Ｘ１８が、ＣまたはＩであり；
Ｘ２５がＱであり；
Ｘ２６がＨであり；
Ｘ２７がＴであり；
Ｘ２８がＰであり；
Ｘ３０が、ＱまたはＭであり；
Ｘ４１が、ＨまたはＳであり；
Ｘ４２がＧであり；
Ｘ４８が、Ｑ、Ｄ、Ｖ、Ｇ、またはＡであり；
Ｘ４９がＴであり；
Ｘ５０がＬであり；
Ｘ５４が、ＰまたはＨであり；
Ｘ５５がＶであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、Ｔ、ＹまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１０２が、ＬまたはＫであり；
Ｘ１１７がＧであり；
Ｘ１２０がＹであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；
Ｘ１２６がＴであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１３７が、ＴまたはＩであり；
Ｘ１３８が、ＫまたはＰであり；
Ｘ１４６がＲであり；
Ｘ１４８が、ＡまたはＦであり；
Ｘ１５０が、Ｆ、Ｈ、またはＳであり；
Ｘ１５２が、Ｇ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；
Ｘ１５５が、Ｍ、ＶまたはＴであり；
Ｘ１５６がＱであり；
Ｘ１６０がＬであり；
Ｘ１６３が、ＨまたはＶであり；

Ｘ１６４が、ＶまたはＰであり；
Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１７４がＡであり；
Ｘ１７８がＳであり；
Ｘ１９５が、ＦまたはＱであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０４がＡであり；
Ｘ２０８が、Ｈ、Ｃ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｙ、ＤまたはＳであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１１がＩであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２２５がＹであり；
Ｘ２３０がＶであり；
Ｘ２５２がＦであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９２がＴであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３０２がＡであり；
Ｘ３０６がＬであり；
Ｘ３２１がＰであり；
Ｘ３２９がＨである；
から選択される、項目１８に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２０）
前記アミノ酸配列が、以下：
Ｘ２６が、芳香族残基、または拘束性残基であり；
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基、または極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１３７が、極性残基、または脂肪族残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基、または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２８２が極性残基である；
から選択される１つまたは複数の残基差異をさらに含む、項目１８に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２１）
前記アミノ酸配列が、以下：
Ｘ８が拘束性残基であり；
Ｘ６０が芳香族残基であり；
Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；
Ｘ９６が脂肪族残基であり；
Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；
Ｘ１６９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１７が極性残基であり；
Ｘ２６９が拘束性残基であり；

Ｘ２７３が芳香族残基であり；
Ｘ２９７が極性残基であり；
Ｘ３２１が拘束性残基である；
から選択される１つまたは複数の残基差異をさらに含む、項目２０に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２２）
前記アミノ酸配列が、以下：
Ｘ４が芳香族残基であり；
Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基、または非極性残基であり；
Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基であり；
Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基、または極性残基であり；
Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基であり；
Ｘ１６０が脂肪族残基であり；
Ｘ１６３が、脂肪族残基、または拘束性残基であり；
Ｘ１７４が脂肪族残基であり；
Ｘ１７８が極性残基であり；
Ｘ１９５が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ２０８が、システイン（Ｃ）、または拘束性残基、非極性残基、芳香族残基、極性残基、もしくは塩基性残基であり；
Ｘ２１１が脂肪族残基であり；
Ｘ２２５が芳香族残基であり；
Ｘ２３０が脂肪族残基であり；
Ｘ２５２が芳香族残基であり；
Ｘ２９２が極性残基であり；
Ｘ３０６が脂肪族残基であり；
Ｘ３２９が、拘束性残基または芳香族残基である；
から選択される１つまたは複数の残基差異をさらに含む、項目２０または２１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２３）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ２６が、芳香族残基、もしくは拘束性残基であり、かつ／またはＸ６２が、芳香族残基、もしくは極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基、または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基である；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２４）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２８２が極性残基である；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチ

ド。
（項目２５）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８が拘束性残基であり；
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７が極性残基であり；
Ｘ２６９が拘束性残基であり；
Ｘ２８２が極性残基であり；
Ｘ２９７が極性残基であり；
Ｘ３２１が拘束性残基である；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２６）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８が拘束性残基であり；
Ｘ６０が芳香族残基であり；
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；
Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ９６が脂肪族残基であり；
Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１６９が脂肪族残基であり；
Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７が極性残基であり；
Ｘ２６９が拘束性残基であり；
Ｘ２７３が芳香族残基であり；
Ｘ２８２が極性残基であり；
Ｘ２９７が極性残基であり；
Ｘ３２１が拘束性残基である；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。
（項目２７）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８が拘束性残基であり；
Ｘ６０が芳香族残基であり；
Ｘ６１が芳香族残基であり；
Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；

Ｘ６５が脂肪族残基であり；
Ｘ８１が非極性残基であり；
Ｘ９４が脂肪族残基であり；
Ｘ９６が脂肪族残基であり；
Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；
Ｘ１２６が極性残基であり；
Ｘ１３６が芳香族残基であり；
Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基、または極性残基であり；
Ｘ１５２が、システイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基であり；
Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基、または芳香族残基であり；
Ｘ２０９が脂肪族残基であり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７が極性残基であり；
Ｘ２６９が拘束性残基であり；
Ｘ２７３が芳香族残基であり；
Ｘ２８２が極性残基であり；
Ｘ２９７が極性残基であり；
Ｘ３２１が拘束性残基である；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目２８）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ２６がＨであり、かつ／またはＸ６２が、ＴもしくはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ１３６がＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、Ｗ、またはＩであり；
Ｘ２０９がＬである；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目２９）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２８２がＳである；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３０）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；

Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３１）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３２）
前記アミノ酸配列が、少なくとも以下の特徴：
Ｘ８がＰであり；
Ｘ６０がＦであり；
Ｘ６１がＹであり；
Ｘ６２が、ＴまたはＦであり；
Ｘ６５がＡであり；
Ｘ８１がＧであり；
Ｘ９４が、ＩまたはＬであり；
Ｘ９６がＬであり；
Ｘ１２４が、Ｔ、ＨまたはＮであり；
Ｘ１２６がＴであり；
Ｘ１３６が、ＹまたはＦであり；
Ｘ１５０が、Ｆ、Ｈ、またはＳであり；
Ｘ１５２が、Ｇ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；

Ｘ１６９がＬであり；
Ｘ１９９が、ＷまたはＩであり；
Ｘ２０９がＬであり；
Ｘ２１５がＣであり；
Ｘ２１７がＮであり；
Ｘ２６９がＰであり；
Ｘ２７３がＹであり；
Ｘ２８２がＳであり；
Ｘ２９７がＳであり；
Ｘ３２１がＰである；
をさらに含む、項目１８から２２のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３３）
前記アミノ酸配列が、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３４）
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号４のポリペプチドより少なくとも５０～１００倍以上の活性を伴って変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３５）
前記アミノ酸配列が、配列番号１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、項目３４に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３６）
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号２２のポリペプチドより少なくとも１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３７）
前記アミノ酸配列が、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、項目３６に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３８）
前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号４８のポリペプ

チドより少なくとも１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目３９）

前記アミノ酸配列が、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、項目３８に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目４０）

前記トランスアミナーゼが、前記ケトアミド基質を生成物に、配列番号５８のポリペプチドより１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、項目１に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目４１）

前記アミノ酸配列が、配列番号６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、または１６８の配列に対応する、項目４０に記載のトランスアミナーゼポリペプチド。

（項目４２）

項目１から４１のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

（項目４３）

１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７の配列に対応する、項目４２に記載のポリヌクレオチド。

（項目４４）

項目４２または４３に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

（項目４５）

制御配列をさらに含む、項目４４に記載の発現ベクター。

（項目４６）

前記制御配列がプロモーターを含む、項目４５に記載の発現ベクター。

（項目４７）

前記制御配列が分泌シグナルを含む、項目４５に記載の発現ベクター。

（項目４８）

項目４４から４７のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

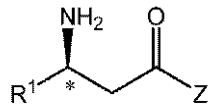
（項目４９）

Ｅ．ｃｏｌｉである、項目４８に記載の宿主細胞。

（項目５０）

＊で印を付けられた立体中心で、示された立体化学配置を有する構造式（Ｉ）の化合物：

【化２２】



(I)

を、反対の鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法であって、式中、

Ｚは、ＯＲ^{2}またはＮＲ^{2}Ｒ^{3}であり；

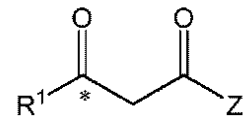
Ｒ^{1}は、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキル、またはヘテロアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；

Ｒ^{2}およびＲ^{3}はそれぞれ独立に、水素、Ｃ$_{1\sim8}$アルキル、アリール、またはアリール－Ｃ$_{1\sim2}$アルキルであり；あるいは

Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、これらが結合している窒素原子と一緒に、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、およびＮＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択される追加のヘテロ原子を任意選択により含有する、４～７員の複素環系を形成し、前記複素環は、非置換であるか、またはオキソ、ヒドロキシ、ハロゲン、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびＣ$_{1\sim4}$アルキルから独立して選択される１～３個の置換基で置換されており、アルキルおよびアルコキシは、非置換であるか、または１～５個のフッ素で置換されており；前記複素環系は、５～６員の飽和もしくは芳香族炭素環系、またはＯ、Ｓ、およびＮＣ$_{0\sim4}$アルキルから選択される１～２個のヘテロ原子を含有する、５～６員の飽和もしくは芳香族複素環系と任意選択により縮合されており、前記縮合環系は、非置換であるか、またはヒドロキシ、アミノ、フッ素、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、Ｃ$_{1\sim4}$アルコキシ、およびトリフルオロメチルから選択される１～２個の置換基で置換されており；

前記方法は、構造式（ＩＩ）のプロキラルケトン

【化２３】



(II)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、項目１から４１のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

（項目５１）

Ｒ^{1}がベンジルであり、ベンジルのフェニル基が、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から選択される１～３個の置換基で置換されている、項目５０に記載の方法。

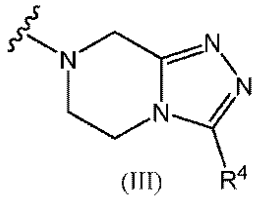
（項目５２）

ＺがＮＲ^{2}Ｒ^{3}である、項目５０に記載の方法。

（項目５３）

ＮＲ^{2}Ｒ^{3}が構造式（ＶＩＩ）の複素環：

【化２４】



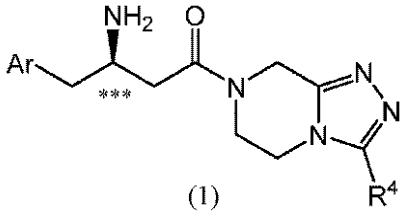
(III)

であり、Ｒ^{4}が水素またはＣ$_{1\sim4}$アルキルであり、前記Ｃ$_{1\sim4}$アルキルは、非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換されている、項目５２に記載の方法。

（項目５４）

＊＊＊で印を付けられた立体中心で、（Ｒ）－配置を有する構造式（１）の化合物：

【化２５】



(1)

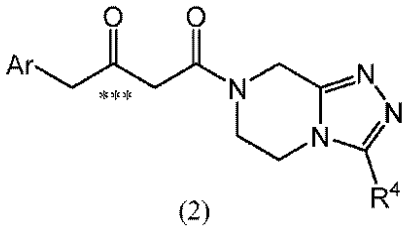
を、反対の（Ｓ）配置を有する鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法であって、式中、

Ａｒは、フェニルであり、前記フェニルは、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から独立して選択される１～５個の置換基で置換されており；

Ｒ^{4}は、水素、またはＣ$_{1\sim4}$アルキルであり、前記Ｃ$_{1\sim4}$アルキルは、非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換され；

前記方法は、構造式（２）のプロキラルケトン：

【化２６】



(2)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、項目１から４１のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

（項目５５）

Ａｒが、２，５－ジフルオロフェニルまたは２，４，５－トリフルオロフェニルであり、Ｒ^{4}がトリフルオロメチルである、項目５４に記載の方法。

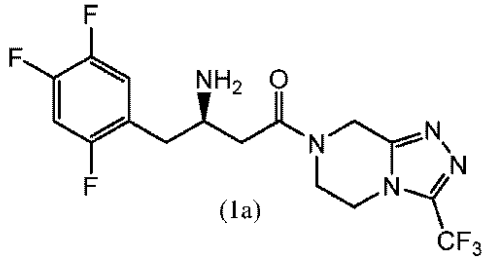
（項目５６）

Ａｒが２，４，５－トリフルオロフェニルである、項目５５に記載の方法。

（項目５７）

式（１ａ）の化合物：

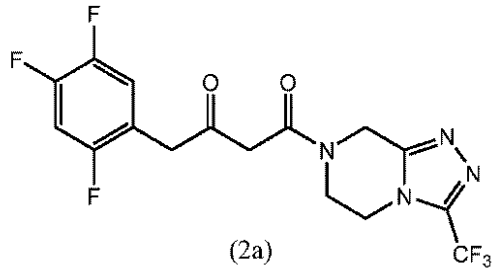
【化２７】



(1a)

を調製するための方法であって、式（２ａ）の基質：

【化２８】



(2a)

を、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、項目１から４１のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む方法。

（項目５８）

式（Ｉ）の前記化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の前記化合物が、少なくとも９０％の鏡像異性体過剰率で製造される、項目５０、５４、または５７に記載の方法。

（項目５９）

式（Ｉ）の前記化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の前記化合物が、少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で製造される、項目５０、５４、または５７に記載の方法。

（項目６０）

前記アミノ基ドナーが、イソプロピルアミン、アラニン、３－アミノ酪酸、またはメチルベンジルアミンから選択される、項目５０、５４、または５７に記載の方法。

（項目６１）

前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンである、項目６０に記載の方法。

（項目６２）

前記反応のカルボニル副生成物を除去する工程をさらに含む、項目５０、５４、または５７に記載の方法。

（項目６３）

前記アミノ基ドナーがアミノ酸であり、前記カルボニル副生成物がケト酸である、項目６２に記載の方法。

（項目６４）

前記カルボニル副生成物が、水より高い蒸気圧を有し、前記カルボニル副生成物の除去が、非反応性ガスを用いたスパージングによるもの、または真空を適用することによるものである、項目６３に記載の方法。

（項目６５）

前記非反応性ガスが窒素ガスである、項目６４に記載の方法。

（項目６６）

前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンであり、前記カルボニル副生成物がアセトンである、項目６４に記載の方法。

（項目６７）

前記反応条件が、約７．０のｐＨ～約９．０のｐＨの間である、項目５０、５４、または５７に記載の方法。

（項目６８）

前記反応条件が、約８．５のｐＨである、項目６７に記載の方法。

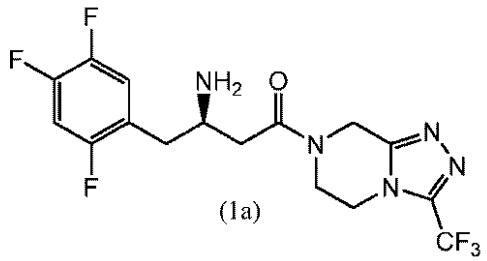
（項目６９）

前記ｐＨが、イソプロピルアミンを添加することによって維持される、項目６７に記載の方法。

（項目７０）

前記反応条件が、約２５℃～約５０℃の温度である、項目５０、５４、または５７に記

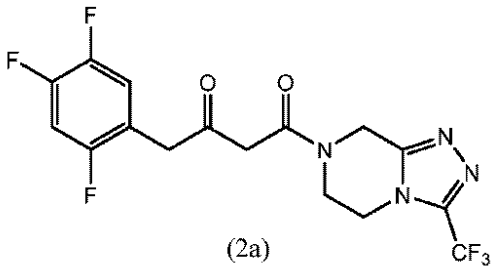
載の方法。
（項目７１）
前記反応条件が、約４５℃の温度である、項目７０に記載の方法。
（項目７２）
前記溶媒がジメチルスルホキシドを含む、項目５０、５４、または５７に記載の方法。
（項目７３）
前記ＤＭＳＯが約１０％～約５０％（ｖ／ｖ）の間である、項目７２に記載の方法。
（項目７４）
前記ＤＭＳＯが、約３０％ｖ／ｖである、項目７３に記載の方法。
（項目７５）
前記反応から構造式（Ｉ）の前記化合物、構造式（１）の前記化合物、または構造式（１ａ）の前記化合物を単離する工程をさらに含む、項目５０、５４、または５７に記載の方法。
（項目７６）
構造式（１）の前記化合物、または構造式（１ａ）の前記化合物を、適切な反応溶媒中で、薬学的に許容される酸と前記化合物とを接触させることによって、薬学的に許容される塩に変換する工程をさらに含む、項目５４または５７に記載の方法。
（項目７７）
前記薬学的に許容される酸がリン酸であり、前記薬学的に許容される塩がリン酸二水素塩である、項目７６に記載の方法。
（項目７８）
前記反応溶媒から前記薬学的に許容される塩を結晶化させる工程をさらに含む、項目７６に記載の方法。
（項目７９）
（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンホスフェート（１：１）一水和物を調製するための方法において、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、項目１から４１のいずれか一項に記載のトランスアミナーゼポリペプチドを用いて、式（１ａ）の化合物を式（２ａ）の生成物に変換する工程を含む改善であって、式（１ａ）の前記化合物が、
【化２９】



(1a)

であり、式（２ａ）の化合物が：

【化３０】



(2a)

である、改善。

（項目８０）

前記アミノ基ドナーがイソプロピルアミンである、項目７９に記載の方法。

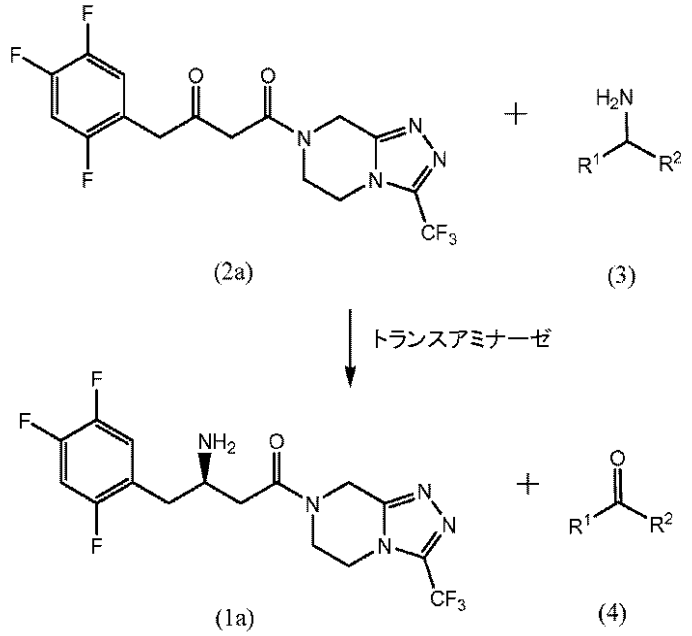
【発明を実施するための形態】

【００５２】

本開示は、ある特定のアミノ基アクセプターのアミノ基転移を伴うトランスフォーメーション、例えば、シタグリプチンの合成を媒介することができる非常に立体選択的で効率的な生体触媒を提供する。この生体触媒は、式（２ａ）の基質、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（「ケトアミド基質」）を、式（１ａ）の生成物、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン（「生成物」）に、式（３）のアミノ基ドナーの存在下で、以下のように変換することができる、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドである：

【００５３】

【化７】



(2a) (3)

(1a) (4)

【００５４】

ある特定の実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ ＫＮＫ１６８の天然に存在するトランスアミナーゼに由来し、これは、アミノ基ドナーとアミノ基アクセプター、一般にプロキラルケトンとの間のアミノ基の可逆性移

動を触媒することができる、Ｒ選択的ピリドキサール５’－リン酸依存性酵素である（例えば、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれている、Ｉｗａｓａｋｉら、２００６年、Ａｐｐｌ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　６９巻：４９９～５０５頁；および米国特許第７，１６９，５９２号を参照）。Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する天然に存在するトランスアミナーゼのＲ－立体選択的アミノ基転移活性は、３，４－ジメトキシフェニルアセトンに対して実証されているが、天然に存在する酵素および配列番号２のトランスアミナーゼは、ケトアミド基質（２ａ）である４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンに関して測定可能な活性を示さない。配列番号２のトランスアミナーゼは、残基Ｘ３０６位でイソロイシン（Ｉ）がバリン（Ｖ）と置換しているということにおいて、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する天然に存在する酵素と異なる。これらの欠点を克服するために、配列番号２のトランスアミナーゼは、式（２ａ）のケトアミド基質を、イソプロピルアミンなどのアミノ基ドナーの存在下で、式（１ａ）の生成物に効率的に変換するのを媒介するように操作された。この変換は、高い変換率および立体選択性を伴って、穏やかな条件下で実施することができ、この方法を、シタグリプチンの大量生産に適用可能にしている。

略語および定義

本明細書における説明の目的に関して、遺伝的にコードされるアミノ酸について使用される略語は、慣例的なものであり、以下の通りである。

【００５５】

【表１Ａ】

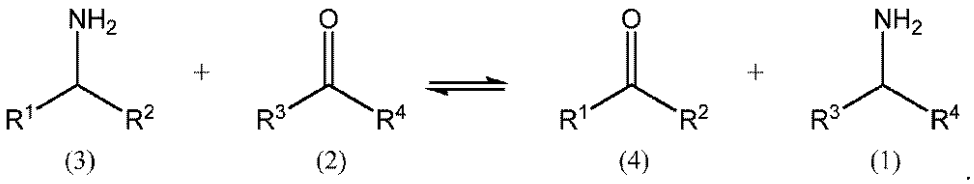
アミノ酸	3文字の略語	1文字の略語
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【００５６】
３文字の略語が使用される場合、「Ｌ」または「Ｄ」が具体的に前に付いているか、または略語が使用されている脈絡から明らかでない限り、アミノ酸は、α－炭素（Ｃα）に関してＬ－配置であっても、Ｄ－配置であってもよい。例えば、「Ａｌａ」は、α炭素に関する配置を指定することなくアラニンを示すが、「Ｄ－Ａｌａ」および「Ｌ－Ａｌａ」は、それぞれＤ－アラニンおよびＬ－アラニンを示す。１文字の略語が使用される場合、大文字は、α－炭素に関してＬ－配置のアミノ酸を示し、小文字は、α－炭素に関してＤ配置のアミノ酸を示す。例えば、「Ａ」はＬ－アラニンを示し、「ａ」はＤ－アラニンを示す。ペプチド配列が、１文字または３文字の略語（またはこれらの混合）のストリングとして示される場合、この配列は、一般的な慣例に従って、Ｎ→Ｃ方向で示される。

【００５７】
本明細書の説明において使用される技術用語および科学用語は、別段の具体的な定義のない限り、当業者によって一般に理解される意味を有する。したがって、以下の用語は、以下の意味を有することが意図されている。

【００５８】
「アミノトランスフェラーゼ」および「トランスアミナーゼ」は、アミノ基（NH_2）および水素原子を、１級アミン（３）からアクセプターカルボニル化合物（２）に移動させ、アミンドナーをその対応するカルボニル化合物（４）に変換し、アクセプターをその対応する１級アミン（１）に変換する酵素的能力を有するポリペプチドを指すのに互換的に使用される。

【００５９】
【化８】



【００６０】
本明細書の実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、式（２ａ）の化合物を、式（３）のアミノ基ドナーの存在下で式（１ａ）の化合物にエナンチオ選択的に変換することができる。

【００６１】
「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」は、長さ、または翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化、脂質化、ミリスチル化（ｍｙｒｉｓｔｉｌａｔｉｏｎ）、ユビキチン化など）にかかわらず、アミド結合によって共有結合的に連結された少なくとも２つのアミノ酸のポリマーを表すのに、本明細書で互換的に使用される。Ｄ－アミノ酸、およびＬ－アミノ酸、ならびにＤ－アミノ酸とＬ－アミノ酸の混合物は、この定義内に含まれる。

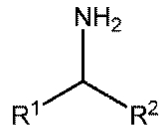
【００６２】
「基質」は、本明細書で使用する場合、ケトンなどのアミノ基アクセプターを指し、これは、トランスアミナーゼによって媒介される反応において、アミノ基ドナーからアミノ基を受け入れる。本開示に照らして、トランスアミナーゼの基質には、とりわけ、本明細書でさらに記載されるように、式（ＩＩ）の化合物、式（２）の化合物、および式（２ａ）の化合物が含まれる。「ケトアミド基質」は、式（２ａ）の化合物である４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを具体的に指す。

【００６３】
「アミノ基ドナー」は、アクセプターカルボニル化合物（すなわち、アミノ基アクセプ

ター）にアミノ基を供与し、それによってカルボニル副生成物になることができるアミノ化合物を指す。アミノ基ドナーは、一般式（３）の分子であり、

【００６４】

【化９】



(3)

【００６５】

式中、R^1、R^2のそれぞれは、独立して採用される場合、アルキル、アルキルアリール基、またはアリール基であり、これは、非置換であるか、または１つまたは複数の酵素的に阻害しない基で置換されている。R^1は、構造または対掌性においてR^2と同じであっても、異なっていてもよい。R^1およびR^2の基は、一緒になって、非置換であるか、置換されているか、または他の環に縮合している環を形成することができる。本発明とともに使用することができる一般的なアミノ基ドナーには、キラルアミノ酸およびアキラルアミノ酸、ならびにキラルアミンおよびアキラルアミンが含まれる。

【００６６】

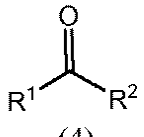
「キラルアミン」は、一般式R^1－ＣＨ（NH_2）－R^2のアミンを指し、式中、R^1およびR^2は同一でなく、異なる、混合された機能型の多種多様な脂肪族および脂環式化合物を含めて、その最も広い意味において本明細書で使用され、第２級炭素原子に結合した１級アミノ基の存在を特徴とし、この第２級炭素原子は、水素原子に加えて、（ｉ）キラルな環状構造を形成する二価の基、または（ｉｉ）構造または対掌性において互いに異なる２つの置換基（水素以外）を担持する。キラルな環状構造を形成する二価の基には、例えば、２－メチルブタン－１，４－ジイル、ペンタン－１，４－ジイル、ヘキサン－１，４－ジイル、ヘキサン－１，５－ジイル、２－メチルペンタン－１，５－ジイルが含まれる。第２級炭素原子上の２つ異なる置換基（上記のR^1およびR^2）も広く変更することができ、これらとして、アルキル、アラルキル、アリール、ハロ、ヒドロキシ、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、シクロアルキル、カルボキシ、カルボアルコキシ、カルバモイル、モノ（低級アルキル）およびジ（低級アルキル）置換カルバモイル、トリフルオロメチル、フェニル、ニトロ、アミノ、モノ（低級アルキル）およびジ（低級アルキル）置換アミノ、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アルキルカルボキサミド、アリールカルボキサミドなど、ならびに前述のもので置換されたアルキル、アラルキル、またはアリールを挙げることができる。

【００６７】

「カルボニル副生成物」は、アミノ基ドナー上のアミノ基が、アミノ基転移反応においてアミノ基アクセプターに移されるときに、アミノ基ドナーから形成されるカルボニル化合物を指す。カルボニル副生成物は、式（４）の一般的な構造：

【００６８】

【化１０】



(4)

【００６９】

を有し、式中R^1およびR^2は、アミノ基ドナーについて上記に定義されている。

【００７０】

「リン酸ピリドキサール」、「ＰＬＰ」、「ピリドキサール－５’－リン酸」、「ＰＹＰ」、および「Ｐ５Ｐ」は、トランスアミナーゼ反応において補酵素として作用する化合物を指すのに本明細書で互換的に使用される。いくつかの実施形態では、リン酸ピリドキサールは、構造１－（４’－ホルミル－３’－ヒドロキシ－２’－メチル－５’－ピリジル）メトキシホスホン酸、ＣＡＳ番号［５４－４７－７］によって定義される。ピリドキサール－５’－リン酸は、ピリドキソール（ピリドキシンまたはビタミンB_6としても公知である）のリン酸化および酸化によってインビボで産生される。トランスアミナーゼ酵素を使用するアミノ基転移反応において、アミノ基ドナーのアミノ基が補酵素に移されることによって、ケト副生成物が生成される一方で、ピリドキサール－５’－リン酸は、ピリドキサミンリン酸に変換される。ピリドキサール－５’－リン酸は、異なるケト化合物（アミノ基アクセプター）との反応によって再生される。アミノ基がピリドキサミンリン酸からアミノアクセプターに移動することにより、キラルアミンが生成され、補酵素が再生される。本発明のピリドキサール－５’－リン酸は、とりわけ、ピリドキサール（ＰＬ）、ピリドキサミン（ＰＭ）、ならびにこれらのリン酸化対応物、すなわち、ピリドキシンリン酸（ＰＮＰ）、およびピリドキサミンリン酸（ＰＭＰ）を含めたビタミンB_6ファミリーの他のメンバーによって置き換えることができる。

【００７１】

「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸（例えば、遺伝子）の部分を指す。

【００７２】

「天然に存在する」または「野生型の」は、自然において見出される形態を指す。例えば、天然に存在する、または野生型のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然における源から単離することができ、ヒトの操作によって意図的に修飾されていない、生物中に存在する配列である。

【００７３】

「組換え型の」は、例えば、細胞、核酸、またはポリペプチドを参照して使用される場合、物質、または天然もしくは天然型の物質に対応する物質であって、他の場合では自然において存在しない様式で修飾された、またはこれらと同一であるが、合成物質から、かつ／または組換え技法を使用する操作によって生成もしくは導出される物質を指す。非限定例には、とりわけ、天然の（非組換え型の）形態の細胞内で見出されない遺伝子を発現し、または他の場合では異なるレベルで発現される天然遺伝子を発現する組換え細胞が含まれる。

【００７４】

「配列同一性の百分率」、「パーセント同一性」、および「同一率」は、ポリヌクレオチド配列同士またはポリペプチド配列同士間の比較を指すのに本明細書で使用され、比較ウインドウにわたる２つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、比較ウインドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の一部は、２つの配列の最適なアライメントに関する参照配列と比較した場合、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。百分率は、同一の核酸塩基もしくはアミノ酸残基が、両方の配列において発生する位置の数を求めることによって計算され、または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップとともに整列されることによって、マッチした位置の数を得、このマッチした位置の数を比較のウインドウ内の位置の合計数で除し、結果に１００を乗ずることによって配列同一性の百分率を得る。最適なアライメントおよびパーセント配列同一性の決定は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムを使用して実施される（例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０年、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　２１５巻：４０３～４１０頁、およびＡｌｔｓｃｈｕｌら、１９７７年、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　３３８９～３４０２頁を参照）。ＢＬＡＳＴ分析を実施するためのソフトウェアは、ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのウェブサイトを通じて公的に入手可能である。

【００７５】

簡単に言えば、ＢＬＡＳＴ分析は、データベース配列中の同じ長さのワードと整列されるとき、いくらかの正の値の閾値スコアＴとマッチするか、またはこれを満たす、クエリー配列中の長さＷの短いワードを同定することによって、高スコア配列対（ＨＳＰ）を最初に同定する。Ｔは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、上記を参照）。これらの初期の近隣ワードヒットは、これらを含有するより長いＨＳＰを見つけるための探索を開始するためのシードとして作用する。次いでこのワードヒットは、累積アライメントスコアが増加することができる限りの間、各配列に沿って両方向に伸ばされる。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータＭ（マッチング残基の対についての報酬スコア；常に＞０）およびＮ（ミスマッチング残基についてのペナルティースコア；常に＜０）を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスが、累積スコアを計算するのに使用される。ワードヒットの各方向への伸長は、累積アライメントスコアが、その最大の実現した値から量Ｘ低下する；累積スコアが、１つまたは複数の負のスコア残基アライメントの蓄積により、０以下に向かう；またはいずれかの配列の末端に到達する場合、停止される。ＢＬＡＳＴアルゴリズムパラメータＷ、Ｔ、およびＸは、アライメントの感度およびスピードを決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列について）は、デフォルトとして、１１のワード長（Ｗ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、ＢＬＡＳＴＰプログラムは、デフォルトとして、３のワード長（Ｗ）、１０の期待値（Ｅ）、およびＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックスを使用する（ＨｅｎｉｋｏｆｆおよびＨｅｎｉｋｏｆｆ、１９８９年、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９巻：１０９１５頁を参照）。

【００７６】

２つの配列についてのパーセント同一性を提供することにおいて、ＢＬＡＳＴと同様に機能する多数の他のアルゴリズムが入手可能である。比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ、１９８１年、Ａｄｖ． Ａｐｐｌ． Ｍａｔｈ． ２巻：４８２頁の局所相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎおよび Ｗｕｎｓｃｈ、１９７０年、Ｊ． Ｍｏｌ． Ｂｉｏｌ． ４８巻：４４３頁の相同性アライメントアルゴリズム、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、１９８８年、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ８５巻：２，４４４頁の類似法の探索、これらのアルゴリズムのコンピュータ制御による実行（ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ中のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）、または視覚的な検査によって行うことができる（一般に、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｆ． Ｍ． Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ， Ｉｎｃ．とＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ， Ｉｎｃ．のジョイントベンチャー（１９９５年補遺）（Ａｕｓｕｂｅｌ）を参照）。さらに、配列アライメントおよびパーセント配列同一性の決定には、提供されたデフォルトのパラメータを使用して、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅパッケージ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ、Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）中のＢＥＳＴＦＩＴまたはＧＡＰプログラムを使用することができる。

【００７７】

「参照配列」は、別の（例えば、変更された）配列が比較される、定義された配列を指す。参照配列は、より大きい配列のサブセット、例えば、全長の遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントとすることができる。一般に、参照配列は、長さが少なくとも２０のヌクレオチドもしくはアミノ酸残基、長さが少なくとも２５残基、長さが少なくとも５０残基、または核酸もしくはポリペプチドの全長である。２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドはそれぞれ、（１）２つの配列間で類似している配列（すなわち、完全な配列の部分）を含むことができ、（２）２つの配列で非常に異なる配列をさらに含むことができるので、２つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列比較は、配列類似の局所的な領域を同定および比較するために、比較ウインドウにわたる２

つのポリヌクレオチドの配列を比較することにより一般に実施される。

【００７８】

用語「参照配列」は、野生型配列に限定されることが意図されておらず、操作された配列または変更された配列を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、「参照配列」は、予め操作された、または変更されたアミノ酸配列とすることができる。例えば、「Ｘ２８４位でグリシン残基を有する、配列番号２に基づく参照配列」は、Ｘ２８４でグリシン残基を有する配列番号２に対応する参照配列を指す（配列番号２の変更されていないバージョンは、Ｘ２８４でアラニンを有する）。

【００７９】

「比較ウインドウ」は、少なくとも約２０の連続したヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念上のセグメントを指し、配列は、少なくとも２０の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較することができ、比較ウインドウ中の配列の部分は、２つの配列の最適なアライメントに関して、参照配列（これは、付加または欠失を含まない）と比較した場合に、２０パーセント以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。比較ウインドウは、２０より長い連続した残基とすることができ、任意選択により３０、４０、５０、１００、またはそれ以上の長いウインドウを含む。

【００８０】

「実質的な同一性」は、少なくとも２０残基の位置の比較ウインドウにわたって、しばしば少なくとも３０～５０残基のウインドウにわたって参照配列と比較される場合に、少なくとも８０パーセントの配列同一性、少なくとも８５パーセントの配列同一性、少なくとも８９パーセントの配列同一性、少なくとも９５パーセントの配列同一性、さらには少なくとも９９パーセントの配列同一性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指し、配列同一性の百分率は、参照配列を、比較のウインドウにわたって、合計で参照配列の２０％以下となる欠失または付加を含む配列と比較することによって計算される。ポリペプチドに適用される特定の実施形態では、用語「実質的な同一性」は、２つのポリペプチド配列が、デフォルトのギャップ重みを使用して、プログラムのＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適に整列される場合、少なくとも８０パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも８９パーセントの配列同一性、少なくとも９５パーセントの配列同一性、またはそれ以上（例えば、９９パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。同一でない残基位置は、同類アミノ酸置換によって異なることが好ましい。

【００８１】

「に対応する」、「を参照して」、または「と比べて」は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けとの関連で使用される場合、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較される場合の、指定された参照配列の残基の番号付けを指す。言い換えれば、所与のポリマーの残基番号または残基位置は、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数値的な位置によってではなく、参照配列に対して指定される。例えば、操作されたトランスアミナーゼのアミノ酸配列などの所与のアミノ酸配列は、２つの配列間の残基マッチを最適化するためにギャップを導入することによって、参照配列に対して整列させることができる。これらの場合では、ギャップが存在するが、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列における残基の番号付けは、この配列が整列されている参照配列に対して行われる。

【００８２】

「立体選択性」は、１つの立体異性体の別の立体異性体に対する化学反応または酵素反応における優先的な形成を指す。立体選択性は、部分的であってもよく、この場合、１つの立体異性体の形成が、他の立体異性体に対して有利であり、またはこれは完全であってもよく、この場合、ただ１つの立体異性体が形成される。立体異性体が鏡像異性体であるとき、立体選択性は、両方の合計における一方の鏡像異性体の割合（一般に百分率として報告される）である、エナンチオ選択性と呼ばれる。これは一般に、式［主要な鏡像異性体－少ない方の鏡像異性体］／［主要な鏡像異性体＋少ない方の鏡像異性体］によって、これから計算される鏡像異性体過剰率（ｅ．ｅ．）として当技術分野において代わりに報

告される（一般に百分率として）。立体異性体がジアステレオ異性体である場合、立体選択性は、２つのジアステレオマーの混合物中の一方のジアステレオマーの割合（一般に百分率として報告される）であるジアステレオ選択性と呼ばれ、一般に、ジアステレオマー過剰率（ｄ．ｅ．）として代わりに報告される。鏡像異性体過剰率およびジアステレオマー過剰率は、立体異性体過剰率（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒｉｃ　ｅｘｃｅｓｓ）の型である。

【００８３】

「高度に立体選択的な」は、基質（例えば、式（２ａ））を、少なくとも約８５％の立体異性体過剰率を伴って、その対応する生成物（例えば、式（１ａ））に変換することができる化学反応または酵素反応を指す。

【００８４】

「改善された酵素特性」は、参照酵素において見出されるその特性と比較した場合に、特定の目的のためにより良好にされた、またはより望ましくされた任意の酵素特性を指す。本明細書に記載される操作されたトランスアミナーゼポリペプチドについて、比較は一般に、野生型トランスアミナーゼ酵素に対して行われるが、いくつかの実施形態では、参照トランスアミナーゼは、別の改善された、操作されたトランスアミナーゼである場合がある。改善を行うことができる酵素特性として、それだけに限らないが、酵素活性（ある時間の期間における基質の変換率の観点から表すことができる）、熱安定性、溶媒安定性、ｐＨ活性プロファイル、補酵素の必要条件、阻害剤（例えば、生産物阻害）に対する不応性、立体特異性、および立体選択性（エナンチオ選択性を含む）が挙げられる。

【００８５】

「酵素活性の増大」または「活性の増大」は、操作された酵素の改善された特性を指し、これは、参照酵素と比較した場合の、比活性（例えば、生成された生成物／時間／タンパク質の重量）の増大、または基質の生成物への変換率（出発量の基質の、指定量のトランスアミナーゼを使用した、指定時間内での生成物への変換率）の増大によって表すことができる。酵素活性を求めるための例示的な方法は、実施例において提供されている。K_m、V_{max}、またはk_{cat}の古典的な酵素特性、酵素活性の増大に導くことができる変化を含めた、酵素活性に関係する任意の特性が影響され得る。酵素活性の改善は、対応する野生型または操作された酵素の約１．５倍の酵素活性から、天然に存在する酵素（例えば、トランスアミナーゼ）、または活性の増大を示す酵素が導出された別の操作された酵素の２倍、５倍、１０倍、２０倍、２５倍、５０倍、７５倍、１００倍、またはそれ以上の酵素活性となり得る。特定の実施形態では、本開示の操作されたトランスアミナーゼ酵素は、親トランスアミナーゼ酵素（すなわち、これらが導出された野生型または操作されたトランスアミナーゼ）の酵素活性より１．５～５０倍、１．５～１００倍、またはそれ以上の範囲の酵素活性の改善を示す。任意の酵素の活性は拡散律速であり、その結果、触媒回転率は、任意の要求される補酵素を含めた、基質の拡散速度を超えることはできないことが、当業者によって理解される。拡散限界の理論的最大は一般に、約10^8～10^9（$M^{-1}s^{-1}$）である。したがって、トランスアミナーゼの酵素活性のいずれの改善も、トランスアミナーゼ酵素によって作用される基質の拡散速度に関係する上限を有することになる。トランスアミナーゼ活性は、トランスアミナーゼを測定するのに使用される標準アッセイの任意の１つ、例えば、基質濃度もしくは生成物濃度の変化、またはアミノ基ドナーの濃度の変化などによって測定することができる。酵素活性の比較は、本明細書に詳細にさらに記載されるように、酵素の規定された調製、一連の条件下での規定されたアッセイ、および１つまたは複数の規定された基質を使用して行われる。一般に、細胞可溶化物中の酵素が比較される場合、宿主細胞によって産生され、溶解産物中に存在する酵素の量の変動を最小限にするために、同一の発現系および同一の宿主細胞が使用されるとともに、細胞数およびアッセイされるタンパク質の量が求められる。

【００８６】

「変換」は、基質の対応する生成物への酵素的トランスフォーメーションを指す。「変換率」は、指定条件下で、ある時間の期間内に生成物に変換される基質の百分率を指す。したがって、例えば、トランスアミナーゼポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は

、基質の生成物への「変換率」として表すことができる。

【００８７】

「熱安定性の」または「熱的安定な」は、未処理の酵素と比較して、ある時間の期間（例えば、０．５～２４時間）、一連の温度条件（例えば、４０～８０℃）に曝したとき、不活性化に対して耐性であり、したがって、高温に曝した後にある程度のレベルの残効性（例えば、６０％～８０％を超える）を保持するポリペプチドを指すのに互換的に使用される。

【００８８】

「溶媒安定な」は、未処理の酵素と比較して、様々な濃度（例えば、５～９９％）の溶媒、（例えば、イソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、２－メチルテトラヒドロフラン、アセトン、トルエン、ブチルアセテート、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル、アセトニトリルなど）に、ある時間の期間（例えば、０．５～２４時間）曝した後に、同様の活性（例えば、６０％～８０％を超える）を維持するポリペプチドを指す。

【００８９】

「ｐＨ安定な」は、未処理の酵素と比較して、低ｐＨまたは高ｐＨ（例えば、４．５～６または８～１２）に、ある時間の期間（例えば、０．５～２４時間）曝した後に、同様の活性（例えば、６０％～８０％を超える）を維持するポリペプチドを指す。

【００９０】

「熱および溶媒安定な」は、熱安定および溶媒安定の両方であるポリペプチドを指す。

【００９１】

「に由来する」は、操作された酵素との関連で本明細書で使用する場合、起源を持つ酵素、および／またはそのような酵素をコードする遺伝子を同定し、これらに操作が基づいた。例えば、配列番号４の操作されたトランスアミナーゼ酵素は、配列番号２のトランスアミナーゼを突然変異させることによって得られた。したがって、配列番号４のこの操作されたトランスアミナーゼ酵素は、配列番号２のポリペプチドに「由来する」。

【００９２】

「アミノ酸」または「残基」は、本明細書に開示されるポリペプチドとの関連で使用する場合、配列位置の特定のモノマーを指す（例えば、Ｐ８は、配列番号２の８位の「アミノ酸」または「残基」は、プロリンであることを示す）。

【００９３】

「親水性アミノ酸または残基」は、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、１９８４年、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７９巻：１２５～１４２頁の正規化コンセンサス疎水性スケールによって０未満の疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされる親水性アミノ酸として、Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｌ－Ｈｉｓ（Ｈ）、Ｌ－Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｇｌｎ（Ｑ）、Ｌ－Ａｓｐ（Ｄ）、Ｌ－Ｌｙｓ（Ｋ）、およびＬ－Ａｒｇ（Ｒ）が挙げられる。

【００９４】

「酸性アミノ酸または残基」は、そのアミノ酸が、ペプチドまたはポリペプチド中に含まれる場合、約６未満のｐＫ値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を指す。酸性アミノ酸は一般に、水素イオンを失っているために、生理的ｐＨで負に帯電した側鎖を有する。遺伝的にコードされる酸性アミノ酸には、Ｌ－Ｇｌｕ（Ｅ）およびＬ－Ａｓｐ（Ｄ）が含まれる。

【００９５】

「塩基性アミノ酸または残基」は、そのアミノ酸が、ペプチドまたはポリペプチド中に含まれる場合、約６超のｐＫ値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を指す。塩基性アミノ酸は一般に、ヒドロニウムイオンとの会合により、生理的ｐＨで正に帯電した側鎖を有する。遺伝的にコードされる塩基性アミノ酸には、Ｌ－Ａｒｇ（Ｒ）およびＬ－Ｌｙｓ（Ｋ）が含まれる。

【００９６】

「極性のアミノ酸または残基」は、生理的ｐＨで無電荷であるが、２つの原子によって共通して共有されている電子対が、これらの原子のうちの１つによってより密接に保持されている、少なくとも１つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされる極性アミノ酸には、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｇｌｎ（Ｑ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、およびＬ－Ｔｈｒ（Ｔ）が含まれる。

【００９７】

「疎水性アミノ酸または残基」は、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、１９８４年、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７９巻：１２５～１４２頁の正規化コンセンサス疎水性スケールによって０超の疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされた疎水性アミノ酸として、Ｌ－Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｌ－Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｌ－Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｌ－Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｌ－Ｍｅｔ（Ｍ）、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）、およびＬ－Ｔｙｒ（Ｙ）が挙げられる。

【００９８】

「芳香族アミノ酸または残基」は、少なくとも１つの芳香族環または芳香族複素環を含む側鎖を有する親水性または疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされる芳香族アミノ酸には、Ｌ－Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｌ－Ｔｙｒ（Ｙ）、およびＬ－Ｔｒｐ（Ｗ）が含まれる。そのヘテロ芳香族窒素原子のｐＫａのために、Ｌ－Ｈｉｓ（Ｈ）は時折、塩基性残基として分類され、またはその側鎖が芳香族複素環を含むので芳香族残基として分類されるが、本明細書では、ヒスチジンは、親水性残基または「拘束性残基」（以下を参照）として分類される。

【００９９】

「拘束性アミノ酸または残基」は、拘束された形状を有するアミノ酸または残基を指す。本明細書では、拘束性残基には、Ｌ－Ｐｒｏ（Ｐ）およびＬ－Ｈｉｓ（Ｈ）が含まれる。ヒスチジンは、拘束された形状を有し、その理由は、これが、相対的に小さいイミダゾール環を有するためである。プロリンは、拘束された形状を有し、その理由は、これも５員環を有するためである。

【０１００】

「非極性アミノ酸または残基」は、生理的ｐＨで無電荷であり、２つの原子によって共通して共有されている電子対が、この２つの原子のそれぞれよって一般に同様に保持されている結合を有する側鎖（すなわち、この側鎖は非極性である）を有する疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされる非極性アミノ酸として、Ｌ－Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｌ－Ｍｅｔ（Ｍ）、およびＬ－Ａｌａ（Ａ）が挙げられる。

【０１０１】

「脂肪族アミノ酸または残基」は、脂肪族炭化水素側鎖を有する疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝的にコードされる脂肪族アミノ酸には、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｌｅｕ（Ｌ）、およびＬ－Ｉｌｅ（Ｉ）が含まれる。

【０１０２】

「システイン」またはＬ－Ｃｙｓ（Ｃ）は、他のＬ－Ｃｙｓ（Ｃ）アミノ酸、または他のスルファニル含有もしくはスルフヒドリル含有アミノ酸とジスルフィド架橋を形成することができる点で普通でない。「システイン様残基」には、システイン、およびジスルフィド架橋の形成に利用可能であるスルフヒドリル部分を含有する他のアミノ酸が含まれる。Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）（および－ＳＨ含有側鎖を有する他のアミノ酸）が、還元された遊離－ＳＨまたは酸化されたジスルフィド架橋形態でペプチド中に存在する能力は、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）が、ペプチドに正味の疎水性または親水性の特徴を与えるかどうかに影響する。Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）は、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ（Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇら、１９８４年、上記を参照）の正規化されたコンセンサススケールによって０．２９の疎水性を示すが、本開示の目的に関して、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）は、その独自のユニークな群に分類されることが理解されるべきである。

【０１０３】

「小さいアミノ酸または残基」は、合計３個以下の炭素および／またはヘテロ原子（α－炭素および水素を除く）からなる側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。小さいアミノ酸または残基は、上記定義に従って、脂肪族、非極性、極性、または酸性の小さいアミノ酸または残基としてさらに分類することができる。遺伝的にコードされる小さいアミノ酸として、Ｌ－Ａｌａ（Ａ）、Ｌ－Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌ－Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｌ－Ａｓｎ（Ｎ）、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）、およびＬ－Ａｓｐ（Ｄ）が挙げられる。

【０１０４】

「ヒドロキシル含有アミノ酸または残基」は、ヒドロキシル（－ＯＨ）部分を含有するアミノ酸を指す。遺伝的にコードされるヒドロキシル含有アミノ酸には、Ｌ－Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｌ－Ｔｈｒ（Ｔ）およびＬ－Ｔｙｒ（Ｙ）が含まれる。

【０１０５】

「アミノ酸差異」または「残基差異」は、参照配列と比較したときの、ポリペプチド配列の指定された位置での残基の変化を指す。例えば、参照配列がセリンを有するＸ８位での残基差異は、Ｘ８位の残基の、セリン以外の任意の残基への変化を指す。本明細書に開示されるように、酵素は、参照配列と比べて１つまたは複数の残基差異を含むことができ、この場合、複数の残基差異は一般に、参照配列と比べて変更が行われる指定位置のリストによって示される（例えば、「以下の残基位置で、配列番号２と比較した場合の１つまたは複数の残基差異：Ｘ４；Ｘ８；Ｘ２６；Ｘ４８；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１２４；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２；Ｘ２９２；Ｘ２９７；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９」）。

【０１０６】

「保存的な」アミノ酸置換または突然変異は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指し、したがって一般に、アミノ酸の同じまたは類似の定義されたクラス内のアミノ酸との、ポリペプチド中のアミノ酸の置換を伴う。しかし、本明細書で使用する場合、いくつかの実施形態では、保存的変異が、代わりに脂肪族残基から脂肪族残基への、非極性残基から非極性残基への、極性残基から極性残基への、酸性残基から酸性残基への、塩基性残基から塩基性残基への、芳香族残基から芳香族残基への、または拘束性残基から拘束性残基への置換とすることができる場合、保存的変異は、親水性残基から親水性残基への、疎水性残基から疎水性残基への、ヒドロキシル含有残基からヒドロキシル含有残基への、または小さい残基から小さい残基への置換を含まない。さらに、本明細書で使用する場合、Ａ、Ｖ、Ｌ、またはＩは、別の脂肪族残基または別の非極性残基に保存的に突然変異させることができる。以下の表は、例示的な同類置換を示す。

【０１０７】

【表１】

表1

残基	可能な保存的変異
A, L, V, I	他の脂肪族 (A, L, V, I) 他の非極性 (A, L, V, I, G, M)
G, M	他の非極性 (A, L, V, I, G, M)
D, E	他の酸性 (D, E)
K, R	他の塩基性 (K, R)
P, H	他の拘束性 (P, H)
N, Q, S, T	他の極性
Y, W, F	他の芳香族 (Y, W, F)
C	なし

【０１０８】

「非同類置換」は、著しく異なる側鎖特性を有するアミノ酸との、ポリペプチド中のアミノ酸の置換または突然変異を指す。非同類置換は、上記に列挙された、定義された群内のアミノ酸よりむしろ、これらの群の間のアミノ酸を使用することができる。一実施形態では、非保存的変異は、（ａ）置換（例えば、グリシンからプロリン）の範囲内のペプチド主鎖の構造、（ｂ）電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖の嵩に影響する。

【０１０９】

「欠失」は、参照ポリペプチドから１つまたは複数のアミノ酸を除去することによる、ポリペプチドの修飾を指す。欠失は、１以上のアミノ酸、２以上のアミノ酸、５以上のアミノ酸、１０以上のアミノ酸、１５以上のアミノ酸、または２０以上のアミノ酸、アミノ酸の総数の最大１０％、アミノ酸の総数の最大２０％、またはアミノ酸の総数の最大３０％の除去を含むことができ、酵素活性を保持し、かつ／または操作されたトランスアミナーゼ酵素の改善を保持しながらポリペプチドを構成する。欠失は、ポリペプチドの内部部分および／または末端部分を対象とすることができる。様々な実施形態では、欠失は、連続的なセグメントを含むことができ、または不連続なセグメントを含むことができる。

【０１１０】

「挿入」は、参照ポリペプチドに１つまたは複数のアミノ酸を付加することによる、ポリペプチドの修飾を指す。いくつかの実施形態では、改善された、操作されたトランスアミナーゼ酵素は、天然に存在するトランスアミナーゼポリペプチドへの１つまたは複数のアミノ酸の挿入、ならびに他の改善されたトランスアミナーゼポリペプチドへの１つまたは複数のアミノ酸の挿入を含む。挿入は、ポリペプチドの内部部分、またはカルボキシ末端もしくはアミノ末端にすることができる。挿入は、本明細書で使用する場合、当技術分野で公知であるような融合タンパク質を含むことができる。挿入は、天然に存在するポリペプチド中で、アミノ酸の連続したセグメントであってもよく、またはアミノ酸の１つまたは複数によって離れていてもよい。

【０１１１】

「断片」は、本明細書で使用する場合、アミノ末端および／またはカルボキシ末端の欠失を含むが、残りのアミノ酸配列は、配列中の対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。断片は、少なくとも１４アミノ酸の長さ、少なくとも２０アミノ酸の長さ、少なくとも５０アミノ酸の長さ、またはそれ以上の長さ、および全長のトランスアミナーゼポリペプチド、例えば、配列番号４のポリペプチドの最大７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、および９９％までとすることができる。

【０１１２】

「単離ポリペプチド」は、天然にポリペプチドを付随させる他の混入物、例えば、タン

パク質、脂質、およびポリヌクレオチドから実質的に分離されたポリペプチドを指す。この用語は、その天然に存在する環境または発現系（例えば、宿主細胞またはインビトロ合成）から取り出され、または精製されたポリペプチドを包含する。改善されたトランスアミナーゼ酵素は、細胞内に存在し、細胞培地中に存在することができ、または様々な形態、例えば、溶解産物、もしくは単離された調製物などで調製することができる。したがって、いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼ酵素は、単離ポリペプチドとすることができる。

【０１１３】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、ポリペプチド種が、存在する支配的な種である（すなわち、モルまたは重量に基づいて、これが、組成物中の任意の他の個々の巨大分子種より豊富である）組成物を指し、一般に、目的種が、存在する巨大分子種の少なくとも約５０モルパーセントまたは約５０重量パーセントを構成するとき、実質的に精製された組成物である。一般に、実質的に純粋なトランスアミナーゼ組成物は、この組成物中に存在するすべての巨大分子種の約６０モル％または重量％以上、約７０モル％または重量％以上、約８０モル％または重量％以上、約９０モル％または重量％以上、約９５モル％または重量％以上、および約９８モル％または重量％以上を構成する。いくつかの実施形態では、目的種は、本質的に均一になるまで精製され（すなわち、混入物種は、慣例的な検出方法によって組成物中に検出することができない）、組成物は、単一の巨大分子種から本質的になる。溶媒種、小分子（＜５００ダルトン）、および元素イオン種は、巨大分子種と見なされない。いくつかの実施形態では、単離された、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【０１１４】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、核酸ハイブリッドが安定である条件を指すのに本明細書で使用される。当業者に公知であるように、ハイブリッドの安定性は、ハイブリッドの融解温度（T_m）に反映している。一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン強度、温度、Ｇ／Ｃ含量、およびカオトロピック剤の存在の関数である。ポリヌクレオチドのT_m値は、融解温度を予測するための公知の方法を使用して計算することができる（例えば、Ｂａｌｄｉｎｏら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １６８巻：７６１～７７７頁；Ｂｏｌｔｏｎら、１９６２年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ４８巻：１３９０頁；Ｂｒｅｓｓｌａｕｅｒら、１９８６年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８３巻：８８９３～８８９７頁；Ｆｒｅｉｅｒら、１９８６年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８３巻：９３７３～９３７７頁；Ｋｉｅｒｚｅｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２５巻：７８４０～７８４６頁；Ｒｙｃｈｌｉｋら、１９９０年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １８巻：６４０９～６４１２頁（訂正、１９９１年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １９巻：６９８頁）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、上記を参照）；Ｓｕｇｇｓら、１９８１年、Ｉｎ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｕｓｉｎｇ Ｐｕｒｉｆｉｅｄ Ｇｅｎｅｓ（Ｂｒｏｗｎら編）、６８３～６９３頁、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；およびＷｅｔｍｕｒ、１９９１年、Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６巻：２２７～２５９頁を参照。すべての刊行物は、参照により本明細書に組み込む）。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に開示されるポリペプチドをコードし、規定条件、例えば、適度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件などの下で、本開示の操作されたトランスアミナーゼ酵素をコードする配列の補体にハイブリダイズする。

【０１１５】

「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションにおける、洗浄条件などのハイブリダイゼーション条件に関する。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で実施され、その後に、異なるが、より高いストリンジェンシーの洗浄が続く。用語「適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、標的ＤＮＡが、標的ポリヌクレオチドと約９０％超の同一性を伴っ

て、標的ＤＮＡと約６０％の同一性、好ましくは、約７５％の同一性、約８５％の同一性を有する相補的核酸に結合するのを可能にする条件を指す。例示的な適度にストリンジェントな条件は、４２℃で、５０％のホルムアミド、５×デンハート液、５×ＳＳＰＥ、０．２％のＳＤＳ中のハイブリダイゼーション、その後の４２℃で、０．２×ＳＳＰＥ、０．２％のＳＤＳ中の洗浄と等価な条件である。「高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション」は、規定されたポリヌクレオチド配列についての溶液条件下で求めた場合に、熱融解温度T_mから約１０℃未満である条件を一般に指す。いくつかの実施形態では、高いストリンジェンシー条件は、６５℃で、０．０１８ＭのＮａＣｌ中で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す。（すなわち、ハイブリッドが、６５℃で、０．０１８ＭのＮａＣｌ中で安定でない場合、これは、本明細書で企図されるように、高いストリンジェンシー条件下で安定でない）。高いストリンジェンシー条件は、例えば、４２℃で、５０％のホルムアミド、５×デンハート液、５×ＳＳＰＥ、０．２％のＳＤＳに等価な条件でのハイブリダイゼーション、その後の６５℃で、０．１×ＳＳＰＥ、および０．１％のＳＤＳ中の洗浄によってもたらすことができる。別の高いストリンジェンシー条件は、６５℃で、０．１％（ｗ：ｖ）のＳＤＳを含有する５×ＳＳＣ中のハイブリダイジング、および６５℃で、０．１％のＳＤＳを含有する０．１×ＳＳＣ中の洗浄と等価な条件でのハイブリダイジングである。他の高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、ならびに適度にストリンジェントな条件は、上記に引用された参考文献に記載されている。

【０１１６】

「非相同の」ポリヌクレオチドは、実験室技法によって宿主細胞中に導入される任意のポリヌクレオチドを指し、宿主細胞から取り出され、実験室操作にかけられ、次いで宿主細胞中に再導入されるポリヌクレオチドを含む。

【０１１７】

「コドン最適化された」は、コードされたタンパク質が対象とする生物内で効率的に発現されるような、特定の生物内で優先的に使用されるものに対する、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンの変化を指す。遺伝子コードは、ほとんどのアミノ酸が、「同義語」コドンまたは「同義」コドンと呼ばれるいくつかのコドンによって表されるという点で縮退しているが、特定の生物によるコドン使用頻度は、非ランダムであり、特定のコドントリプレットに偏っていることが周知である。このコドン使用頻度の偏りは、所与の遺伝子、共通の機能または祖先起源の遺伝子、高度に発現されるタンパク質対低コピー数タンパク質、および生物のゲノムの凝集タンパク質コード領域に関して、より高くなり得る。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現させるのに選択された宿主生物体からの最適な産生のために最適化されたコドンとすることができる。

【０１１８】

「好適な、最適な、高いコドン使用頻度の偏りのコドン」は、同じアミノ酸をコードする他のコドンより、タンパク質コード領域において高い頻度で使用されるコドンを互換的に指す。好適なコドンは、１個の遺伝子、共通の機能または起源の一連の遺伝子、高度に発現された遺伝子におけるコドン使用頻度、生物全体の凝集タンパク質コード領域におけるコドン出現頻度、関連生物の凝集タンパク質コード領域におけるコドン出現頻度、またはこれらの組合せに関して求めることができる。頻度が遺伝子発現のレベルとともに増加するコドンは一般に、発現にとっての最適コドンである。例えば、クラスター分析または対応分析を使用する多変量解析を含めた、特性の生物におけるコドン出現頻度（例えば、コドン使用頻度、相対的同義コドン使用頻度）、およびコドン選択を求めるため、ならびに遺伝子中で使用されるコドンの有効数を求めるための様々な方法が公知である（ＧＣＧ　ＣｏｄｏｎＰｒｅｆｅｒｅｎｃｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ；Ｃｏｄｏｎ　Ｗ、Ｊｏｈｎ　Ｐｅｄｅｎ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ；Ｍｃｌｎｅｒｎｅｙ，　Ｊ．　Ｏ、１９９８年、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　１４巻：３７２～７３頁；Ｓｔｅｎｉｃｏら

、１９９４年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２２４３７～４６頁；Ｗｒｉｇｈｔ，Ｆ．、１９９０年、Ｇｅｎｅ ８７巻：２３～２９頁を参照）。コドン使用頻度表は、生物のますます増えているリストに利用可能である（例えば、Ｗａｄａら、１９９２年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０巻：２１１１～２１１８頁；Ｎａｋａｍｕｒａら、２０００年、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８巻：２９２頁；Ｄｕｒｅｔら、上記を参照；ＨｅｎａｕｔおよびＤａｎｃｈｉｎ、「Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ａｎｄ Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ」、１９９６年、Ｎｅｉｄｈａｒｄｔら編、ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．、２０４７～２０６６頁を参照）。コドン使用頻度を得るためのデータ源は、タンパク質をコードすることができる任意の利用可能なヌクレオチド配列に依拠することができる。これらのデータセットは、発現タンパク質（例えば、完全なタンパク質コード配列－ＣＤＳ）、発現配列タグ（ＥＳＴ）、またはゲノム配列の予測されるコード領域をコードすることが実際に公知である核酸配列を含む（例えば、Ｍｏｕｎｔ，Ｄ．、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ：Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ、８章、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．、２００１年；Ｕｂｅｒｂａｃｈｅｒ，Ｅ．Ｃ．、１９９６年、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６巻：２５９～２８１頁；Ｔｉｗａｒｉら、１９９７年、Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．１３巻：２６３～２７０頁を参照）。

【０１１９】

「制御配列」は、本開示のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現に必要または有利であるすべての成分を含むように、本明細書で定義される。各制御配列は、対象とするポリヌクレオチドに固有であっても、異種であってもよい。そのような制御配列には、それだけに限らないが、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターが含まれる。

【０１２０】

「作動可能に連結された」は、対象とするポリヌクレオチドと比べて、ある位置で、制御配列が適切に配置され（すなわち、機能的な関係で）、その結果、制御配列が、対象とするポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を指示または調節する配置として本明細書で定義される。

【０１２１】

「プロモーター配列」は、コード配列などの、対象とするポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞によって認識される核酸配列である。制御配列は、適切なプロモーター配列を含むことができる。プロモーター配列は、転写制御配列を含有し、これは、対象とするポリヌクレオチドの発現を媒介する。突然変異プロモーター、トランケーテッドプロモーター、およびハイブリッドプロモーターを含めて、プロモーターは、適切な宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列とすることができ、宿主細胞と相同または非相同である細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

実施形態の詳細な説明

本明細書の実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、配列番号２のトランスアミナーゼと比較した場合、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに立体選択的に変換するその能力が改善されている。トランスアミナーゼは、本明細書に記載されるものを含めて、一般に、補酵素であるリン酸ピリドキサール（ＰＬＰ）を含有し、これは、アミノ基転移反応に関与する。ＰＬＰは、ポリペプチドが合成される宿主細胞によって提供することができ、またはポリペプチドの溶液にＰＬＰを添加することによって提供することができる。トランスアミナーゼ

は、アミノ酸配列に関して記述される一方で、活性ポリペプチドは、補酵素としてＰＬＰまたは適切な類似体を含有することが当業者によって理解されるであろう。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、酵素活性の改善は、配列番号４のポリペプチドなどの別の操作されたトランスアミナーゼに関してである。ケトアミド基質に対する活性の改善は、規定条件下で、参照酵素（例えば、野生型）と比べて、操作された酵素によって生成物に変換される基質の量の増加（例えば、変換率）によって明らかにすることができる。活性の改善は、規定条件下で、規定時間内でのケトアミド基質の生成物の変換の増大をもたらす、生成物形成速度の増大を含むことができる。活性の増大（例えば、変換率および／または変換速度の増大）は、より少ない量の酵素での、同じ量の生成物への基質の変換も特徴とすることができる。生成物の量は、様々な技法、例えば、反応混合物の分別（例えば、クロマトグラフィーによる）、およびＵＶ吸光度またはタンデム質量分析法（ＭＳ／ＭＳ）による、分離された生成物の検出によって評価することができる（例えば、実施例４を参照）。生成物のＵＶ検出の例示的な方法は、２１０ｎｍの入射波長および１．０ｃｍの経路長を使用し、これは、シタグリプチンについて、約５μｇ／ｍＬの検出限界を有する。生成物のＵＶ検出は一般に、クロマトグラフィー、特に、１．５ｍｌ／分の流量およびカラム温度４０℃で、４５：５５の１０ｍＭのNH_4Ac／ＭｅＣＮの溶離液を使用する、逆相クロマトグラフ媒体、例えば、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＸＤＢ－Ｃ８カラム（４．６×１５０ｍｍ、５μｍ）でのＨＰＬＣによる反応混合物の分別に続く。いくつかの実施形態では、ＵＶ検出は、２６８ｎｍの入射波長を使用し、これは、２１０ｎｍでの検出限界と同様の検出限界を有する。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、酵素活性の改善は、実施例６または７に提供されるものなどの既定反応条件下で、配列番号４のポリペプチドの活性以上である。配列番号２または配列番号４の活性を比較するための例示的な規定反応条件は、表２に列挙したトランスアミナーゼについての反応条件の説明において以下に示されるように、約２ｇ／Ｌのケトアミド基質、約０．５Ｍのイソプロピルアミン、約２２℃、約ｐＨ７．５、約５％のＤＭＳＯ、約１００μＭのＰＬＰ、および約２０ｍｇ／ｍＬのトランスアミナーゼポリペプチドである。ある特定の操作されたトランスアミナーゼとの比較のための既定反応条件も、表２に列挙されたトランスアミナーゼについての説明、および実施例７～１１における対応する説明において提供されている。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、規定反応条件下で、配列番号４のポリペプチドの活性の少なくとも１．５倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、７５倍、１００倍、１５０倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、１０００倍、１５００倍、２０００倍、または２０００倍超を有する。配列番号２のトランスアミナーゼ酵素が、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンに対して測れる程度に作用しないことを考慮すると、ケトアミド基質を対応する生成物に変換することにおいて、配列番号４以上の活性を有する操作されたトランスアミナーゼは、配列番号２によって表される酵素に対して改善されている。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、酵素活性の改善はまた、酵素特性の他の改善と関連する。いくつかの実施形態では、酵素特性の改善は、４５℃以上などの熱安定性に関してである。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、酵素活性の改善はまた、約２５～約４０％または約２５～約５０％のジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中などの溶媒安定性の改善と関連する。いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼは、アミノ基ドナーなどの反応成分による不活性化に対して耐性である。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、１Ｍまたは最大２Ｍのイソプロピルアミンに対して安定である。

【０１２６】
いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％、またはそれ以上の鏡像異性体過剰率（ｅ．ｅ．）を伴って変換することもできる。

【０１２７】
いくつかの実施形態では、本開示の操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナー、特にイソプロピルアミンの存在下で、配列番号４のポリペプチドの活性以上の活性を伴って変換することができ、配列番号４の参照配列と少なくとも８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１２８】
いくつかの実施形態では、本開示の操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、以下にさらに記載されるように、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナー、特にイソプロピルアミンの存在下で、配列番号４のポリペプチド以上の活性を伴って変換することができ、表２に列挙された参照配列、例えば、配列番号６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、または１０２と、少なくとも８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１２９】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、トランスアミナーゼ参照配列と比較した場合、１つまたは複数の残基差異を有するアミノ酸配列を含む。残基差異は、非同類置換、同類置換、または非同類置換と同類置換の組合せである場合がある。残基差異および残基位置の説明に関して、本明細書に提供されるトランスアミナーゼは、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ　ＫＮＫ１６８の天然に存在するトランスアミナーゼ、または配列番号２のトランスアミナーゼ、または配列番号４のポリペプチドなどの操作されたトランスアミナーゼのアミノ酸配列を参照して記述することができる。本明細書の説明について、参照配列中のアミノ酸残基位置は、開始メチオニン（Ｍ）残基（すなわち、Ｍは、残基１位を表す）から始まるトランスアミナーゼにおいて求められるが、この開始メチオニン残基は、宿主細胞またはインビトロ翻訳システムなどにおける生物学的処理機構によって除去されることによって、開始メチオニン残基を欠いている成熟タンパク質を生成することができることが当業者によって理解されるであろう。

【０１３０】

特定のアミノ酸、またはアミノ酸変化（「残基差異」）が存在するポリペプチド配列の位置は、「Ｘｎ」または「位置ｎ」として本明細書で時折記載され、ここでｎは、参照配列に関する残基位置を指す。

【０１３１】

参照配列中の特定の残基の、異なる指定残基との置換である、特定の置換突然変異は、慣例的な表示法「Ｘ（番号）Ｙ」によって表すことができ、式中、Ｘは、参照配列中の残基の１文字識別子であり、「番号」は、参照配列中の残基位置であり、Ｙは、操作された配列中の残基置換の１文字識別子である。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、残基差異は、以下の残基位置の１つまたは複数で起こり得る：Ｘ４；Ｘ５；Ｘ８；Ｘ１８；Ｘ２５；Ｘ２６；Ｘ２７；Ｘ２８；Ｘ３０；Ｘ４１；Ｘ４２；Ｘ４８；Ｘ４９；Ｘ５０；Ｘ５４；Ｘ５５；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ６９；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１１７；Ｘ１２０；Ｘ１２２；Ｘ１２４；Ｘ１２６；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１３８；Ｘ１４６；Ｘ１４８；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１５５；Ｘ１５６；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６４；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０４；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２３；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２；Ｘ２８４；Ｘ２９２；Ｘ２９７；Ｘ３０２；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９。いくつかの実施形態では、残基差異またはこれらの組合せは、酵素特性の改善に関連する。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、上記に列挙された「Ｘｎ」によって表される特定の位置以外の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他のアミノ酸残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、他の残基位置での残基差異は、保存アミノ酸残基との置換を含む。

【０１３３】

本明細書の実施形態では、トランスアミナーゼに対して基質結合に影響する残基位置での、配列番号２と比較した場合の残基差異は、以下にさらに記載される構造式（Ｉ）のケトアミド基質、特に、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンの適応を可能にする。理論によって束縛されることなく、少なくとも２つの領域、すなわち、第１の基質結合領域および第２の基質結合領域は、ケトアミド基質の異なる構造要素と相互作用する。第１の結合領域は、残基位置Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、およびＸ２８２を含む一方で、第２の結合領域は、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、およびＸ２８４を含む。したがって、本明細書のトランスアミナーゼポリペプチドは、Ｘ６２、Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、Ｘ２８２、およびＸ２８４を含む残基位置で、１つまたは複数の残基差異を有する。いくつかの実施形態では、本明細書のトランスアミナーゼポリペプチドは、基質結合に関連する指定残基位置で、少なくとも２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、または６つ以上の残基差異を有する。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、配列番号２と比較した場合の残基差異は、残基位置Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、およびＸ２８２からなる第１の基質結合領域を形成する残基位置の１つまたは複数においてである。したがって、いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、残基位置Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２

３、Ｘ２２５、およびＸ２８２において、配列番号２と比較した場合に少なくとも１つの残基差異を含むアミノ酸配列を含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、配列番号２と比較した場合の残基差異は、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、およびＸ２８４からなる第２の基質結合領域を形成する残基位置の１つまたは複数においてである。したがって、いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、およびＸ２８４において、配列番号２と比較した場合に少なくとも１つの残基差異を含むアミノ酸配列を含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、第２の結合領域における残基差異と組み合わせて、第１の結合領域における残基差異を含むアミノ酸配列を含む。したがって、いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、およびＸ２８４における、配列番号２と比較した場合の１つまたは複数の残基差異と組み合わせて、残基位置Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２３、Ｘ２２５、およびＸ２８２における、配列番号２と比較した場合の１つまたは複数の残基差異を含むアミノ酸配列を含む。

【０１３７】

本開示の操作されたトランスアミナーゼのいくつかの実施形態では、ある残基位置におけるアミノ酸残基は、その位置で出現することができるアミノ酸の「特徴」（例えば、アミノ酸の型または特性）の観点から定義することができる。したがって、いくつかの実施形態では、上記に指定された位置におけるアミノ酸残基は、以下の特徴から選択することができる：Ｘ４が芳香族残基であり；Ｘ５が塩基性残基であり；Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ１８が、システイン（Ｃ）または脂肪族残基であり；Ｘ２５が極性残基であり；Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基であり；Ｘ２７が極性残基であり；Ｘ２８が拘束性残基であり；Ｘ３０が、非極性残基または極性残基であり；Ｘ４１が、拘束性残基または極性残基であり；Ｘ４２が非極性残基であり；Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基、またが非極性残基であり；Ｘ４９が極性残基であり；Ｘ５０が脂肪族残基であり；Ｘ５４が拘束性残基であり；Ｘ５５が脂肪族残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ６９が、システイン（Ｃ）または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ８１が非極性残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基であり；Ｘ１１７が非極性残基であり；Ｘ１２０が芳香族残基であり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；Ｘ１２６が極性残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ１３８が、塩基性残基または拘束性残基であり；Ｘ１４６が塩基性残基であり；Ｘ１４８が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基、または極性残基であり；Ｘ１５２が、システイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基であり；Ｘ１５５が、非極性残基または極性残基であり；Ｘ１５６が極性残基であり；Ｘ１６０が脂肪族残基であり；Ｘ１６３が、脂肪族残基または拘束性残基であり；Ｘ１６４が、脂肪族残基または拘束性残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１７４が脂肪族残基であり；Ｘ１７８が極性残基であり；Ｘ１９５が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０４が脂肪族残基であり；Ｘ２０８が、システイン（Ｃ）、またが拘束性残基、非極性残基、芳香族残基、極性残基、もしくは塩基性残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１１が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がシステイン（Ｃ）であり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基であり；Ｘ２２５が芳香族残基であり；Ｘ２３０が脂肪族残基であり；Ｘ２５２が、芳香族残基または脂肪族残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基であり；Ｘ２９２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３０２が脂肪族残基であり；Ｘ３０６が脂肪族残基で

あり；Ｘ３２１が拘束性残基であり、Ｘ３２９が、拘束性残基または芳香族残基である。いくつかの実施形態では、参照配列（例えば、配列番号２）の対応する残基位置におけるアミノ酸残基が、指定位置について記載されるアミノ酸のカテゴリー内に包含される場合、そのアミノ酸のカテゴリー内の異なるアミノ酸は、本明細書に提供されるガイダンスを踏まえると使用することができる。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、上記に指定された残基位置におけるアミノ酸残基は、以下の特徴から選択することができる：Ｘ４が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ５が、KまたはR、特にKであり；Ｘ８が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ１８が、Ｃ、Ａ、Ｖ、またはＩ、特にＣまたはＩであり；Ｘ２５が、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴ、特にＱであり；Ｘ２６が、Ｆ、W、ＨまたはＰ、特にＨであり；Ｘ２７が、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴ、特にＴであり；Ｘ２８が、ＰまたはH、特にＰであり；Ｘ３０が、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＱまたはMであり；Ｘ４１が、Ｐ、Ｈ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴ、特にＨまたはＳであり；Ｘ４２が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ４８が、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＱ、Ｄ、Ｖ、Ｇ、またはＡであり；Ｘ４９が、Ｎ、Ｑ、またはＴ、特にＴであり；Ｘ５０が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＬであり；Ｘ５４が、ＰまたはHであり；Ｘ５５が、Ａ、Ｖ、またはＬ、特にＶであり；Ｘ６０が、ＦまたはW、特にＦであり；Ｘ６１が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ６２が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、ＬまたはＩ、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｌ　Ｉ、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、特にＧであり；Ｘ９４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が、Ａ、ＶまたはＬ、特にＬであり；Ｘ１０２が、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、KまたはR、特にＬまたはKであり；Ｘ１１７が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ１２０が、Ｙ、W、またはＦ、特にＹであり；Ｘ１２２が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、ＰまたはH、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはHであり；Ｘ１２４が、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｐ、またはH、特にＴ、ＨまたはNであり；Ｘ１２６が、Ｎ、Ｑ、またはＴ、特にＴであり；Ｘ１３６が、Ｙ、ＦまたはW、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＴまたはＩであり；Ｘ１３８が、K、ＰまたはH、特にKまたはＰであり；Ｘ１４６が、KまたはR、特にRであり；Ｘ１４８が、Ａ、Ｖ、Ｌ　Ｉ、W、またはＦ、特にＡまたはＦであり；Ｘ１５０が、Ｆ、W、Ｈ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１５２が、Ｃ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、Ｔ、Ｎ，またはＱ、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１５５が、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＭ、ＶまたはＴであり；Ｘ１５６が、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴ、特にＱであり；Ｘ１６０が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＬであり；Ｘ１６３が、Ｐ、Ｈ、Ａ、Ｖ、またはＬ、特にＨまたはＶであり；Ｘ１６４が、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、ＰまたはH、特にＶまたはＰであり；Ｘ１６９が、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＬであり；Ｘ１７４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＡであり；Ｘ１７８が、Ｓ、Ｎ、またはＱ、特にＳであり；Ｘ１９５が、Ｆ、Ｙ、W、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＦまたはＱであり；Ｘ１９９が、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｙ、Ｆ、W、特にWまたはＩであり；Ｘ２０４が、Ａ、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ２０８が、Ｈ、Ｃ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｙ、ＤまたはＳであり；Ｘ２０９が、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＬであり；Ｘ２１１が、Ａ、Ｖ、またはＩ、特にＩであり；Ｘ２１５が、Ｃであり；Ｘ２１７が、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＮであり；Ｘ２２３が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２２５が、WまたはＹ、特にＹであり；Ｘ２３０が、Ａ、Ｖ、またはＬ、特にＶであり；Ｘ２５２が、Ａ、Ｖ、Ｉ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＦであり；Ｘ２６９が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２７３が、Ｙ、ＦまたはW、特にＹであり；Ｘ２８２が、Ｓ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ２８４が、Ｇ、Ｍ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ２９２が、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＴであり；Ｘ２９７が、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ３０２が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ３０６が、Ａ、ＬまたはＩ、特にＬであり；Ｘ３２１が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ３２９が、Ｈ、Ｐ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＨである

。
【０１３９】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、以下の特徴の１つまたは複数を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９に対応する残基が、システイン（Ｃ）、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３に対応する残基が、拘束性残基であり；Ｘ２８４に対応する残基が、非極性残基である。
【０１４０】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：（１）Ｘ６９に対応する残基が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基であり、かつ／またはＸ２８４に対応する残基が、非極性残基であり；（２）Ｘ１２２に対応する残基が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；（３）Ｘ２２３に対応する残基が、拘束性残基である。
【０１４１】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基であり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり、；Ｘ２２３が拘束性残基である。
【０１４２】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９が、Ｃ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、またはＨ、特にＭ、Ｉ、Ｖ、Ｌ、またはＨであり；Ｘ２２３が、ＨまたはＰ、特にＰである。
【０１４３】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基である。
【０１４４】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ１２２が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、またはＨ、特にＭ、Ｉ、Ｖ、Ｌ、またはＨであり；Ｘ２２３が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２８４が、Ｇ、Ｍ、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＧである。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、極性残基、もしくは脂肪族残基であり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基であり；Ｘ２２３が拘束性残基であり；Ｘ２８４が非極性残基である。
【０１４６】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９が、Ｃ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、またはＨ、特にＭ、Ｉ、Ｖ、Ｌ、またはＨであり；Ｘ２２３が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２８４が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＧである。
【０１４７】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９がＣまたはＴであり；Ｘ１２２がＭまたはＩであり；Ｘ２２３がＰであり；Ｘ２８４がＧである。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４にお

いて、指定された特徴の１つもしくは複数、または特徴の組合せを有する操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、以下の残基位置で、配列番号２と比較した場合に１つまたは複数の残基差異をさらに有することができる：Ｘ４；Ｘ５；Ｘ８；Ｘ１８；Ｘ２５；Ｘ２６；Ｘ２７；Ｘ２８；Ｘ３０；Ｘ４１；Ｘ４２；Ｘ４８；Ｘ４９；Ｘ５０；Ｘ５４；Ｘ５５；Ｘ６０；Ｘ６１；Ｘ６２；Ｘ６５；Ｘ８１；Ｘ９４；Ｘ９６；Ｘ１０２；Ｘ１１７；Ｘ１２０；Ｘ１２４；Ｘ１２６；Ｘ１３６；Ｘ１３７；Ｘ１３８；Ｘ１４６；Ｘ１４８；Ｘ１５０；Ｘ１５２；Ｘ１５５；Ｘ１５６；Ｘ１６０；Ｘ１６３；Ｘ１６４；Ｘ１６９；Ｘ１７４；Ｘ１７８；Ｘ１９５；Ｘ１９９；Ｘ２０４；Ｘ２０８；Ｘ２０９；Ｘ２１１；Ｘ２１５；Ｘ２１７；Ｘ２２５；Ｘ２３０；Ｘ２５２；Ｘ２６９；Ｘ２７３；Ｘ２８２、Ｘ２９２；Ｘ２９７；Ｘ３０２；Ｘ３０６；Ｘ３２１；およびＸ３２９。残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４に加えて、これらの他の残基位置は、トランスアミナーゼポリペプチドの様々な特性に対する効果と関連し、したがって、配列番号２と比較した場合に残基差異を有することによって、酵素特性の望ましい変化を起こすことができる。

【０１４９】

上述したように、残基位置Ｘ６２、Ｘ１３６、Ｘ１３７、Ｘ１９５、Ｘ１９９、Ｘ２０８、Ｘ２０９、Ｘ２２５、およびＸ２８２は、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４とともに、基質の酵素への結合に関連し、したがって、トランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２と比較した場合に、これらの列挙された位置で残基差異を有することによって、酵素活性の望ましい変化を起こすことができる。

【０１５０】

残基位置Ｘ４、Ｘ５、Ｘ８、Ｘ２６、Ｘ４８、Ｘ６０、Ｘ６５、Ｘ８１、Ｘ９６、Ｘ１０２、Ｘ１２４、Ｘ１６０、Ｘ１６３、Ｘ１６９、Ｘ１７４、Ｘ１７８、Ｘ２１１、Ｘ２１７、Ｘ２２５、Ｘ２３０、Ｘ２５２、Ｘ２６９、Ｘ２７３、Ｘ２９２、Ｘ２９７、Ｘ３０６、Ｘ３２１、Ｘ３２９も、酵素活性の追加の増大に関連し、したがって、トランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２と比較した場合に、これらの列挙された位置で残基差異を有することによって、酵素活性の望ましい変化、例えば、高い基質負荷条件での変換の効率の増大を起こすことができる。

【０１５１】

残基位置Ｘ１８、Ｘ２５、Ｘ２７、Ｘ２８、Ｘ３０、Ｘ４１、Ｘ４２、Ｘ４９、Ｘ５０、Ｘ５４、Ｘ５５、Ｘ１１７、Ｘ１２０、Ｘ１２６、Ｘ１３８、Ｘ１４６、Ｘ１４８、Ｘ１５０、Ｘ１５２、Ｘ１５５、Ｘ１５６、Ｘ１６４、Ｘ２０４、Ｘ３０２は、熱安定性および／またはＤＭＳＯなどの溶媒安定性の増大にも関連し、したがって、トランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２と比較した場合に、これらの列挙された位置で残基差異を有することによって、熱安定性および／または溶媒安定性の望ましい変化を起こすことができる。

【０１５２】

残基位置Ｘ６１、Ｘ９４、Ｘ２１５は、アミノドナーであるイソプロピルアミンの高い濃度で反応を実施する能力にも関連し、したがって、トランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２と比較した場合に、これらの列挙された位置で残基差異を有することによって、イソプロピルアミンの高い（例えば、１～２Ｍ）濃度で、変換の効率の増大を起こすことができる。

【０１５３】

酵素の様々な特性に関連する残基位置での配列番号２からの残基差異は、様々に組み合わせて使用することによって、望ましい酵素特性、例えば、酵素活性、溶媒安定性および適度な安定性の増大、ならびにアミノドナーの利用の組合せを有するトランスアミナーゼポリペプチドを形成することができることが理解されるべきである。例示的な組合せは、本明細書に記載されている。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、指定された残基位置についてのアミノ酸残基は、上記説明に

従って選択することができる。例えば、アミノ酸残基は、以下の特徴に基づいて選択することができる：Ｘ４が芳香族残基であり；Ｘ５が塩基性残基であり；Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ１８が、システイン（Ｃ）または脂肪族残基であり；Ｘ２５が極性残基であり；Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基であり；Ｘ２７が極性残基であり；Ｘ２８が拘束性残基であり；Ｘ３０が、極性残基または非極性残基であり；Ｘ４１が、拘束性残基または極性残基であり；Ｘ４２が非極性残基であり；Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基、または非極性残基であり；Ｘ４９が極性残基であり；Ｘ５０が脂肪族残基であり；Ｘ５４が拘束性残基であり；Ｘ５５が脂肪族残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が非極性残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基であり；Ｘ１１７が非極性残基であり；Ｘ１２０が芳香族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；Ｘ１２６が極性残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ１３８が、塩基性残基または拘束性残基であり；Ｘ１４６が塩基性残基であり；Ｘ１４８が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基、または極性残基であり；Ｘ１５２が、システイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基であり；Ｘ１５５が、非極性残基または極性残基であり；Ｘ１５６が極性残基であり；Ｘ１６０が脂肪族残基であり；Ｘ１６３が、脂肪族残基または拘束性残基であり；Ｘ１６４が、脂肪族残基または拘束性残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１７４が脂肪族残基であり；Ｘ１７８が極性残基であり；Ｘ１９５が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０４が脂肪族残基であり；Ｘ２０８が、システイン（Ｃ）、または拘束性残基、非極性残基、芳香族残基、極性残基、もしくは塩基性残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１１が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２２５が芳香族残基であり；Ｘ２３０が脂肪族残基であり；Ｘ２５２が、芳香族残基または脂肪族残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３０２が脂肪族残基であり；Ｘ３０６が脂肪族残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基であり；Ｘ３２９が、拘束性残基または芳香族残基である。これらの残基位置で使用することができる具体的なアミノ酸残基は、上述されている。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴の１つまたは複数をさらに有することができる：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２８２が極性残基である。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、前述の特徴に加えて、トランスアミナーゼアミノ酸配列は、以下の特徴の１つまたは複数をさらに含むことができる：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、前述の特徴に加えて、トランスアミナーゼアミノ酸配列は、以下の特徴の１つまたは複数をさらに含むことができる：Ｘ４が芳香族残基であり；Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基、または非極性残基であり；Ｘ１０２が、脂肪族

残基または塩基性残基であり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基、または極性残基であり；Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基であり；Ｘ１６０が脂肪族残基であり；Ｘ１６３が、脂肪族残基または拘束性残基であり；Ｘ１７４が脂肪族残基であり；Ｘ１７８が極性残基であり；Ｘ１９５が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ２０８が、Ｃ、または拘束性残基、非極性残基、芳香族残基、極性残基、もしくは塩基性残基であり；Ｘ２１１が脂肪族残基であり；Ｘ２２５が芳香族残基であり；Ｘ２３０が脂肪族残基であり；Ｘ２５２が、芳香族残基または脂肪族残基であり；Ｘ２９２が極性残基であり；Ｘ３０６が脂肪族残基であり；Ｘ３２９が、拘束性残基または芳香族残基である。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴の１つもしくは複数、または組合せを有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ２６が、芳香族残基もしくは拘束性残基であり、かつ／またはＸ６２が、芳香族残基もしくは極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基である。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２８２が極性残基である。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が、非極性残基または小さい残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が非極性残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基もしくは拘束性残基であり；Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が拘束性残基であり；Ｘ６０が芳香族残基であり；Ｘ６１が芳香族残基であり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基であり；Ｘ６５が脂肪族残基であり；Ｘ８１が非極性残基であり；Ｘ９４が脂肪族残基であり；Ｘ９６が脂肪族残基であり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基であり；Ｘ１２６が極性残基であり；

Ｘ１３６が芳香族残基であり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基であり；Ｘ１５２がシステイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基であり；Ｘ１６９が脂肪族残基であり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基であり；Ｘ２０９が脂肪族残基であり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基であり；Ｘ２６９が拘束性残基であり；Ｘ２７３が芳香族残基であり；Ｘ２８２が極性残基であり；Ｘ２９７が極性残基であり；Ｘ３２１が拘束性残基である。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ２６が、Ｐ、Ｈ、Ｆ、もしくはW、特にＨであり、かつ／またはＸ６２が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｙ、Ｆ、もしくはW、特にＴもしくはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ１３６が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にWまたはＩであり；Ｘ２０９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬである。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ６１が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ６２が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＴまたはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ９４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＩまたはＬであり；Ｘ１３６が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にWまたはＩであり；Ｘ２０９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２８２が、Ｓ、ＮまたはＱ、特にＳである。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ６１が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ６２が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＴまたはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ８１が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ９４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＩまたはＬであり；Ｘ１３６が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｙ、Ｆ、またはW、特にWまたはＩであり；Ｘ２０９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７がＳ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＮであり；Ｘ２６９が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２８２が、Ｓ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ２９７が、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ３２１が、ＨまたはＰ、特にＰである。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ６０が、ＦまたはW、特にＦであり；Ｘ６１が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ６２が、Ｙ、Ｆ、W、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＴまたはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ８１が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ９４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が、Ａ、Ｖ、またはＬ、特にＬであり；Ｘ１２４が、Ｐ、Ｈ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ１９９が、Ｙ、Ｆ、W、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にWまたはＩであり；Ｘ２０９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＮであり；Ｘ２６９が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２７３が、Ｙ、Ｆ、またはW、特にＹであり；Ｘ２８２が、Ｓ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ２９７が、Ｓ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ３２１が、ＨまたはＰ、特にＰである。

【０１６７】
いくつかの実施形態では、１つまたは複数の残基位置Ｘ６９、Ｘ１２２、Ｘ２２３、およびＸ２８４で、上述したような特徴を有する操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の追加の特徴を含む：Ｘ８が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ６０が、ＦまたはＷ、特にＦであり；Ｘ６１が、Ｙ、Ｆ、またはＷ、特にＹであり；Ｘ６２が、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＴまたはＦであり；Ｘ６５が、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＡであり；Ｘ８１が、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＧであり；Ｘ９４が、Ａ、Ｖ、ＬまたはＩ、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が、Ａ、Ｖ、またはＬ、特にＬであり；Ｘ１２４が、Ｐ、Ｈ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１２６が、Ｎ、Ｑ、またはＴ、特にＴであり；Ｘ１３６が、Ｙ、Ｆ、またはＷ、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、Ｆ、Ｗ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１５２が、Ｃ、Ｇ、Ｍ、Ａ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１６９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ１９９が、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ａ、Ｌ、またはＩ、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が、Ｖ、Ｌ、またはＩ、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が、Ｓ、Ｔ、Ｎ、またはＱ、特にＮであり；Ｘ２６９が、ＨまたはＰ、特にＰであり；Ｘ２７３が、Ｙ、Ｆ、またはＷ、特にＹであり；Ｘ２８２が、Ｓ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ２９７がＳ、Ｔ、ＮまたはＱ、特にＳであり；Ｘ３２１がＨまたはＰ、特にＰである。

【０１６８】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり、；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８４が非極性残基であり、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照アミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置（すなわち、Ｘ１２２；Ｘ２２３；およびＸ２８４）について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号８または１０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。

【０１６９】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８４が非極性残基であり、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照アミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置（すなわち、Ｘ６９；Ｘ１２２；Ｘ２２３；およびＸ２８４）について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照アミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１７４が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８４が、非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照アミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８

７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、または極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８４が、非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１４の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１７８が、極性残基、特にＳであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；特にＸ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２２５が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポ

リペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２２５が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１８）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１８の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。

いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号２０、２２、２８、３０、３２、３４、３８または４０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２０、２２、２８、３０、３２、３４、３８または４０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にHであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはHであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２２５が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号２４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２４の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にHであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはHであり；Ｘ１３６が

芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１７４が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２３０が脂肪族残基、特にＶであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号２６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号３６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号３６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、

９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。
【０１７９】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、少なくとも以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ４が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２６が、芳香族残基または拘束性残基、特にＨであり；Ｘ６２が芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号４２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。
【０１８０】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少な

くとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号４４、４６または４８）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４４、４６または４８の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がシステイン（Ｃ）であり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号５０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号５０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１５２が、Ｃ、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３

、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号５２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号５２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が、芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号５４または５６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号５４または５６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、

または脂肪族残基、特にM、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号５８または６０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号５８または６０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にM、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１６０が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号６２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、

９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。
【０１８６】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１３７が、極性残基または脂肪族残基、特にＴまたはＩであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ３０６が脂肪族残基、特にＬである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号６４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６４の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。
【０１８７】
いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基、特にＬまたはＫであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１５２がＣ、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異

とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号６６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基または非極性残基、特にＤ、Ｖ、Ｇ、ＱまたはＡであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１０２が、脂肪族残基または塩基性残基、特にＬまたはＫであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６３が、脂肪族残基または拘束性残基、特にＨまたはＶであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１１が脂肪族残基、特にＩであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２５２が、芳香族残基または脂肪族残基、特にＦであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号６８）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６８の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ４８が、極性残基、酸性残基、脂肪族残基または非極性残基、特にＡであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ

、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が、脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が芳香族残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号７０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号７０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号７２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号７２の参照配列

と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１７８が極性残基、特にＳであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号７４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号７４の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１７８が極性残基、特にＳであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２５２が、芳香族残基または脂肪族残基、特にＦであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の

残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照アミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号７６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号７６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１７８が極性残基、特にＳであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９２が極性残基、特にＴであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号７８）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号７８の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号８０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号８０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が、芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１７８が極性残基、特にＳであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつか

の実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号８２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号８２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が、芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号８４、８６、８８、９６、９８、または１００）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号８４、８６、８８、９６、９８、または１００の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、Ｙ

またはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１３６が、芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号９０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号９０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が、拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の

残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号９２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号９２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＦ、Ｈ、またはＳであり；Ｘ１５２が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号９４）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号９４の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０２００】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ

酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ３２９が、拘束性残基または芳香族残基、特にＨである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１０２）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１０２の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＳであり；Ｘ１５２が、システイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１

～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１１０）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１１０の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、以下の特徴を含むアミノ酸配列を含む：Ｘ８が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ４９が芳香族残基、特にＴであり；Ｘ６０が芳香族残基、特にＦであり；Ｘ６１が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ６２が、芳香族残基または極性残基、特にＴ、ＹまたはＦであり；Ｘ６５が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ６９が、Ｃ、または非極性残基、脂肪族残基、もしくは極性残基、特にＧ、Ｃ、Ｔ、Ａ、またはＳであり；Ｘ８１が非極性残基、特にＧであり；Ｘ９４が脂肪族残基、特にＩまたはＬであり；Ｘ９６が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１１７が非極性残基、特にＧであり；Ｘ１２２が、拘束性残基、非極性残基、または脂肪族残基、特にＭ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＨであり；Ｘ１２４が、極性残基または拘束性残基、特にＴ、ＨまたはＮであり；Ｘ１２６が極性残基、特にＴであり；Ｘ１３６が芳香族残基、特にＹまたはＦであり；Ｘ１５０が、芳香族残基、拘束性残基または極性残基、特にＳであり；Ｘ１５２が、システイン（Ｃ）、非極性残基、脂肪族残基、または極性残基、特にＧ、Ｉ、Ｌ、ＳまたはＣであり；Ｘ１６９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ１９９が、脂肪族残基または芳香族残基、特にＷまたはＩであり；Ｘ２０９が脂肪族残基、特にＬであり；Ｘ２１５がＣであり；Ｘ２１７が極性残基、特にＮであり；Ｘ２２３が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２６９が拘束性残基、特にＰであり；Ｘ２７３が芳香族残基、特にＹであり；Ｘ２８２が極性残基、特にＳであり；Ｘ２８４が非極性残基、特にＧであり；Ｘ２９７が極性残基、特にＳであり；Ｘ３０２が脂肪族残基、特にＡであり；Ｘ３２１が拘束性残基、特にＰである。いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼポリペプチドは、他の残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり、前述の指定された残基位置について記載された特徴を有するアミノ酸配列を含むことができ（例えば、配列番号１６６）、ただし、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、少なくとも、指定された残基位置について記載された特徴を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１６６の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％

、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

【０２０３】

以下の表２は、例示的な操作されたトランスアミナーゼポリペプチドを提供し、各行は、奇数が、偶数によって提供されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を指す、２つの配列番号を列挙している。残基差異は、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ　ＫＮＫ１６８に由来するトランスアミナーゼである配列番号２の参照配列との比較に基づき、残基Ｘ３０６位でイソロイシン（Ｉ）がバリン（Ｖ）と置換しているということにおいて、天然に存在する酵素と異なる。活性の列において、増大する活性のレベル（すなわち、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」など）は、以下のように定義された：「＋」は、配列番号４の活性と少なくとも等しいが２倍未満であることを示し（アッセイ条件：２ｇ／Ｌのケトアミド基質、０．５Ｍのイソプロピルアミン、２２℃、ｐＨ７．５、５％のＤＭＳＯ、１００μＭのＰＬＰ）；「＋＋」は、配列番号４の活性より約５０～１００倍大きいことを示し（アッセイ条件：２ｇ／Ｌのケトアミド基質、０．５Ｍのイソプロピルアミン、２２℃、ｐＨ７．５、５％のＭｅＯＨ、１００μＭのＰＬＰ）；「＋＋＋」は、配列番号２２の活性より約１．１～約５倍大きいことを示し（アッセイ条件：５～１０ｇ／Ｌのケトアミド基質、０．５～１Ｍのイソプロピルアミン、２２～３０℃、ｐＨ７．５、５％のＭｅＯＨ、１００μＭのＰＬＰ）；「＋＋＋＋」は、配列番号４８の活性より約１．１～５倍大きいことを示し（アッセイ条件：１０～４０ｇ／Ｌのケトアミド基質、１Ｍのイソプロピルアミン、３０～４５℃、ｐＨ８．５、１０％のＭｅＯＨ、１００μＭのＰＬＰ）；「＋＋＋＋＋」は、配列番号５８の活性より約１．１～５倍以上大きいことを示し（アッセイ条件：４０～１００ｇ／Ｌのケトアミド基質、１Ｍのイソプロピルアミン、４５℃、ｐＨ８．５、１０％のＭｅＯＨ～２５％のＤＭＳＯ、２５０μＭのＰＬＰ）；「＋＋＋＋＋＋」は、配列番号１０４の活性より約１．１～５倍以上大きいことを示す（アッセイ条件：４０～１００ｇ／Ｌのケトアミド基質、１Ｍのイソプロピルアミン、４５℃、ｐＨ８．５、５０％のＤＭＳＯ、１０００μＭのＰＬＰ）。メタノールおよびＤＭＳＯを使用して活性を測定するための例示的なアッセイ条件は、実施例６～１１に記載されている。

【０２０４】

【表２－１】

表2

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
1/2	-	-	---
3/4	V69G; F122V; S223P; A284G	4	+
5/6	V65A; V69G; F122I; S223P	4	+
7/8	F122L; S223P; A284G	3	+
9/10	F122I; S223P; A284G	3	+
11/12	F122L; S174A; S223P; A284G	4	+
13/14	Y26H; V65A; V69G; F122I; S223P; A284G	6	+
15/16	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122I; T178S; V199W; S223P; F225Y; T282S; A284G	11	++
17/18	Y26H; H62F; V65A; V69G; F122V; G136Y; V199I; A209L; S223P; F225Y; T282S; A284G	12	++
19/20	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122V; G136Y; E137T; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	++
21/22	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	++
23/24	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122I; G136Y; E137T; V199I; A209L; S223P; F225Y; T282S; A284G	13	++
25/26	Y26H; V65A; V69G; F122V; G136Y; E137I; S174A; V199I; A209L; S223P; I230V; A284G	12	++
27/28	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122H; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++
29/30	Y26H; H62T; V65A; V69T; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++
31/32	Y26H; H62T; V65A; V69C; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++
33/34	Y26H; H62T; V65A; V69A; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++
35/36	Y26H; L61Y; H62T; V65A; V69G; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	13	+++
37/38	Y26H; H62Y; V65A; V69G; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++

【０２０５】

【表２－２】

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
39/40	Y26H; H62T; V65A; V69G; F122I; G136F; E137I; V199I; A209L; S223P; T282S; A284G	12	+++
41/42	S4Y; Y26H; H62T; V65A; V69G; M94I; F122I; G136Y; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	15	+++
43/44	H62T; V65A; V69G; M94I; F122I; G136Y; E137I; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	13	+++
45/46	H62T; V65A; V69G; M94I; F122I; G136Y; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	13	+++
47/48	H62T; V65A; V69C; M94I; F122I; G136Y; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	13	+++
49/50	S8P; H62T; V65A; V69C; M94I; F122I; G136Y; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	14	++++
51/52	L61Y; H62T; V65A; V69S; M94I; F122I; G136F; E137T; V152I; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	15	++++
53/54	L61Y; H62T; V65A; V69C; M94I; F122V; G136F; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	14	++++
55/56	L61Y; H62T; V65A; V69T; M94I; F122V; G136F; E137T; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	14	++++
57/58	L61Y; H62T; V65A; V69T; M94I; F122I; G136F; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	13	++++
59/60	L61Y; H62T; V65A; V69T; M94I; F122H; G136F; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	13	++++
61/62	L61Y; H62T; V65A; V69C; M94I; F122I; G136Y; E137T; F160L; A169L; V199I; A209L; G215C; S223P; L269P; T282S; A284G	17	++++
63/64	L61Y; H62T; V65A; V69C; M94L; F122I; G136Y; E137T; A169L; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G; V306L	16	++++
65/66	L61Y; H62T; V65A; V69C; M94I; Q102L; F122I; G136F; Y150F; V152I; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	16	++++
67/68	S8P; P48A; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; Q102K; F122I; G136F; I163V; V199I; A209L; L211I; G215C; G217N; S223P; L252F; L273Y; T282S; A284G; S321P	24	+++++
69/70	S8P; P48A; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; F122I; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; T282S; A284G; P297S; S321P	21	+++++
71/72	S8P; L61Y; H62T; V65A; V69T; M94I; F122I; G136F; V199I; A209L; G215C; S223P; T282S; A284G	14	+++++
73/74	S8P; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94L; I96L; F122I; G136F; T178S; V199I; A209L; G215C; S223P; L269P; T282S; A284G; P297S; S321P	20	+++++
75/76	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; G136F; V152L; T178S; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L252F; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	25	+++++
77/78	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94L; I96L; F122I; G136F; A169L; T178S; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; T282S; A284G; S292T; P297S; S321P	24	+++++
79/80	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N;	23	+++++

【０２０６】

【表２－３】

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
	S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P		
81/82	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94L; I96L; F122I; G136F; A169L; T178S; V199I; A209L; G215C; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	23	+++++
83/84	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; S124T; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
85/86	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; S124H; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
87/88	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; S124N; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
89/90	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; G136F; Y150H; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
91/92	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124H; G136F; Y150H; V152S; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	26	+++++
93/94	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	26	+++++
95/96	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124N; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
97/98	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122I; S124H; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
99/100	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124N; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	24	+++++
101/102	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124N; G136F; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P; Q329H	25	+++++
103/104	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	26	+++++
105/106	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; S126T; G136F; R138K; Y150S; V152G; Q155M; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	29	+++++
107/108	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; R138P; Q146R; Y150S; V152S; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	28	+++++
109/110	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L;	27	++++++

【０２０７】

【表２－４】

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
	F122M; S124T; S126T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P		
111/112	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; I163H; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
113/114	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y148A; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
115/116	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; W156Q; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
117/118	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; R164V; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
119/120	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y148F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
121/122	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; E120Y; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
123/124	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; Q155V; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
125/126	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; R164P; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
127/128	S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; Q155T; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
129/130	S8P; E50L; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
131/132	S8P; L18I; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
133/134	S8P; D25Q; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S;	27	++++++

【０２０８】

【表２－５】

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
	A284G; P297S; S321P		
135/136	S8P; E42G; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
137/138	S8P; P48D; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
139/140	S8P; P30Q; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N ;S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
141/142	S8P; L28P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
143/144	S8P; I41H; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
145/146	S8P; P30M; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
147/148	S8P; S54H; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
149/150	S8P; L18C; I55V; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	28	++++++
151/152	S8P; P48G; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
153/154	S8P; P48V; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
155/156	S8P; I41S; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
157/158	S8P; E27T; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
159/160	S8P; S54P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I;	27	++++++

【０２０９】

【表２－６】

配列番号	配列番号2と比べた残基差異	残基差異の数	活性
	I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P		
161/162	S8P; P48Q; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	27	++++++
163/164	A5K; S8P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; S126T; G136F; Y150S; V152C; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	28	++++++
165/166	S8P; S49T; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; E117G; F122M; S124T; S126T G136F; Y150S; V152S; A169L; V199I; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; V302A; S321P	30	++++++
167/168	S8P; S54P; Y60F; L61Y; H62T; V65A; V69T; D81G; M94I; I96L; F122M; S124T; S126T; G136F; Y150S; V152S; A169L; V199I; D204A; A209L; G215C; G217N; S223P; L269P; L273Y; T282S; A284G; P297S; S321P	29	++++++

【０２１０】

上述したように、いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の参照配列と少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２によって表されるトランスアミナーゼと比較した場合、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異を有することができる。いくつかの実施形態では、残基差異の数は、配列番号２と比較した場合、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の差異とすることができる。

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に基づく参照配列と少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９

％同一であるアミノ酸配列を含み、ただし、改善されたトランスアミナーゼアミノ酸配列は、配列番号２と比較した場合、表２に列挙されたポリペプチド配列のいずれか１つに含まれる一連の残基差異のいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、参照配列と比較した場合、他のアミノ酸残基位置で、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異をさらに有することができる。いくつかの実施形態では、差異の数は、他の残基位置で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０の残基差異とすることができる。いくつかの実施形態では、他の残基位置での残基差異は、保存アミノ酸残基との置換を含む。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナーの存在下で、２１０ｎｍでのＨＰＬＣ－ＵＶによって検出可能な生成物のレベルまで変換することができる、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の配列に対応するアミノ酸配列を含む。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質を生成物に、配列番号４のポリペプチドより５０～１００倍以上の活性を伴って変換することができる。いくつかの実施形態では、ケトアミド基質を生成物に、配列番号４のポリペプチドより５０～１００倍以上の活性を伴って変換することができる、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質を生成物に、配列番号２２のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる。いくつかの実施形態では、ケトアミド基質を生成物に、配列番号２２のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９

２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の配列に対応するアミノ酸配列を含む。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質を生成物に、配列番号４８のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる。いくつかの実施形態では、ケトアミド基質を生成物に、配列番号４８のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の配列に対応する配列を含む。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、ケトアミド基質を生成物に、配列番号５８のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる。いくつかの実施形態では、ケトアミド基質を生成物に、配列番号５８のポリペプチドより約１．１～５倍以上の活性を伴って変換することができる、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の配列に対応するアミノ酸配列を含む。

【０２１６】

上述したように、いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドはまた、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の鏡像異性体過剰率を伴って変換することができる。指定されたレベルのエナンチオ選択性を有する例示的なトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含むことができる。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、改善された操作されたトランスアミナーゼポリペプチドは、本明細書に記載される操作されたトランスアミナーゼポリペプチドの欠失を含むことがで

きる。したがって、本開示のトランスアミナーゼポリペプチドのそれぞれの、およびあらゆる実施形態について、欠失は、トランスアミナーゼ活性の機能活性が維持される限り、１以上のアミノ酸、２以上のアミノ酸、３以上のアミノ酸、４以上のアミノ酸、５以上のアミノ酸、６以上のアミノ酸、８以上のアミノ酸、１０以上のアミノ酸、１５以上のアミノ酸、または２０以上のアミノ酸、トランスアミナーゼポリペプチドの、アミノ酸の合計数の最大１０％、アミノ酸の合計数の最大１０％、アミノ酸の合計数の最大２０％、アミノ酸の合計数の最大３０％を構成することができる。いくつかの実施形態では、欠失は、１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５、１～４０、１～４５、１～５０、１～５５、または１～６０の残基差異を含むことができる。いくつかの実施形態では、欠失の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０のアミノ酸とすることができる。いくつかの実施形態では、欠失は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、または３０アミノ酸残基の欠失を含むことができる。

【０２１８】

本明細書に記載されるように、本開示のトランスアミナーゼポリペプチドは、融合ポリペプチドの形態とすることができ、融合ポリペプチドでは、トランスアミナーゼポリペプチドは、他のポリペプチド、例えば、例として、限定することなく、抗体タグ（例えば、ｍｙｃエピトープ）、精製配列（例えば、金属に結合するためのＨｉｓタグ）、および細胞局在化シグナル（例えば、分泌シグナル）などに融合している。したがって、トランスアミナーゼポリペプチドは、他のポリペプチドと融合させて、または融合させずに使用することができる。

【０２１９】

本明細書に記載されるポリペプチドは、遺伝的にコードされるアミノ酸に制限されない。遺伝的にコードされるアミノ酸に加えて、本明細書に記載されるポリペプチドは、天然に存在する、および／または合成のコードされないアミノ酸から全体的に、または部分的になっていてもよい。本明細書に記載されるポリペプチドが構成され得る、ある特定の一般に遭遇されるコードされないアミノ酸として、それだけに限らないが：遺伝的にコードされるアミノ酸のＤ－立体異性体；２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄｐｒ）；α－アミノイソ酪酸（Ａｉｂ）；ε－アミノヘキサン酸（Ａｈａ）；δ－アミノ吉草酸（Ａｖａ）；Ｎ－メチルグリシンまたはサルコシン（ＭｅＧｌｙまたはＳａｒ）；オルニチン（Ｏｒｎ）；シトルリン（Ｃｉｔ）；ｔ－ブチルアラニン（Ｂｕａ）；ｔ－ブチルグリシン（Ｂｕｇ）；Ｎ－メチルイソロイシン（ＭｅＩｌｅ）；フェニルグリシン（Ｐｈｇ）；シクロヘキシルアラニン（Ｃｈａ）；ノルロイシン（Ｎｌｅ）；ナフチルアラニン（Ｎａｌ）；２－クロロフェニルアラニン（Ｏｃｆ）；３－クロロフェニルアラニン（Ｍｃｆ）；４－クロロフェニルアラニン（Ｐｃｆ）；２－フルオロフェニルアラニン（Ｏｆｆ）；３－フルオロフェニルアラニン（Ｍｆｆ）；４－フルオロフェニルアラニン（Ｐｆｆ）；２－ブロモフェニルアラニン（Ｏｂｆ）；３－ブロモフェニルアラニン（Ｍｂｆ）；４－ブロモフェニルアラニン（Ｐｂｆ）；２－メチルフェニルアラニン（Ｏｍｆ）；３－メチルフェニルアラニン（Ｍｍｆ）；４－メチルフェニルアラニン（Ｐｍｆ）；２－ニトロフェニルアラニン（Ｏｎｆ）；３－ニトロフェニルアラニン（Ｍｎｆ）；４－ニトロフェニルアラニン（Ｐｎｆ）；２－シアノフェニルアラニン（Ｏｃｆ）；３－シアノフェニルアラニン（Ｍｃｆ）；４－シアノフェニルアラニン（Ｐｃｆ）；２－トリフルオロメチルフェニルアラニン（Ｏｔｆ）；３－トリフルオロメチルフェニルアラニン（Ｍｔｆ）；４－トリフルオロメチルフェニルアラニン（Ｐｔｆ）；４－アミノフェニルアラニン（Ｐａｆ）；４－ヨードフェニルアラニン（Ｐｉｆ）；４－アミノメチルフェニルアラニン（Ｐａｍｆ）；２，４－ジクロロフェニルアラニン（Ｏｐｅｆ）；３，４－ジクロロフェニルアラニン（Ｍｐｃｆ）；２，４－ジフルオロフェニルアラニン（Ｏｐｆｆ）；３，４－ジフルオロ

フェニルアラニン（Ｍｐｆｆ）；ピリド－２－イルアラニン（２ｐＡｌａ）；ピリド－３－イルアラニン（３ｐＡｌａ）；ピリド－４－イルアラニン（４ｐＡｌａ）；ナフト－１－イルアラニン（ＩｎＡｌａ）；ナフト－２－イルアラニン（２ｎＡｌａ）；チアゾリルアラニン（ｔａＡｌａ）；ベンゾチエニルアラニン（ｂＡｌａ）；チエニルアラニン（ｔＡｌａ）；フリルアラニン（ｆＡｌａ）；ホモフェニルアラニン（ｈＰｈｅ）；ホモチロシン（ｈＴｙｒ）；ホモトリプトファン（ｈＴｒｐ）；ペンタフルオロフェニルアラニン（５ｆｆ）；スチリルアラニン（ｓｔｙｒｙｌｋａｌａｎｉｎｅ）（ｓＡｌａ）；アントリルアラニン（ａｕｔｈｒｙｌａｌａｎｉｎｅ）（ａＡｌａ）；３，３－ジフェニルアラニン（Ｄｆａ）；３－アミノ－５－フェニルペンタン酸（ｐｈｅｎｙｐｅｎｔａｎｏｉｃ ａｃｉｄ）（Ａｆｐ）；ペニシラミン（Ｐｅｎ）；１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸（Ｔｉｃ）；β－２－チエニルアラニン（Ｔｈｉ）；メチオニンスルホキシド（Ｍｓｏ）；Ｎ（ｗ）－ニトロアルギニン（ｎＡｒｇ）；ホモリシン（ｈＬｙｓ）；ホスホノメチルフェニルアラニン（ｐｍＰｈｅ）；ホスホセリン（ｐＳｅｒ）；ホスホトレオニン（ｐＴｈｒ）；ホモアスパラギン酸（ｈＡｓｐ）；ホモグルタミン酸（ｈＧｌｕ）；１－アミノシクロペンター（２または３）－エン－４カルボン酸；ピペコリン酸（ＰＡ）、アゼチジン－３－カルボン酸（ＡＣＡ）；１－アミノシクロペンタン－３－カルボン酸；アリルグリシン（ａＯｌｙ）；プロパルギルグリシン（ｐｇＧｌｙ）；ホモアラニン（ｈＡｌａ）；ノルバリン（ｎＶａｌ）；ホモロイシン（ｈＬｅｕ）、ホモバリン（ｈＶａｌ）；ホモイソロイシン（ｈＩｌｅ）；ホモアルギニン（ｈＡｒｇ）；Ｎ－アセチルリシン（ＡｃＬｙｓ）；２，４－ジアミノ酪酸（Ｄｂｕ）；２，３－ジアミノ酪酸（Ｄａｂ）；Ｎ－メチルバリン（ＭｅＶａｌ）；ホモシステイン（ｈＣｙｓ）；ホモセリン（ｈＳｅｒ）；ヒドロキシプロリン（Ｈｙｐ）、およびホモプロリン（ｈＰｒｏ）が挙げられる。本明細書に記載されるポリペプチドが構成され得る追加のコードされないアミノ酸は、当業者に明らかとなるであろう（例えば、Ｆａｓｍａｎ、１９８９年、ＣＲＣ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ、ＦＬ、３～７０頁、およびこれに引用されている参考文献に提供されている様々なアミノ酸を参照。これらの文献のすべてが参照により組み込まれている）。これらのアミノ酸は、Ｌ－配置であっても、Ｄ－配置であってもよい。

【０２２０】

当業者は、側鎖保護基を有するアミノ酸または残基も、本明細書に記載されるポリペプチドを構成することができることを認識するであろう。この場合、芳香族カテゴリーに属する、そのようなアミノ酸の非限定例として（保護基は、括弧内に列挙されている）、それだけに限らないが、Ａｒｇ（ｔｏｓ）、Ｃｙｓ（メチルベンジル）、Ｃｙｓ（ニトロピリジンスルフェニル）、Ｇｌｕ（δ－ベンジルエステル）、Ｇｌｎ（キサンチル）、Ａｓｎ（Ｎ－δ－キサンチル）、Ｈｉｓ（ｂｏｍ）、Ｈｉｓ（ベンジル）、Ｈｉｓ（ｔｏｓ）、Ｌｙｓ（ｆｍｏｃ）、Ｌｙｓ（ｔｏｓ）、Ｓｅｒ（Ｏ－ベンジル）、Ｔｈｒ（Ｏ－ベンジル）、およびＴｙｒ（Ｏ－ベンジル）が挙げられる。

【０２２１】

本明細書に記載されるポリペプチドが構成され得る、立体配置的に拘束性非コードアミノ酸として、それだけに限らないが、Ｎ－メチルアミノ酸（Ｌ－配置）；１－アミノシクロペンター（２または３）－エン－４－カルボン酸；ピペコリン酸；アゼチジン－３－カルボン酸；ホモプロリン（ｈＰｒｏ）；および１－アミノシクロペンタン－３－カルボン酸が挙げられる。

【０２２２】

上述したように、操作されたトランスアミナーゼ酵素を生成するために、天然に存在するポリペプチド中に導入される様々な修飾は、酵素の特定の特性を標的にすることができる。

【０２２３】

別の態様では、本開示は、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポ

リヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、トランスアミナーゼポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドを作り出すために、遺伝子発現を制御する１つまたは複数の非相同調節配列に、作動可能に連結することができる。操作されたトランスアミナーゼをコードする非相同ポリヌクレオチドを含有する発現コンストラクトは、適切な宿主細胞中に導入されることによって、トランスアミナーゼポリペプチドを発現することができる。

【０２２４】

様々なアミノ酸に対応するコドンの知見のために、タンパク質配列の利用可能性により、対象をコードすることができるポリヌクレオチドのすべてが説明される。同じアミノ酸が、代替または同義のコドンによってコードされる、遺伝子コードの縮退は、極端に多数の核酸が作られることを可能にし、そのすべては、本明細書に開示される、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードする。したがって、特定のアミノ酸配列が同定されると、当業者は、タンパク質のアミノ酸配列を変更しない方法で、１つまたは複数のコドンの配列を単に修飾することによって、任意の数の様々な核酸を作ることができるであろう。この点において、本開示は、可能なコドン選択に基づく組合せを選択することによって行うことができる、ポリヌクレオチドのそれぞれの、およびあらゆる可能な変化を特に企図し、すべてのそのような変化は、表２に示したアミノ酸配列を含めて、本明細書に開示される任意のポリペプチドについて具体的に開示されていると見なされるべきである。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、タンパク質が産生されている宿主細胞に合うように好ましくは選択されるコドンを含むように、選択および／または操作することができる。例えば、細菌中で使用される好適なコドンは、細菌内で遺伝子を発現させるために使用され；酵母中で使用される好適なコドンは、酵母内での発現のために使用され；哺乳動物中で使用される好適なコドンは、哺乳動物細胞内での発現のために使用される。トランスアミナーゼのコドン使用頻度を最適化するのに、すべてのコドンが置換される必要はないので（例えば、天然の配列は好適なコドンを有することができるため、および好適なコドンの使用は、すべてのアミノ酸残基に必要とされない場合があるため）、トランスアミナーゼポリペプチドをコードする、コドンが最適化されたポリヌクレオチドは、全長コード領域の約４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％超のコドン位置で好適なコドンを含有することができる。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号４の参照配列と、少なくとも８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含むトランスアミナーゼポリペプチドをコードし、このポリペプチドは、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナーの存在下で、Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ　ＫＮＫ１６８に由来する配列番号２のトランスアミナーゼの活性と比較した場合に、改善された活性を伴って変換することができる。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、または１０２に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドと、

少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むトランスアミナーゼポリペプチドをコードし、このポリペプチドは、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナーの存在下で変換することにおいて、１つまたは複数の改善された特性を有する。いくつかの実施形態では、コードされるトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号４のポリペプチドの活性以上の活性を有する。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８の参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むトランスアミナーゼポリペプチドをコードする。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に基づく参照配列と、少なくとも約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むトランスアミナーゼポリペプチドをコードし、ただし、改善されたトランスアミナーゼアミノ酸配列は、配列番号２と比較した場合、表２に列挙されたポリヌペプチド配列のいずれか１つに含まれる一連の残基差異のいずれか１つを含む。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７から選択される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、高度にストリンジェントな条件下で、

配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７を含むポリヌクレオチド、またはその補体にハイブリダイズすることができ、この高度にストリンジェントにハイブリダイズしているポリヌクレオチドは、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、アミノ基ドナーの存在下で、配列番号４のポリペプチド以上の活性を伴って変換することができるトランスアミナーゼポリペプチドをコードする。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるポリペプチドをコードするが、本明細書に記載される操作されたトランスアミナーゼをコードする参照ポリヌクレオチドと、ヌクレオチドレベルで、約８０％以上の配列同一性、約８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％、またはそれ以上の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、参照ポリヌクレオチドは、配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１５５、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、または１６７から選択される。

【０２３３】

改善されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドは、様々な方法で操作されることによって、ポリペプチドを発現することができる。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、１つまたは複数の制御配列が、ポリヌクレオチドの発現を調節するために存在する発現ベクターとして提供することができる。ベクター中に挿入する前に、単離ポリヌクレオチドを操作することが、発現ベクターに応じて望ましいか、または必要である場合がある。組換えＤＮＡ法を利用して、ポリヌクレオチドおよび核酸配列を修飾するための技法は、当技術分野で周知である。ガイダンスは、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、２００１年、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、３版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ．Ｆ．編、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、１９９８年、２００６年改訂に提供されている。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、制御配列として、とりわけ、プロモーター、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターが挙げられる。細菌性宿主細胞について、本開示の核酸コンストラクトの転写を指示するための適切なプロモーターとして、Ｅ．ｃｏｌｉ ｌａｃオペロン、Ｅ．ｃｏｌｉ ｔｒｐオペロン、バクテリオファージλ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｃｏｅｌｉｃｏｌ

ｏｒアガラーゼ遺伝子（ｄａｇＡ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓレバンスクラーゼ遺伝子（ｓａｃＢ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ α－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＬ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓマルトース生成アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＭ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ α－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＱ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓペニシリナーゼ遺伝子（ｐｅｎＰ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ｘｙｌＡおよびｘｙｌＢ遺伝子、ならびに原核生物β－ラクタマーゼ遺伝子（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆら、１９７８年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７５巻：３７２７～３７３１頁）から得られるプロモーター、ならびにｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒら、１９８３年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０巻：２１～２５頁）が挙げられる。

【０２３５】

糸状菌宿主細胞について、本開示の核酸コンストラクトの転写を指示するための適切なプロモーターとして、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性α－アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ酸安定α－アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ａｗａｍｏｒｉグルコアミラーゼ（ｇｌａＡ）、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉリパーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅアルカリ性プロテアーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアセトアミダーゼ（ａｃｅｔａｍｉｄａｓｅ）、およびＦｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼについての遺伝子から得られるプロモーター（例えば、参照により本明細書に組み込まれているＷＯ９６／００７８７を参照）、ならびにＮＡ２－ｔｐｉプロモーター（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性α－アミラーゼおよびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼについての遺伝子に由来するプロモーターのハイブリッド）、ならびにこれらの突然変異プロモーター、トランケーテッドプロモーター、およびハイブリッドプロモーターが挙げられる。

【０２３６】

酵母宿主について、有用なプロモーターは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ（ＥＮＯ－１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅガラクトキナーゼ（ＧＡＬ１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルコール脱水素酵素／グリセルアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素（ＡＤＨ２／ＧＡＰ）、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ３－ホスホグリセリン酸キナーゼについての遺伝子に由来することができる。酵母宿主細胞についての他の有用なプロモーターは、Ｒｏｍａｎｏｓら、１９９２年、Ｙｅａｓｔ ８巻：４２３～４８８頁に記載されている。

【０２３７】

制御配列は、適切な転写ターミネーター配列、すなわち、転写を停止するために宿主細胞によって認識される配列とすることもできる。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の３’末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞内で機能的である任意のターミネーターを、本発明において使用することができる。

【０２３８】

例えば、糸状菌宿主細胞についての例示的な転写ターミネーターは、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアントラニル酸シンターゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ α－グルコシダーゼ、およびＦｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼについての遺伝子から得ることができる。

【０２３９】

酵母宿主細胞についての例示的なターミネーターは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃ

ｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅチトクロムＣ（ＣＹＣ１）、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅグリセルアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素についての遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞についての他の有用なターミネーターは、Ｒｏｍａｎｏｓら、１９９２年、上記を参照、に記載されている。

【０２４０】

制御配列は、適切なリーダー配列、すなわち、宿主細胞による翻訳に重要である、ｍＲＮＡの非翻訳領域とすることもできる。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の５’末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞内で機能的である任意のリーダー配列を使用することができる。糸状菌宿主細胞についての例示的なリーダーは、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓトリオースリン酸イソメラーゼについての遺伝子から得られる。酵母宿主細胞についての適切なリーダーは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅエノラーゼ（ＥＮＯ－１）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ３－ホスホグリセリン酸キナーゼ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ α－因子、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅアルコール脱水素酵素／グリセルアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素（ＡＤＨ２／ＧＡＰ）についての遺伝子から得られる。

【０２４１】

制御配列は、ポリアデニル化配列、すなわち、核酸配列の３’末端に作動可能に連結され、転写されたとき、転写されたｍＲＮＡにポリアデノシン残基を付加するためのシグナルとして宿主細胞によって認識される配列とすることもできる。最適な宿主細胞内で機能的である任意のポリアデニル化配列を、本発明において使用することができる。糸状菌宿主細胞についての例示的なポリアデニル化配列は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアントラニル酸シンターゼ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍトリプシン様プロテアーゼ、およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ α－グルコシダーゼについての遺伝子に由来することができる。酵母宿主細胞についての有用なポリアデニル化配列は、ＧｕｏおよびＳｈｅｒｍａｎ、１９９５年、Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ １５巻：５９８３～５９９０頁に記載されている。

【０２４２】

制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に連結されたアミノ酸配列をコードし、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に向けるシグナルペプチドコード領域とすることもできる。核酸配列のコード配列の５’末端は、分泌されるポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと、翻訳読み枠内で自然に連結されるシグナルペプチドコード領域を本質的に含有することができる。あるいは、コード配列の５’末端は、このコード配列と異質であるシグナルペプチドコード領域を含有することができる。異質なシグナルペプチドコード領域は、コード配列が、シグナルペプチドコード領域を自然に含有しない場合に、必要とされる場合がある。

【０２４３】

細菌性宿主細胞についての有効なシグナルペプチドコード領域は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ＮＣｌＢ １１８３７ マルトース生成アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ α－アミラーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓサブチリシン、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ β－ラクタマーゼ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ中性プロテアーゼ（ｎｐｒＴ、ｎｐｒＳ、ｎｐｒＭ）、およびＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ｐｒｓＡについての遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、ＳｉｍｏｎｅｎおよびＰａｌｖａ、１９９３年、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ５７巻：１０９～１３７頁に記載されている。

【０２４４】

糸状菌宿主細胞についての有効なシグナルペプチドコード領域は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ中性アミラーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｉｎｓｏｌｅｎｓセルラーゼ、およびＨｕｍｉｃｏｌａ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａリパーゼについての遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域であり得る。

【０２４５】

酵母宿主細胞についての有用なシグナルペプチドは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ α－因子、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅインベルターゼについての遺伝子に由来することができる。他の有用なシグナルペプチドコード領域は、Ｒｏｍａｎｏｓら、１９９２年、上記を参照、に記載されている。

【０２４６】

制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置されるアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域とすることもできる。得られるポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド（またはいくつかの場合では、チモーゲン）として公知である。プロポリペプチドは、一般に不活性であり、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的切断または自己触媒的切断によって、成熟した活性ポリペプチドに変換することができる。プロペプチドコード領域は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓアルカリ性プロテアーゼ（ａｐｒＥ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ中性プロテアーゼ（ｎｐｒＴ）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ α－因子、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、およびＭｙｃｅｌｉｏｐｈｔｈｏｒａ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａラクターゼについての遺伝子から得ることができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれているＷＯ９５／３３８３６を参照）。

【０２４７】

シグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方が、ポリペプチドのアミノ末端で存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の隣に位置され、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の隣に位置される。

【０２４８】

宿主細胞の増殖に関連して、ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合もある。調節システムの例は、調節化合物の存在を含めて、化学的または物理的刺激に応答して遺伝子の発現をオンオフさせるものである。原核生物宿主細胞では、適切な調節配列には、ｌａｃ、ｔａｃ、およびｔｒｐオペレーターシステムが含まれる。酵母宿主細胞では、適切な調節システムには、例として、ＡＤＨ２システムまたはＧＡＬ１システムが含まれる。糸状菌では、適切な調節配列には、ＴＡＫＡ α－アミラーゼプロモーター、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼプロモーター、およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅグルコアミラーゼプロモーターが含まれる。

【０２４９】

調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にするものである。真核生物系では、これらには、メトトレキセートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、および重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子が含まれる。これらの場合では、本発明のトランスアミナーゼポリペプチドをコードする核酸配列は、調節配列と作動可能に連結される。

【０２５０】

したがって、別の実施形態では、本開示は、操作されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその変異体、ならびにプロモーターおよびターミネーターなどの１つまたは複数の発現調節領域、複製起点などを、これらが導入される宿主の型に応じて含む組換え発現ベクターも対象とする。上述した様々な核酸および制御配列を一緒に結合させることによって、組換え発現ベクターを生成することができ、これは、１つまたは複数の好都合な制限部位を含むことによって、そのような部位での、ポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にすることができる。あるいは、

本開示の核酸配列は、核酸配列または配列を含む核酸コンストラクトを、発現のための適切なベクター中に挿入することによって、発現することができる。発現ベクターを作り出すことにおいて、コード配列は、コード配列が発現のための適切な制御配列と作動可能に連結されるように、ベクター中に配置される。

【０２５１】

組換え発現ベクターは、任意のベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）とすることができ、これは、好都合なことには、組換えＤＮＡ手順にかけることができ、ポリヌクレオチド配列の発現をもたらすことができる。ベクターの選択は、ベクターが導入される宿主細胞とのベクターの適合性に一般に依存することになる。ベクターは、直線プラスミドまたは閉じた環状プラスミドとすることができる。

【０２５２】

発現ベクターは、自律複製ベクター、すなわち、染色体外の実体として存在するベクターとすることができ、その複製は、染色体複製に依存せず、例えば、プラスミド、染色体外因子、ミニ染色体、または人工染色体である。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含有することができる。あるいは、ベクターは、宿主細胞中に導入される場合、ゲノム中に組み込まれ、これが組み込まれた染色体（複数可）と一緒に複製されるものであってもよい。さらに、１つのベクターもしくはプラスミド、または宿主細胞のゲノム中に導入される全ＤＮＡを一緒に含有する２つ以上のベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンを使用することができる。

【０２５３】

本発明の発現ベクターは、形質転換細胞の容易な選択を可能にする、１つまたは複数の選択可能マーカーを含有することが好ましい。選択可能マーカーは遺伝子であり、その産物は、殺生物剤耐性またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求体への原栄養性などをもたらす。細菌性選択可能マーカーの例は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓもしくはＢａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓに由来するｄａｌ遺伝子、または抗生物質耐性、例えば、アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性、もしくはテトラサイクリン耐性などを付与するマーカーである。酵母宿主細胞についての適切なマーカーは、ＡＤＥ２、ＨＩＳ３、ＬＥＵ２、ＬＹＳ２、ＭＥＴ３、ＴＲＰ１、およびＵＲＡ３である。

【０２５４】

糸状菌宿主細胞内で使用するための選択可能マーカーとして、それだけに限らないが、ａｍｄＳ（アセトアミダーゼ）、ａｒｇＢ（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、ｂａｒ（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、ｈｐｈ（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、ｎｉａＤ（硝酸還元酵素）、ｐｙｒＧ（オロチジン－５’－リン酸脱炭酸酵素）、ｓＣ（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）、およびｔｒｐＣ（アントラニル酸シンターゼ）、ならびにこれらの均等物が挙げられる。Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ細胞内で使用するための実施形態には、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅのａｍｄＳおよびｐｙｒＧ遺伝子、ならびにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓのｂａｒ遺伝子が含まれる。

【０２５５】

トランスアミナーゼを発現するための発現ベクターは、ベクターの、宿主細胞のゲノム中への組込み、またはゲノムに依存しない細胞内でのベクターの自律複製を可能にする成分（複数可）を含有することができる。宿主細胞ゲノム中に組み込むために、ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸配列、または相同性もしくは非相同性の再結合によってゲノム中にベクターを組み込むためのベクターの任意の他の成分に依拠する場合がある。

【０２５６】

あるいは、発現ベクターは、宿主細胞のゲノム中への相同的組換えによる組込みを指示するための追加の核酸配列を含有することができる。追加の核酸配列は、ベクターが、染色体（複数可）中の正確な位置（複数可）で、宿主細胞ゲノム中に組み込まれることを可

能にする。正確な位置での組込みの可能性を増大させるために、組込み成分（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎａｌ　ｅｌｅｍｅｎｔ）は、好ましくは、十分な数の核酸、例えば、１００～１０，０００塩基対、好ましくは４００～１０，０００塩基対、最も好ましくは８００～１０，０００塩基対などを含有するべきであり、これらは、対応する標的配列と高度に相同であることによって、相同的組換えの確率を増強する。組込み成分は、宿主細胞のゲノム中の標的配列と相同である任意の配列とすることができる。さらに、組込み成分は、非コード核酸配列であっても、コード核酸配列であってもよい。一方、ベクターは、非相同的組換えによって宿主細胞のゲノム中に組み込むことができる。

【０２５７】

自律複製のために、ベクターは、ベクターが対象の宿主細胞内で自発的に複製することを可能にする複製起点をさらに含む場合がある。細菌性の複製起点の例は、Ｐ１５Ａ　ｏｒｉ、またはＥ．ｃｏｌｉ内での複製を可能にする、プラスミドｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１９、ｐＡＣＹＣ１７７（このプラスミドは、Ｐ１５Ａ　ｏｒｉを有する）、もしくはｐＡＣＹＣ１８４、およびＢａｃｉｌｌｕｓ内での複製を可能にするｐＵＢ１１０、ｐＥ１９４、ｐＴＡ１０６０、もしくはｐＡＭβ１の複製起点である。酵母宿主細胞内で使用するための複製起点の例は、２ミクロン複製起点、ＡＲＳ１、ＡＲＳ４、ＡＲＳ１とＣＥＮ３の組合せ、およびＡＲＳ４とＣＥＮ６の組合せである。複製起点は、その機能を、宿主細胞内で温度感受性にする突然変異を有するものであってもよい（例えば、Ｅｈｒｌｉｃｈ、１９７８年、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　７５巻：１４３３頁を参照）。

【０２５８】

本発明の核酸配列の１つを超えるコピーを、宿主細胞に挿入することによって、遺伝子産物の産生を増大させることができる。核酸配列のコピー数の増加は、宿主細胞ゲノム中に配列の少なくとも１つの追加のコピーを組み込むことによって、または増幅可能な選択可能マーカー遺伝子を核酸配列に含めることによって得ることができ、この場合、選択可能マーカー遺伝子の増幅されたコピー、およびそれによって核酸配列の追加のコピーを含有する細胞は、適切な選択可能剤（ｓｅｌｅｃｔａｂｌｅ　ａｇｅｎｔ）の存在下で、細胞を培養することによって選択することができる。

【０２５９】

本発明で使用するための発現ベクターの多くは市販されている。適切な市販の発現ベクターには、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ．からのｐ３×ＦＬＡＧＴＭＴＭ発現ベクターが含まれ、これは、哺乳動物宿主細胞における発現のためのＣＭＶプロモーターおよびｈＧＨポリアデニル化部位、ならびにＥ．ｃｏｌｉにおける増幅のためのｐＢＲ３２２複製起点およびアンピシリン耐性マーカーを含む。他の適切な発現ベクターは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、ＬａＪｏＩＩａ　ＣＡから市販されているｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）およびｐＢＫ－ＣＭＶ、ならびにｐＢＲ３２２（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）、ｐＵＣ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）、ｐＲＥＰ４、ｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、またはｐＰｏｌｙ（Ｌａｔｈｅら、１９８７年、Ｇｅｎｅ　５７巻：１９３～２０１頁）に由来するプラスミドである。

【０２６０】

別の態様では、本開示は、本開示の改善されたトランスアミナーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供し、このポリヌクレオチドは、宿主細胞内でトランスアミナーゼ酵素を発現するために、１つまたは複数の制御配列に作動可能に連結されている。本発明の発現ベクターによってコードされるトランスアミナーゼポリペプチドを発現させるのに使用するための宿主細胞は、当技術分野で周知であり、これらとして、それだけに限らないが、細菌性細胞、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ細胞、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ細胞、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ細胞など；真菌細胞、例えば、酵母細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、またはＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＡＴＣＣ受託番号２０１１７８））など；昆虫細胞、例えば、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｓ２細胞、お

よびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　Ｓｆ９細胞；動物細胞、例えば、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＢＨＫ細胞、２９３細胞、およびＢｏｗｅｓ黒色腫細胞など；ならびに植物細胞が挙げられる。上述した宿主細胞のための適切な培地および増殖条件は、当技術分野で周知である。

【０２６１】

トランスアミナーゼを発現させるためのポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の様々な方法によって細胞内に導入することができる。技法として、とりわけ、電気穿孔、微粒子銃粒子ボンバードメント、リポソーム媒介トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクション、およびプロトプラスト融合が挙げられる。細胞内にポリヌクレオチドを導入するための様々な方法は、当業者に明らかとなるであろう。

【０２６２】

例示的な宿主細胞は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０である。発現ベクターは、改善されたトランスアミナーゼをコードするポリヌクレオチドを、ｌａｃＩ抑制因子の制御下で、ｌａｃプロモーターに作動可能に連結されたプラスミドｐＣＫ１１０９００に作動可能に連結することによって作り出された。発現ベクターは、Ｐ１５ａ複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含んでいた。Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０内で対象のポリヌクレオチドを含有する細胞は、細胞をクロラムフェニコール選択にかけることによって単離された。

【０２６３】

改善されたトランスアミナーゼ、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、当業者によって一般に使用される方法を使用して調製することができる。上述したように、親配列の配列番号２が導出されたＡｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ　ＫＮＫ１６８の野生型トランスアミナーゼ酵素をコードする、天然に存在するアミノ酸配列および対応するポリヌクレオチドは、参照により本明細書に組み込まれている米国特許第７，１６９，５９２号において入手可能である。いくつかの実施形態では、親ポリヌクレオチド配列は、指定された宿主細胞内でのトランスアミナーゼの発現を増強するためにコドンが最適化されている。配列番号１を指定されたポリヌクレオチド配列は、操作されたトランスアミナーゼのほとんどの実験およびライブラリー構成のための開始点として利用される親配列であった。

【０２６４】

操作されたトランスアミナーゼは、天然に存在するトランスアミナーゼをコードするポリヌクレオチドを、突然変異生成および／または指向進化法にかけることによって得ることができる。例示的な指向進化技法は、Ｓｔｅｍｍｅｒ、１９９４年、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９１巻：１０７４７～１０７５１頁；ＷＯ９５／２２６２５；ＷＯ９７／００７８；ＷＯ９７／３５９６６；ＷＯ９８／２７２３０；ＷＯ００／４２６５１；ＷＯ０１／７５７６７、および米国特許第６，５３７，７４６号（これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれている）に記載されているような突然変異生成および／またはＤＮＡシャッフリングである。

【０２６５】

使用することができる他の指向進化手順として、とりわけ、ジグザグ伸長プロセス（ＳｔＥＰ）、インビトロ再結合（Ｚｈａｏら、１９９８年、Ｎａｔ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　１６巻：２５８～２６１頁）、突然変異誘発性ＰＣＲ（Ｃａｌｄｗｅｌｌら、１９９４年、ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ａｐｐｌ．　３巻：Ｓ１３６～Ｓ１４０頁）、およびカセット突然変異生成（Ｂｌａｃｋら、１９９６年、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９３巻：３５２５～３５２９頁）が挙げられる。本明細書の目的に有用な突然変異生成および指向進化技法は、以下の参考文献にも記載されている：Ｌｉｎｇら、１９９７年、「Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ　ｔｏ　ＤＮＡ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ：　ａｎ　ｏｖｅｒｖｉｅｗ」、Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　２５４巻（２号）：１５７～７８頁；Ｄａｌｅら、１９９６年、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｒａｎｄｏｍ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔ

hioate method」、Methods Mol. Biol. 57巻：369～74頁；Smith、1985年、「In vitro mutagenesis」、Ann. Rev. Genet. 19巻：423～462頁；Botsteinら、1985年、「Strategies and applications of in vitro mutagenesis」、Science 229巻：1193～1201頁；Carter、1986年、「Site-directed mutagenesis」、Biochem. J. 237巻：1～7頁；Kramerら、1984年、「Point Mismatch Repair」、Cell 38巻：879～887頁；Wellsら、1985年、「Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites」、Gene 34巻：315～323頁；Minshullら、1999年、「Protein evolution by molecular breeding」、Curr Opin Chem Biol 3巻：284～290頁；Christiansら、1999年、「Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling」、Nature Biotech 17巻：259～264頁；Crameriら、1998年、「DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution」、Nature 391巻：288～291頁；Crameriら、1997年、「Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling」、Nature Biotech 15巻：436～438頁；Zhangら、1997年、「Directed evolution of an effective fructosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening」、Proc Natl Acad Sci USA 94巻：45－4～4509頁；Crameriら、1996年、「Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling」、Nature Biotech 14巻：315～319頁；およびStemmer、1994年、「Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling」、Nature 370巻：389～391頁。すべての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれている。

【0266】

いくつかの実施形態では、突然変異生成処理の後に得られるクローンは、所望の改善された酵素特性を有するトランスアミナーゼについてスクリーニングされる。発現ライブラリーからのトランスアミナーゼ酵素活性の測定は、標準技法、例えば、産物の分別（例えば、ＨＰＬＣによる）、ならびに分離された基質および産物のＵＶ吸光度を測定することによる、かつ／またはタンデム質量分析法（例えば、ＭＳ／ＭＳ）を使用する検出による産物の検出などを使用して実施することができる。例示的なアッセイは、以下の実施例４に記載されている。単位時間当たりの所望の産物の増大の割合は、溶解産物（またはこれから作られる凍結乾燥粉末）の固定量におけるトランスアミナーゼポリペプチドの相対的な（酵素的な）活性を示す。望まれる改善された酵素特性が熱安定性である場合、酵素活性は、酵素配合物を規定温度に曝し、熱処理後に残っている酵素活性の量を測定した後に測定することができる。次いで、所望のトランスアミナーゼをコードするポリヌクレオチドを含有するクローンは、単離、配列決定されることによって、ヌクレオチド配列の変化（もしあれば）が同定され、宿主細胞内で酵素を発現させるのに使用される。

【0267】

操作されたポリペプチドの配列が公知である場合、酵素をコードするポリヌクレオチド

は、公知の合成方法に従って、標準的な固相法によって調製することができる。いくつかの実施形態では、最大約１００塩基の断片を、個々に合成し、次いで結合（例えば、酵素的連結（ｌｉｔｉｇａｔｉｏｎ）法もしくは化学的連結法、またはポリメラーゼ媒介法によって）することによって、任意の所望の連続的な配列を形成することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、化学合成によって、例えば、これが自動化された合成法で一般に実行される場合、例えば、Ｂｅａｕｃａｇｅら、１９８１年、Ｔｅｔ Ｌｅｔｔ ２２巻：１８５９～６９頁によって記載された古典的なホスホラミジット法、またはＭａｔｔｈｅｓら、１９８４年、ＥＭＢＯ Ｊ． ３巻：８０１～０５頁によって記載された方法を使用して調製することができる。ホスホラミジット法によれば、オリゴヌクレオチドは、例えば、自動ＤＮＡシンセサイザーで合成され、精製、アニール、連結され、適切なベクター内でクローン化される。さらに、本質的にいずれの核酸も、様々な市販源、Ｔｈｅ Ｇｒｅａｔ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｇｅｎｅ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｒａｍｏｎａ、ＣＡ、ＥｘｐｒｅｓｓＧｅｎ Ｉｎｃ． Ｃｈｉｃａｇｏ、ＩＬ、Ｏｐｅｒｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、Ａｌａｍｅｄａ、ＣＡ、および多くの他のもののいずれかから得ることができる。

【０２６８】

宿主細胞内で発現される操作されたトランスアミナーゼ酵素は、とりわけ、リゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析、超遠心分離、およびクロマトグラフィーを含めた、タンパク質精製のための周知の技法の任意の１つまたは複数を使用して、細胞および／または（ａｎｄ ｏｒ）培地から回収することができる。Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌からタンパク質を溶解し、高い効率で抽出するための適切な溶液は、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ ＭＯのＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから、商標名ＣｅｌＬｙｔｉｃ ＢＴＭで市販されている。

【０２６９】

トランスアミナーゼポリペプチドを単離するためのクロマトグラフィー技法には、とりわけ、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および親和性クロマトグラフィーが含まれる。特定の酵素を精製するための条件は、正味の電荷、疎水性、親水性、分子量、分子形状などの要因にある程度依存することになり、当業者に明らかとなるであろう。いくつかの実施形態では、操作されたトランスアミナーゼは、精製タグ、例えば、金属について親和性を有するＨｉｓタグ、または抗体に結合するための抗体タグ、例えば、ｍｙｃエピトープタグなどを伴った融合タンパク質として発現することができる。

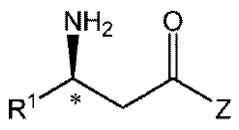
【０２７０】

いくつかの実施形態では、親和性技法を、改善されたトランスアミナーゼ酵素を単離するのに使用することができる。親和性クロマトグラフィー精製のために、トランスアミナーゼポリペプチドに特異的に結合する任意の抗体を使用することができる。抗体の産生のために、それだけに限らないが、ウサギ、マウス、ラットなどを含めた様々な宿主動物に、操作されたポリペプチドを注射することによって免疫することができる。ポリペプチドは、側鎖官能基、または側鎖官能基に結合したリンカーによって、ＢＳＡなどの適切な担体に結合することができる。それだけに限らないが、フロイント（完全な、および不完全な）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント、例えば、ＢＣＧ（ｂａｃｉｌｌｉ Ｃａｌｍｅｔｔｅ Ｇｕｅｒｉｎ）、およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍなどを含めた様々なアジュバントを、宿主種に応じて免疫応答を増大させるのに使用することができる。

【０２７１】

さらなる態様では、本明細書に記載される改善されたトランスアミナーゼポリペプチドは、アミノ基ドナーの存在下で、ある特定のアミノ基アクセプター（例えば、ケトンアクセプター）のアミノ基転移のための方法において使用することができる。本明細書の化合物を説明するために、以下の意味を適用するものとする。

【０２７２】
「アルキル」は、直線または分岐の配置で指定された長さのアルキル基を含むことが意図されている。そのようなアルキル基の例示的なものは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどである。アルキル基は、非置換であるか、またはハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノカルボニル、アミノ、$C_{1\sim4}$アルコキシ、および$C_{1\sim4}$アルキルチオからなる群から独立して選択される１～３個の基で置換されている。
【０２７３】
「シクロアルキル」は、５～１２個の合計炭素原子、またはこの範囲内の任意の数のアルカンの環状リングを意味することが意図されている（すなわち、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど）。
【０２７４】
「ハロゲン」は、ハロゲン原子のフッ素、塩素、臭素、およびヨウ素を含むことが意図されている。
【０２７５】
「アリール」は、フェニルおよびナフチルを含めた芳香族基を意味することが意図されている。「アリール」は、非置換であるか、またはフルオロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、アミノ、$C_{1\sim4}$アルキル、および$C_{1\sim4}$アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されている。
【０２７６】
「ヘテロアリール」は、Ｏ、Ｓ、およびＮから選択される少なくとも１つの環ヘテロ原子を含有する５員または６員の芳香族複素環を意味する。ヘテロアリールは、他の種類の環，例えば、アリール、シクロアルキル、および芳香族でない複素環などに縮合したヘテロアリールも含む。ヘテロアリール基の例として、それだけに限らないが、ピロリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、ピラゾリル、ピリジニル、オキサゾリル、１，２，４－オキサジアゾリル、１，３，４－オキサジアゾリル、チアジアゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、フリル、トリアジニル、チエニル、ピリミジニル、ピラジニル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、インドリニル、ピリダジニル、インダゾリル、イソインドリル、ジヒドロベンゾチエニル、インドリジニル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、ナフチリジニル、カルバゾリル、ベンゾジオキソリル、キノキサリニル、プリニル、フラザニル、イソベンジルフラニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、キノリル、インドリル、イソキノリル、およびジベンゾフラニルが挙げられる。「ヘテロアリール」は、非置換であるか、またはフルオロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、アミノ、$C_{1\sim4}$アルキル、および$C_{1\sim4}$アルコキシから独立して選択される１～５個の置換基で置換されている。
【０２７７】
いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼは、＊で印を付けられた立体中心で、示された立体化学配置を有する構造式（Ｉ）の化合物：
【０２７８】
【化１１】



(I)

【０２７９】
を、反対の鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法において使用することができ、式中、
ＺはＯＲ^{2}またはＮＲ^{2}Ｒ^{3}であり、

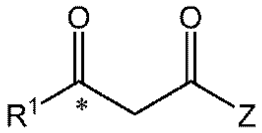
R^1は、$C_{1\sim8}$アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール－$C_{1\sim2}$アルキル、またはヘテロアリール－$C_{1\sim2}$アルキルであり；

R^2およびR^3はそれぞれ独立に、水素、$C_{1\sim8}$アルキル、アリール、またはアリール－$C_{1\sim2}$アルキルであり；あるいは

R^2およびR^3は、これらが結合している窒素原子と一緒に、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、およびNC_{0-4}アルキルから選択される追加のヘテロ原子を任意選択により含有する、４～７員の複素環系を形成し、この複素環は、非置換であるか、またはオキソ、ヒドロキシ、ハロゲン、$C_{1\sim4}$アルコキシ、および$C_{1\sim4}$アルキルから独立して選択される１～３個の置換基で置換されており、アルキルおよびアルコキシは、非置換であるか、または１～５個のフッ素で置換されており；この複素環系は、５～６員の飽和もしくは芳香族炭素環系、またはＯ、Ｓ、および$NC_{0\sim4}$アルキルから選択される１～２個のヘテロ原子を含有する、５～６員の飽和もしくは芳香族複素環系と任意選択により縮合されており、この縮合環系は、非置換であるか、またはヒドロキシ、アミノ、フッ素、$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{1\sim4}$アルコキシ、およびトリフルオロメチルから選択される１～２個の置換基で置換されている。これらの実施形態では、この方法は、構造式（ＩＩ）のプロキラルケトン：

【０２８０】

【化１２】



(II)

【０２８１】

を、式（ＩＩ）の化合物を式（Ｉ）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される改善されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。

【０２８２】

この方法のいくつかの実施形態では、式（ＩＩ）のR^1はベンジルであり、ベンジルのフェニル基は、非置換であるか、フッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から選択される１～３個の置換基で置換されている。

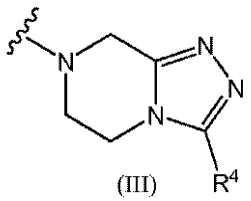
【０２８３】

この方法のいくつかの実施形態では、式（ＩＩ）のＺはNR^2R^3である。

この方法のいくつかの実施形態では、式（ＩＩ）のNR^2R^3は、構造式（ＩＩＩ）の複素環：

【０２８４】

【化１３】



(III)

【０２８５】

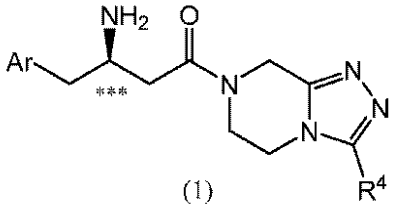
であり、式中、R^4は、水素、または非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換された$C_{1\sim4}$アルキルである。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼは、＊＊＊で印を付けられた立体中心で、（Ｒ）－配置を有する構造式（１）の化合物：

【０２８７】

【化１４】



(1)

【０２８８】

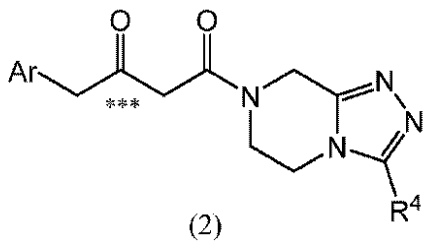
を、反対の（Ｓ）配置を有する鏡像異性体に対して少なくとも７０％の鏡像異性体過剰率で調製するための方法において使用することができ、式中；

Ａｒは、非置換であるか、またはフッ素、トリフルオロメチル、およびトリフルオロメトキシからなる群から独立して選択される１～５個の置換基で置換されているフェニルであり；

Ｒ^{4}は、水素、または非置換であるか、もしくは１～５個のフッ素で置換されたＣ$_{1～4}$アルキルである。そのような実施形態では、この方法は、構造式（２）のプロキラルケトン：

【０２８９】

【化１５】



(2)

【０２９０】

を、式（２）の化合物を式（１）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される改善されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。

【０２９１】

この方法のいくつかの実施形態では、式（２）のＡｒは、２，５－ジフルオロフェニルまたは２，４，５－トリフルオロフェニルであり、Ｒ^{4}はトリフルオロメチルである。

【０２９２】

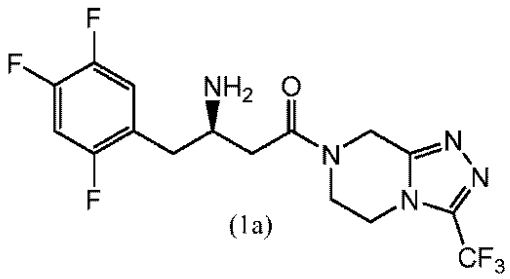
この方法のいくつかの実施形態では、式（２）のＡｒは、２，４，５－トリフルオロフェニルである。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、トランスアミナーゼは、式（１ａ）の化合物、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミン：

【０２９４】

【化１６】



(1a)

【０２９５】

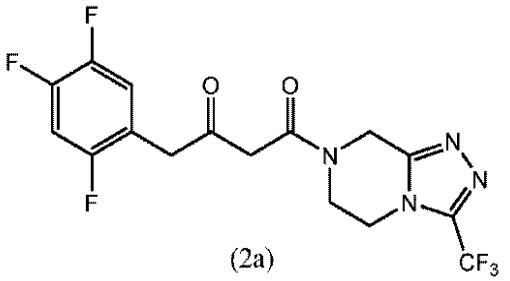
を鏡像体過剰で調製するための方法において使用することができる。

【０２９６】

これらの実施形態では、この方法は、構造式（２ａ）のプロキラルケトン、４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン）：

【０２９７】

【化１７】



(2a)

【０２９８】

を、式（２ａ）の化合物を式（１ａ）の化合物に変換するのに、適した反応条件下で、適した有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本明細書に開示される、改善されたトランスアミナーゼポリペプチドと接触させる工程を含む。

【０２９９】

上記方法のいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の化合物は、少なくとも７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上の鏡像異性体過剰率で製造される。

【０３００】

この方法のいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の化合物は少なくとも９９％の鏡像異性体過剰率で製造される。

【０３０１】

この方法のいくつかの実施形態では、改善されたトランスアミナーゼは、配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８から選択される。

【０３０２】

式（ＩＩ）の化合物、式（２）の化合物、および式（２ａ）の化合物は、これらの合成

とともに、とりわけ、米国特許第７，３２６，７０８号および同第７，４６８，４５９号に記載されており、これらの開示全体は、参照により本明細書に組み込まれている。

【０３０３】

上述したように、本明細書のトランスアミナーゼポリペプチドは、補酵素としてリン酸ピリドキサール（ＰＬＰ）を使用し、これは、例えば、ポリペプチドが発現される宿主細胞によってもたらされるように、調製されるとき酵素に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＰＬＰ、ＰＬＰ類似体、またはＰＬＰの前駆体は、トランスアミナーゼポリペプチドの発現の間に、宿主細胞の培地に添加することができる。この方法のいくつかの実施形態では、ＰＬＰまたはＰＬＰ類似体を反応物に添加することによって、酵素活性に必要とされる補酵素を提供することができる。酵素活性に十分なＰＬＰの量は、当業者によって求めることができる。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、この方法は、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを改善されたトランスアミナーゼと、このケトアミド基質を生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、配列番号４のものより５０～１００倍以上の変換速度および／または活性を伴って変換するのに適した反応条件下で、アミノ基ドナーの存在下で接触させ、またはインキュベートする工程を含む。例示的なポリペプチドは、配列番号１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、この方法は、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを改善されたトランスアミナーゼと、このケトアミド基質を生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、配列番号２２のものより１．１～５倍以上の変換速度および／または活性を伴って変換するのに適した反応条件下で、アミノ基ドナーの存在下で接触させ、またはインキュベートする工程を含む。例示的なポリペプチドは、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、この方法は、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを改善されたトランスアミナーゼと、このケトアミド基質を生成物の（２Ｒ）－４－オキ

ソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、配列番号４８のものより１．１～５倍以上の変換速度および／または活性を伴って変換するのに適した反応条件下で、アミノ基ドナーの存在下で接触させ、またはインキュベートする工程を含む。例示的なポリペプチドは、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

【０３０７】

いくつかの実施形態では、この方法は、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを改善されたトランスアミナーゼと、このケトアミド基質を生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに、配列番号５８のものより１．１～５倍以上の変換速度および／または活性を伴って変換するのに適した反応条件下で、アミノ基ドナーの存在下で接触させ、またはインキュベートする工程を含む。例示的なポリペプチドは、配列番号６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２、１５４、１５６、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６または１６８に対応するアミノ酸配列を含む。

【０３０８】

上記方法のいくつかの実施形態では、この方法を実施するための反応条件は、約７．０～約９．０のｐＨを含むことができる。いくつかの実施形態では、この方法のための反応条件は、約８．５のｐＨである。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、この方法を実施するための反応条件は、約２５℃～約５０℃の温度を含むことができる。いくつかの実施形態では、反応条件は、約４５℃の温度である。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、反応条件は、約８．５のｐＨおよび約４５℃の温度である。

【０３１１】

この方法のいくつかの実施形態では、有機溶媒は、極性溶媒、例えば、メタノールまたはＤＭＳＯなどを含む。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、有機溶媒はＤＭＳＯであり、これは、約１０％～約４０％の体積／体積（ｖ／ｖ）；約２５％～約４０％（ｖ／ｖ）；１０％～約５０％（ｖ／ｖ）、または約２５％～約５０％（ｖ／ｖ）のＤＭＳＯで存在することができる。いくつかの実施形態では、ＤＭＳＯは、約３０％ｖ／ｖ、３５％ｖ／ｖ、４０％ｖ／ｖ、４５％ｖ／ｖ、または約５０％ｖ／ｖで存在する。

【０３１３】

上記に論じたように、この方法において使用されるアミノ基ドナーは、キラルアミンであっても、アキラルアミンであってもよい。アキラルなアミノ基ドナーは、特定の立体異性体へのその反応において制限されず、したがって、より少ないアミノ基ドナーを必要とするという利点を有する。例として、かつ限定ではなく、イソプロピルアミン（２－アミ

ノプロパンとも呼ばれる）、Ｌアラニン、Ｄアラニン、またはＤＬアラニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、グルタミン、ロイシン（または任意の他の適切なα－アミノ酸）、３－アミノ酪酸（または任意の他の適切なβ－アミノ酸）、およびメチルベンジルアミンを含めて、様々な適切なアミノ基ドナーを使用することができる。いくつかの実施形態では、アミノ基ドナーはイソプロピルアミンである。いくつかの実施形態では、とりわけ、可能である場合、（Ｒ）および（Ｓ）単一異性体の両方を含め、アミンのすべての可能な塩を含めて、α－フェネチルアミン（１－フェニルエタンアミンとも呼ばれる）、ならびにその鏡像異性体（Ｓ）－１－フェニルエタンアミンおよび（Ｒ）－１－フェニルエタンアミン、２－アミノ－４－フェニルブタン、グリシン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－グルタメート、グルタミン酸一ナトリウム、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－リシン、Ｌ－オルニチン、β－アラニン、タウリン、ｎ－オクチルアミン、シクロヘキシルアミン、１，４－ブタンジアミン、１，６－ヘキサンジアミン、６－アミノヘキサン酸、４－アミノ酪酸、チラミン、ならびにベンジルアミン、２－アミノブタン、２－アミノ－１－ブタノール、１－アミノ－１－フェニルエタン、１－アミノ－１－（２－メトキシ－５－フルオロフェニル）エタン、１－アミノ－１－フェニルプロパン、１－アミノ－１－（４－ヒドロキシフェニル）プロパン、１－アミノ－１－（４－ブロモフェニル）プロパン、１－アミノ－１－（４－ニトロフェニル）プロパン、１－フェニル－２－アミノプロパン、１－（３－トリフルオロメチルフェニル）－２－アミノプロパン、２－アミノプロパノール、１－アミノ－１－フェニルブタン、１－フェニル－２－アミノブタン、１－（２，５－ジメトキシ－４－メチルフェニル）－２－アミノブタン、１－フェニル－３－アミノブタン、１－（４－ヒドロキシフェニル）－３－アミノブタン、１－アミノ－２－メチルシクロペンタン、１－アミノ－３－メチルシクロペンタン、１－アミノ－２－メチルシクロヘキサン、１－アミノ－１－（２－ナフチル）エタン、３－メチルシクロペンチルアミン、２－メチルシクロペンチルアミン、２－エチルシクロペンチルアミン、２－メチルシクロヘキシルアミン、３－メチルシクロヘキシルアミン、１－アミノテトラリン、２－アミノテトラリン、２－アミノ－５－メトキシテトラリン、ならびに１－アミノインダンを含めた、他のアミノ基ドナーを使用することができる。

【０３１４】

上記方法のいくつかの実施形態では、この方法の工程は、アミノ基がアミノ基アクセプターに移されるとき、アミノ基ドナーから形成されるカルボニル副生成物の除去をさらに含むことができる。そのようなインサイツでの除去は、逆反応の速度を低減することができ、その結果、順反応が支配し、そのとき、より多くの基質が産物に変換される。

【０３１５】

カルボニル副生成物の除去は、いくつかの方法で実施することができる。アミノ基ドナーが、アラニンなどのアミノ酸である場合、生成物のケト酸によるカルボニルは、過酸化物との反応により除去することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれているＵＳ２００８／０２１３８４５を参照）。使用することができる過酸化物として、とりわけ、過酸化水素；ペルオキシ酸（過酸）、例えば、過酢酸（CH_3CO_3H）、トリフルオロ過酢酸、およびメタクロロペルオキシ安息香酸など；ｔ－過酸化ブチル（$(CH_3)_3COOH$）などの有機過酸化物、または他の選択的酸化剤、例えば、過ルテニウム酸テトラプロピルアンモニウム、MnO_2、$KMnO_4$、四酸化ルテニウム、および関連化合物などが挙げられる。あるいは、ピルビン酸除去は、乳酸脱水素酵素を使用することによる乳酸へのその還元によって、生成物アミンへと平衡状態をシフトすることにより実現することができる（例えば、Ｋｏｓｚｅｌｅｗｓｋｉら、２００８年、Ａｄｖ．　Ｓｙｎ．　Ｃａｔａｌ．　３５０巻：２７６１～２７６６頁を参照）。ピルビン酸除去は、ピルビン酸脱炭酸酵素を使用することによる二酸化炭素、アセトアルデヒドへのその脱炭酸により実現することもできる（例えば、Ｈｏｈｎｅｓｓら、２００８年、Ｃｈｅｍ　ＢｉｏＣｈｅｍ　９巻：３６３～３６５頁を参照）。

【０３１６】

アミノ基ドナーの選択により、水より高い蒸気圧を有するカルボニル副生成物（例えば

、揮発性有機カルボニル化合物などの低沸点副産物）が生じる、いくつかの実施形態では、カルボニル副生成物は、反応溶液を非反応性ガスでスパージングすることによって、または真空を適用することにより反応圧力を低下させ、気相中に存在するカルボニル副生成物を除去することによって除去することができる。非反応性ガスは、反応成分と反応しない任意のガスである。様々な非反応性ガスには、窒素および希ガス（例えば、不活性ガス）が含まれる。いくつかの実施形態では、非反応性ガスは窒素ガスである。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、この方法において使用されるアミノ酸ドナーはイソプロピルアミンであり、これは、アミノ基がアミノ基アクセプターに移されると、カルボニル副生成物のアセトンを形成する。アセトンは、窒素ガスでスパージングし、または反応溶液に真空を適用し、アセトントラップ、例えば、冷却器もしくは他の冷トラップなどにより、気相からアセトンを除去することによって除去することができる。あるいは、アセトンは、ケトレダクターゼを使用して、イソプロパノールに還元することによって除去することができる。

【０３１８】

カルボニル副生成物が除去される、上記方法のいくつかの実施形態では、対応するアミノ基ドナーをアミノ基転移反応の間に添加することによって、アミノ基ドナーを補充し、かつ／または反応のｐＨを維持することができる。アミノ基ドナーの補充はまた、生成物形成に向けて平衡状態をシフトし、それによって基質の生成物への変換を増大させる。したがって、アミノ基ドナーがイソプロピルアミンであり、アセトン生成物がインサイツで除去される、いくつかの実施形態では、イソプロピルアミンを溶液に添加することによって、アセトン除去の間に失われるアミノ基ドナーを補充し、反応のｐＨを（例えば、約８．５に）維持することができる。あるいは、アミノ酸がアミノ基ドナーとして使用される実施形態では、ケト酸カルボニル副生成物を、適切なアミノ酸脱水素酵素を使用して、アンモニアおよびＮＡＤＨと反応させることによって、再利用してアミノ酸に戻し、それによってアミノ基ドナーを補充することができる。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、ケトアミド基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンを、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンに変換するための方法は、約１０～５０ｇ／Ｌのケトアミド基質を、約１～２０ｇ／Ｌの本明細書に記載されるトランスアミナーゼと、ｐＨ７．５～９．０および３０～５０℃の温度の反応条件下で、約１Ｍ～約２Ｍのイソプロピルアミンの存在下で接触させる工程を含み、ケトアミド基質の少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９４％、９６％、もしくは９８％、またはそれ以上が、２４時間で生成物に変換される。いくつかの実施形態では、前述の反応を実施することができるトランスアミナーゼポリペプチドは、配列番号８０、８６、９６、９８、１００、１０２、１１０、または１６６に対応するアミノ酸配列を含む。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、上記方法は、構造式（Ｉ）の化合物、構造式（１）の化合物、または構造式（１ａ）の化合物を反応溶媒から単離する工程をさらに含むことができる。

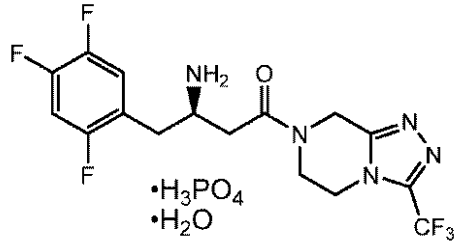
【０３２１】

いくつかの実施形態では、上記方法は、構造式（１）の化合物、または構造式（１ａ）の化合物を、適切な反応溶媒中で薬学的に許容される酸と、この化合物を接触させることによって、薬学的に許容される塩に変換する工程をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される酸はリン酸であり、薬学的に許容される塩はリン酸二水素塩である。いくつかの実施形態では、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフル

オロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンの塩は、以下の化学式を有するリン酸一水和物塩である：

【０３２２】

【化１８】

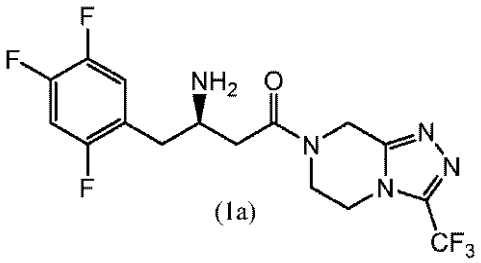


【０３２３】

いくつかの実施形態では、（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンホスフェート（１：１）一水和物を調製するための方法において、この方法における改善は、適切な反応条件下で、適切な有機溶媒中で、アミノ基ドナーの存在下で、本開示のトランスアミナーゼポリペプチドを用いて、式（１ａ）の化合物を式（２ａ）の化合物に変換する工程を含み、ここで、式（１ａ）の化合物は、

【０３２４】

【化１９】

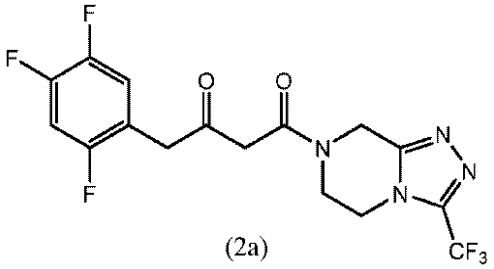


【０３２５】

であり、式（２ａ）の化合物は：

【０３２６】

【化２０】



【０３２７】

である。

【０３２８】

リン酸一水和物塩の調製のいくつかの実施形態では、アミノドナーは、イソプロピルアミンである。

【０３２９】

様々な塩を調製するための方法は、米国特許第７，３２６，７０８号および同第７，４

６８，４５９号に記載されており、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれている。シタグリプチンのリン酸一水和物を調製するための例示的な方法は、実施例１３に提示されている。

【０３３０】

いくつかの実施形態では、上記方法は、反応溶媒から薬学的に許容される塩を結晶化させる工程をさらに含むことができる。

【０３３１】

トランスアミナーゼおよび基質／生成物の組成物も本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、この組成物は、式（Ｉ）の化合物、式（１）の化合物、または式（１ａ）の化合物、および本開示の改善されたトランスアミナーゼを含むことができる。改善された、操作されたトランスアミナーゼの任意の１つまたは複数が、組成物の一部となり得る。

【０３３２】

いくつかの実施形態では、この組成物は、式（ＩＩ）の化合物、式（２）の化合物、または式（２ａ）の化合物、本明細書に記載される改善されたトランスアミナーゼを含むことができる。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、この組成物は、例えば、式（３）のアミノ基ドナーをさらに含むことができる。この組成物のいくつかの実施形態では、アミノ基ドナーは、イソプロピルアミン、アラニン、３－アミノ酪酸、またはメチルベンジルアミンを含むことができる。この組成物のいくつかの実施形態では、アミノ基ドナーはイソプロピルアミンである。

【実施例】

【０３３４】

本開示の様々な特徴および実施形態は、以下の代表的な実施例において例示され、これらは、例示的であり、限定的でないことが意図されている。

【０３３５】

（実施例１）

野生型トランスアミナーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築

トランスアミナーゼ（ＴＡ）をコードする遺伝子を、トランスアミナーゼの報告されたアミノ酸配列、および参照により本明細書に組み込まれている米国出願公開第２００８０２４８５３９号の実施例１に記載されたようなコドン最適化アルゴリズムに基づいて、Ｅ．ｃｏｌｉ．内で発現させるために設計した。遺伝子は、一般に４２ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドを使用して合成し、この遺伝子を、ｌａｃプロモーターの制御下で、発現ベクターｐＣＫ１１０７００（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願公開第２００５０１５３４１７号中で図１として表されている）、またはｐＣＫ１１０９００（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願公開第２００６０１９５９４７号中で図３として表されている）中にクローン化した。この発現ベクターは、Ｐ１５ａ複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含有する。得られたプラスミドは、標準的な方法を使用してＥ．ｃｏｌｉ．Ｗ３１１０中に形質転換した。コドンが最適化された遺伝子、およびコードされたポリペプチドを、表２に列挙し、これらの配列を、配列番号１および２として提供する。

【０３３６】

同様に、表２に列挙した本開示の操作されたトランスアミナーゼ（配列番号３～１６８）をコードする遺伝子を、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０内で発現させるために、ベクターのｐＣＫ１１０７００またはｐＣＫ１１０９００中にクローン化した。

【０３３７】

（実施例２）

トランスアミナーゼ粉末の生成－振盪フラスコ手順。

【０３３８】

対象とするトランスアミナーゼをコードするプラスミドを含有するＥ．ｃｏｌｉの１つの微生物コロニーを、３０μｇ／ｍＬのクロラムフェニコールおよび１％のグルコースを含有するＬｕｒｉａ　Ｂｅｒｔａｎｉブロス５０ｍＬ中に播種した。細胞は、２５０ｒｐｍで振盪しながら、３０℃で、インキュベーター内で一晩（少なくとも１６時間）増殖させた。培養液を、１リットルのフラスコ中で３０μｇ／ｍＬのクロラムフェニコールおよび１００μＭのピリドキシンを含有するＭ９ＹＥ（１．０ｇ／Ｌの塩化アンモニウム、０．５ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、６．０ｇ／Ｌのリン酸一水素二ナトリウム、３．０ｇ／Ｌのリン酸二水素カリウム、２．０ｇ／ＬのＴａｓｔｏｎｅ－１５４酵母エキス、１Ｌ／Ｌの脱イオン水）２５０ｍＬ中に希釈して、０．２の６００ｎｍでの光学密度（ＯＤ６００）にし、３０℃で増殖させた。培養液のＯＤ６００が０．６～０．８であるとき、１ｍＭの最終濃度までイソプロピルβＤ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）を添加することによって、トランスアミナーゼ遺伝子の発現を誘発し、次いでインキュベーションを一晩（少なくとも１６時間）継続した。遠心分離（５０００ｒｐｍ、１５分、４℃）によって細胞を回収し、上澄みを廃棄した。１００または５００μＭのピリドキサール５’－リン酸（ＰＬＰ）を含有するｐＨ７．５の、等体積の冷たい（４℃）、１００ｍＭのトリエタノールアミン（クロリド）バッファーを用いて細胞ペレットを再懸濁し、上記のように遠心分離によって回収した。ＰＬＰを含有する２体積の冷トリエタノールアミン（クロリド）バッファー中に、洗浄した細胞を再懸濁し、４℃で維持しながら、１２，０００ｐｓｉでＦｒｅｎｃｈ　Ｐｒｅｓｓに２回通過させた。細胞残骸を、遠心分離（９０００ｒｐｍ、４５分、４℃）によって除去した。澄んだ溶解産物上澄みを収集し、－２０℃で貯蔵した。凍結した澄んだ溶解産物の凍結乾燥により、粗トランスアミナーゼ酵素の乾燥粉末を得る。あるいは、細胞ペレット（洗浄の前または後）は、４℃または８０℃で貯蔵することができる。

【０３３９】

（実施例３）

トランスアミナーゼの生成－発酵手順。

【０３４０】

対象とするトランスアミナーゼ遺伝子を含むプラスミドを含有するＥ．ｃｏｌｉ．の１つの微生物コロニーを、３０μｇ／ｍＬのクロラムフェニコールおよび１％のグルコースを含有するＭ９ＹＥブロス（１．０ｇ／Ｌの塩化アンモニウム、０．５ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、６．０ｇ／Ｌのリン酸一水素二ナトリウム、３．０ｇ／Ｌのリン酸二水素カリウム、２．０ｇ／ＬのＴａｓｔｏｎｅ－１５４酵母エキス、１Ｌ／Ｌの脱イオン水）２ｍＬ中に播種した。細胞は、２５０ｒｐｍで振盪しながら、３７℃で、インキュベーター内で一晩（少なくとも１２時間）増殖させた。一晩成長させた後、この培養液０．５ｍＬを、１リットルのフラスコ内で、３０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールおよび１％のグルコースを含有するＭ９ＹＥブロス２５０ｍｌ中に希釈し、２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で増殖させた。培養液のＯＤ６００が０．５～１．０であるとき、インキュベーターから細胞を取り出し、直ちに使用するか、または４℃で貯蔵した。

【０３４１】

ベンチスケールの発酵は、増殖培地（０．８８ｇ／Ｌの硫酸アンモニウム、０．９８ｇ／Ｌのクエン酸ナトリウム；１２．５ｇ／Ｌのリン酸水素二カリウム三水和物、６．２５ｇ／Ｌのリン酸二水素カリウム、３．３ｇ／ＬのＴａｓｔｏｎｅ－１５４酵母エキス、０．０８３ｇ／Ｌのクエン酸第二鉄アンモニウム、ならびに２ｇ／Ｌの塩化カルシウム二水和物、２．２ｇ／Ｌの硫酸亜鉛七水和物、０．５ｇ／Ｌの硫酸マンガン一水和物、１ｇ／Ｌの硫酸第一銅七水和物、０．１ｇ／Ｌのモリブデン酸アンモニウム四水和物、および０．０２ｇ／Ｌの四ホウ酸ナトリウムを含有する８．３ｍｌ／Ｌの微量成分溶液）６．０Ｌを使用して、通気、アジテートした１５Ｌの発酵槽内で、３０℃で実施した。容器を１２１℃および１５ＰＳＩで３０分間滅菌し、滅菌後に１００μＭのピリドキシンを添加した。発酵槽に、対象とするトランスアミナーゼ遺伝子をコードするプラスミドを含有するＥ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０の指数増殖期後期の培養液（ｌａｔｅ　ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ

ｃｕｌｔｕｒｅ）（上述したように振盪フラスコ内で増殖させた）を播種し、０．５～１．０の開始OD_{600}にした。２５０～１２５０ｒｐｍで発酵槽をアジテートし、０．６～２５Ｌ／分で発酵容器に空気を供給することによって、５０％の飽和またはそれ以上の溶解酵素レベルを維持した。培養液のｐＨは、２０％ｖ／ｖの水酸化アンモニウムを添加することによって、７．０に維持した。培養液の増殖は、５００ｇ／ＬのＣｅｒｅｌｏｓｅデキストロース、１２ｇ／Ｌの塩化アンモニウム、および５．１ｇ／Ｌの硫酸マグネシウム七水和物を含有するフィード溶液を添加することによって維持した。培養液が７０＋－１０のOD_{600}に到達した後、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）を１ｍＭの最終濃度まで添加することによって、トランスアミナーゼの発現を誘発し、発酵をさらに１８時間継続した。次いで培養液を４℃に冷却し、回収するまでその温度で維持した。４℃で、Ｓｏｒｖａｌ　ＲＣ　１２ＢＰ遠心分離機で、５０００ｇで４０分間遠心分離することによって細胞を収集した。回収した細胞は、以下の下流回収プロセスにおいて直接使用するか、またはそのように使用するまでこれらを４℃で貯蔵するか、もしくは－８０℃で凍結することができる。

【０３４２】

細胞ペレットを、４℃で、１００または５００μＭのピリドキサール５’－リン酸（ＰＬＰ）を含有するｐＨ７．５の、２体積の１００ｍＭのトリエタノールアミン（クロリド）バッファー中に再懸濁して、各体積の湿潤細胞ペーストにした。細胞内トランスアミナーゼは、１２０００ｐｓｉｇの圧力を使用して、２ステージホモジナイジングバルブアセンブリーを装備したホモジナイザーに懸濁液を通過させることによって、細胞から放出された。細胞ホモジネートは、破壊後直ちに－２０℃に冷却した。ｐＨ７．２の１１％ｗ／ｖのポリエチレンイミンの溶液を溶解産物に添加して、０．５％ｗ／ｖの最終濃度にした。１ＭのNa_2SO_4を溶解産物に添加して１００ｍＭの最終濃度にした。次いで溶解産物を３０分間撹拌した。得られた懸濁液を、Ｓｏｒｖａｌ　ＲＣ　１２ＢＰ遠心分離機で、４℃で３０分間、５０００Ｇで遠心分離することによって澄ませた。３０ｋＤの分子量カットオフを有するセルロース限外濾過膜を使用して、澄んだ上澄みをデカントし、１０倍に濃縮した。最終的な濃縮物を浅い容器に分配し、－２０℃で凍結させ、凍結乾燥して粉末にした。トランスアミナーゼ粉末は、－８０℃で貯蔵した。

【０３４３】

（実施例４）

ケトアミド基質をシタグリプチンに立体選択的に変換することができるＡｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼの変異体を識別するためのハイスループットスクリーニング。

ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換を判定するためのアキラルなＨＰＬＣ法：ケトアミド基質（米国特許第７，３２６，７０８号に記載されたように調製した）のシタグリプチンへの酵素的変換は、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＸＤＢ－Ｃ８カラム（４．６×１５０ｍｍ、５μｍ）を備えたＡｇｉｌｅｎｔ　１２００　ＨＰＬＣを使用して、１．５ｍｌ／分の流量で、溶離液として４５：５５の１０ｍＭの$NH_4AcMeCN$、およびカラム温度４０℃を使用して判定した。保持時間：ケトアミド基質：１．７分；シタグリプチン：１．４分。溶離液中のケトアミド基質および生成物は、１ｃｍの経路長を用いて、２１０ｎｍまたは２８６ｎｍでのピーク面積として求めた。これらの条件を使用して、シタグリプチンについての検出限界は、５μｇ／ｍＬであった。一般に、２１０ｎｍの入射波長を、配列番号４と同様または等しい活性を有するトランスアミナーゼについての活性を測定するために使用した。

シタグリプチンの立体純度（ｓｔｅｒｅｏｐｕｒｉｔｙ）を求めるためのキラルなＨＰＬＣ法：シタグリプチンの立体異性体純度は、Ｄａｉｃｅｌ　Ｃｈｉｒａｌｐａｋ　ＡＤ－Ｈ　カラム（４．６×１５０ｍｍ、５μｍ）を備えたＡｇｉｌｅｎｔ　１２００　ＨＰＬＣを使用して、０．８ｍｌ／分の流量で、溶離液として６０：４０：０．１：０．１のＥｔＯＨ／ヘプタン／ジエチルアミン／水、および３５℃のカラム温度を使用して求めた。保持時間：ケトアミド基質：６．３分；（Ｓ）－鏡像異性体：８．４分；シタグリプチン

：１０．８分。ケトアミド基質および生成物は、１ｃｍの経路長を用いて、２１０ｎｍまたは２６８ｎｍでのピーク面積として求めた。ケトアミド基質のシタグリプチンへの低レベル変換を検出するための液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ／ＭＳ）法：ケトアミド基質のシタグリプチンへの低レベル酵素的変換は、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ法を使用して判定した。５マイクロリットルの試料を、Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＸＤＢ－Ｃ８　ＨＰＬＣカラム（４．６×１５０ｍｍ）中に装填し、０．２％のギ酸アンモニウムおよびメタノールの４０：６０移動相を用いて、１．０ｍＬ／分でアイソクラチックに溶出した。シタグリプチンの保持時間は、３５℃で１．５分であった。質量分析法を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｑｕａｔｒｏトリプル四重極で検出するのに使用した。Ｑ１は、４０８．１ＡＭＵでＭ＋Ｈイオンを通過させるように設定し、Ｑ３は、２３５．１娘イオンを通過させるように設定した。衝突セル（Ｑ２）は、１７．０の衝突エネルギー、および０．３ｍＬ／分のアルゴンガス流量を有していた。イオン化は、５μＡのコロナ放電、１３０℃のソース温度、および６００℃のプローブ温度を有するＡＰＣＩによるものであった。脱溶媒和ガス流量は１００Ｌ／分であり、コーンガスは、５０Ｌ／分に設定した。これらの条件を使用して、シタグリプチンの検出限界は、７１ｐｇ／ｍＬであった。

【０３４４】

（実施例５）

ケトアミド基質をシタグリプチンに立体選択的に変換することができるＡｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼの変異体を識別するためのハイスループットスクリーニング。

【０３４５】

実施例１に記載したように構築した、トランスアミナーゼをコードする遺伝子に、上述した方法を使用して突然変異を誘発し、変更されたＤＮＡ分子の集団を、適切なＥ．ｃｏｌｉ宿主系統を形質転換するのに使用した。抗生物質耐性の形質転換体を選択および処理することによって、適切なアミノ基ドナー（すなわち、イソプロピルアミン）の存在下で、ケトアミド基質を立体選択的にシタグリプチンにアミノ基転移する改善された能力を有するトランスアミナーゼを発現するものを同定した。細胞選択、増殖、トランスアミナーゼ変異型酵素の発現の誘発、細胞ペレットの収集は、以下に記載した通りであった。

【０３４６】

トランスアミナーゼをコードする遺伝子を担持する組換えＥ．ｃｏｌｉコロニーを、Ｑ－Ｂｏｔ（登録商標）ロボットコロニーピッカー（Ｇｅｎｅｔｉｘ　ＵＳＡ，Ｉｎｃ．、Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ）を使用して選択して、各ウェル中にＬＢブロス１８０μＬ、１％のグルコース、および３０μｇ／ｍＬのクロラムフェニコール（ＣＡＭ）を含有する９６ウェルのシャローウェルマイクロタイタープレートに入れた。２００ｒｐｍで振盪しながら３０℃で一晩細胞を増殖させた。次いで、この培養液のアリコート１０μＬを、Ｍ９ＹＥブロス３９０μＬ、１００μＭのピリドキシン、および３０μｇ／ｍＬのＣＡＭを含有する９６ディープウェルプレートに移した。２５０ｒｐｍで振盪しながら、３０℃で２～３時間、ディープウェルプレートをインキュベートした後、１ｍＭの最終濃度までＩＰＴＧを添加することによって、培養細胞内の組換え遺伝子発現を誘発した。次いでこのプレートを、２５０ｒｐｍで振盪しながら、３０℃で１８時間インキュベートした。

【０３４７】

細胞を、遠心分離（４０００ＲＰＭ、１０分、４℃）によってペレット化し、溶解バッファー２００μＬ中に再懸濁し、室温で２時間振盪することによって溶解させた。溶解バッファーは、ｐＨ７．５または８．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン（クロリド）バッファー、１ｍｇ／ｍＬのリゾチーム、５００μｇ／ｍＬのポリミキシンＢ硫酸塩（ＰＭＢＳ）、および１００～４０００μＭのＰＬＰを含んでいた。アルミニウム／ポリプロピレンラミネートヒートシールテープ（Ｖｅｌｏｃｉｔｙ　１１、Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ、カタログ番号０６６４３－００１）でプレートを密閉した後、これらを、室温で２時間活発に振盪した。細胞残骸を遠心分離（４０００ＲＰＭ、１０分、４℃）によってペレット化し、澄んだ上澄みを直接アッセイするか、または使用するまで４℃で貯蔵した

。

【０３４８】

初期段階の操作されたトランスアミナーゼ（すなわち、初期段階の「エボルバント（ｅｖｏｌｖａｎｔ）」）をｐＨ７．５のメタノールまたはＤＭＳＯ中でスクリーニングするために、Ｂｉｏｍｅｋ　ＮＸｐロボット機器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、ＣＡ）を使用して、メタノールまたはＤＭＳＯ中のケトアミド基質（４０ｍｇ／ｍＬ）の溶液のアリコート１０μＬを、Ｃｏｓｔａｒ（登録商標）ディープウェルプレートの各ウェルに添加し、その後、１．１Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩９０μＬを添加した。次いでこの後に、やはりＢｉｏｍｅｋ　ＮＸｐを使用して実施して、回収した溶解産物の上澄み１００μＬを添加することによって、２ｍｇ／ｍｌのケトアミド基質、５００ｍＭのイソプロピルアミン塩酸塩、ｐＨ７．５の５０ｍＭのトリエタノールアミン、および５％のメタノールまたはＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）を含む反応物を得た。プレートを、アルミニウム／ポリプロピレンラミネートヒートシールテープ（Ｖｅｌｏｃｉｔｙ　１１、Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ、カタログ番号０６６４３－００１）を用いて、１７５℃で２．５秒間ヒートシールし、次いで３０℃で一晩（少なくとも１６時間）振盪した。反応は、Ｐｈｏｅｎｉｘ　Ｌｉｑｕｉｄ　Ｈａｎｄｌｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｒｔ　Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）を使用してアセトニトリル１ｍｌを添加することによってクエンチした。プレートを再び密閉し、５分間振盪し、次いで４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。澄んだ反応混合物のアリコート２００μＬを、新しいシャローウェルポリプロピレンプレート（Ｃｏｓｔａｒ　＃３３６５）に移し、密閉し、実施例４に記載したように分析した。

【０３４９】

後期段階の操作されたトランスアミナーゼ（すなわち、後期段階の「エボルバント」）をｐＨ８．５の２５％のＤＭＳＯ中でスクリーニングするために、Ｂｉｏｍｅｋ　ＮＸロボット機器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、ＣＡ）を使用して、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中のケトアミド基質（４０ｍｇ／ｍＬ）の溶液のアリコート５０μＬを、Ｃｏｓｔａｒ（登録商標）ディープウェルプレートの各ウェルに添加し、その後、４Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩５０μＬを添加した。次いでこの後に、やはりＢｉｏｍｅｋ　ＮＸを使用して実施して、回収した溶解産物の上澄み１００μＬを添加することによって、１００ｍｇ／ｍｌのケトアミド基質、１Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩、ｐＨ８．５の５０ｍＭのトリエタノールアミン、および２５％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）を含む反応物を得た。プレートを、アルミニウム／ポリプロピレンラミネートヒートシールテープ（Ｖｅｌｏｃｉｔｙ　１１、Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ、カタログ番号０６６４３－００１）を用いて、１７５℃で２．５秒間ヒートシールし、次いで４５℃で一晩（少なくとも１６時間）振盪した。反応は、Ｐｈｏｅｎｉｘ　Ｌｉｑｕｉｄ　Ｈａｎｄｌｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｒｔ　Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）を使用してアセトニトリル１ｍｌを添加することによってクエンチした。プレートを再び密閉し、５分間振盪し、次いで４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。澄んだ反応混合物のアリコート１０μＬを、アセトニトリル１９０μＬを含有する新しいシャローウェルポリプロピレンプレート（Ｃｏｓｔａｒ　＃３３６５）に移し、密閉し、実施例４に記載したように分析した。

【０３５０】

後期段階の操作されたトランスアミナーゼ（すなわち、後期段階の「エボルバント」）をｐＨ８．５の５０％のＤＭＳＯ中でスクリーニングするために、Ｂｉｏｍｅｋ　ＮＸロボット機器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、ＣＡ）を使用して、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中のケトアミド基質（１００ｍｇ／ｍＬ）の溶液のアリコート１００μＬを、Ｃｏｓｔａｒ（登録商標）ディープウェルプレートの各ウェルに添加し、その後、４Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩５０μＬを添加した。次いでこの後に、やはりＢｉｏｍｅｋ　ＮＸを使用して実施して、回収した溶解産物の上澄み５０μＬを添加することによって、５０ｍｇ／ｍｌのケトアミド基質、１Ｍのイソプロピルアミン

塩酸塩、ｐＨ８．５の５０ｍＭのトリエタノールアミン、および５０％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）を含む反応物を得た。プレートを、アルミニウム／ポリプロピレンラミネートヒートシールテープ（Ｖｅｌｏｃｉｔｙ　１１、Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ、カタログ番号０６６４３－００１）を用いて、１７５℃で２．５秒間ヒートシールし、次いで４５℃で一晩（少なくとも１６時間）振盪した。反応は、Ｐｈｏｅｎｉｘ　Ｌｉｑｕｉｄ　Ｈａｎｄｌｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｒｔ　Ｒｏｂｂｉｎｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）を使用してアセトニトリル１ｍｌを添加することによってクエンチした。プレートを再び密閉し、５分間振盪し、次いで４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。澄んだ反応混合物のアリコート１０μＬを、アセトニトリル１９０μＬを含有する新しいシャローウェルポリプロピレンプレート（Ｃｏｓｔａｒ　＃３３６５）に移し、密閉し、実施例４に記載したように分析した。

【０３５１】

実施例１および２におけるように発現された配列番号２のトランスアミナーゼは、実施例４の検出方法を使用して、ケトアミド基質に対して検出可能な活性をまったく示さなかった。ケトアミド基質をシタグリプチンに変換することができるＡｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼの変異体は、上記に開示した手法および手順を使用して同定した。１つのラウンドからの１つまたは複数の改善された単離体を、突然変異生成およびスクリーニングの後続のラウンドのための出発材料として使用した、これらのプロセスの複数の反復を、ケトアミド基質を立体選択的にシタグリプチンに還元する改善された能力を有するＡｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼ変異体を発生または「進化」させるのに使用した。

【０３５２】

（実施例６）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼに由来する、表２において「＋」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のメタノール中の立体選択的アミノ基転移。

【０３５３】

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８トランスアミナーゼに由来する、表２において「＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにＤＭＳＯ中で、分取スケールで評価した。２５０μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ７．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（２０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５００μＬを、磁気撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、１．１Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩４５０μＬ、その後にＤＭＳＯ中のケトアミド基質（４０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５０μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を２２℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号４のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３５４】

多くの操作されたトランスアミナーゼについて、ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換は、適切な濃度のアミノ基ドナー、例えば、Ｄ－アラニン、３－アミノ酪酸、またはα－メチルベンジルアミンなどを使用して実現することもできる。

【０３５５】

（実施例７）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する、表２において「＋＋」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のメタノール中の立体選択的アミノ基転移。

【０３５６】

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８変異体に由来する、表２において「＋

＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにメタノール中で、分取スケールで評価した。２５０μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ７．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（２０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５００μＬを、撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、１．１Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩４５０μＬ、その後にメタノール中のケトアミド基質（４０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５０μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を２２℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号４のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３５７】

（実施例８）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する、表２において「＋＋＋」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のメタノール中の立体選択的アミノ基転移。

【０３５８】

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８変異体に由来する、表２において「＋＋＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにメタノール中で、分取スケールで評価した。２５０μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ７．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（２０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５００μＬを、撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、２．２Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩４５０μＬ、その後にメタノール中のケトアミド基質（１００または２００ｍｇ／ｍＬ）の溶液５０μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を３０℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋＋＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号２２のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３５９】

（実施例９）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する、表２において「＋＋＋＋」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のメタノール中の立体選択的アミノ基転移。

【０３６０】

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８変異体に由来する、表２において「＋＋＋＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにメタノール中で、分取スケールで評価した。２５０μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ８．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（２０ｍｇ／ｍＬ）の溶液５００μＬを、撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、２．５Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩４００μＬ、その後にメタノール中のケトアミド基質（２００ｍｇ／ｍＬ）の溶液１００μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を４５℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋＋＋＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号４８のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３６１】

（実施例１０）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する、表２において「＋＋＋＋＋

」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のＤＭＳＯ中の立体選択的アミノ基転移

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８変異体に由来する、表２において「＋＋＋＋＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにＤＭＳＯ中で、分取スケールで評価した。２５０μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ８．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（２０ｍｇ／ｍＬ）の溶液２５０μＬを、撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、２Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩５００μＬ、その後にＤＭＳＯ中のケトアミド基質（２００ｍｇ／ｍＬ）の溶液２５０μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を４５℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋＋＋＋＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号５８のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３６２】

（実施例１１）

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８に由来する、表２において「＋＋＋＋＋」で示された操作されたトランスアミナーゼによる、ケトアミド基質のＤＭＳＯ中の立体選択的アミノ基転移

Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＫＮＫ１６８変異体に由来する、表２において「＋＋＋＋＋」で示された改善されたトランスアミナーゼを、以下のようにＤＭＳＯ中で、分取スケールで評価した。４０００μＭのピリドキサール５’－リン酸を含むｐＨ８．５の１００ｍＭのトリエタノールアミン－クロリドバッファー中のトランスアミナーゼ変異体（８ｍｇ／ｍＬ）の溶液２５０μＬを、撹拌子を備えた５ｍＬの反応バイアルに添加した。引き続いて、４Ｍのイソプロピルアミン塩酸塩２５０μＬ、その後にＤＭＳＯ中のケトアミド基質（１００ｍｇ／ｍＬ）の溶液５００μＬを、トランスアミナーゼ溶液に添加した。反応物を４５℃で撹拌し、反応混合物から定期的に採取した試料のＨＰＬＣ分析によってモニターした（分析条件については実施例４を参照）。表２は、「＋＋＋＋＋」で示されたトランスアミナーゼ変異体に対応する配列番号、野生型トランスアミナーゼからのアミノ酸残基差異の数、および配列番号１０４のアミノ酸配列を有する酵素の活性と比べた、ケトアミド基質に向けたそれぞれの活性を提供する。

【０３６３】

（実施例１２）

ケトアミド基質をシタグリプチンに変換するための方法Ｉ

以下の実施例は、基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンの、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンへの変換を増大させるために使用される大規模方法を例示する。この方法は、窒素スパージングを使用することによって、アセトン副産物を除去し、基質の生成物への変換を増大させる。水中のイソプロピルアミンの添加は、体積を一定に保ち、反応物のｐＨを維持するのに役立つ。

【０３６４】

大規模方法は、以下の反応成分を含有する。

【０３６５】

【表３】

基質のケトアミド	20 g (98%) (48.2ナノモル)
イソプロピルアミン -HCl:	18.44 g (193ナノモル)
リン酸ピリドキサール　PLP:	200 mg (98%) (0.79 ナノモル)
トランスアミナーゼ(配列番号86)	2.2 g
0.1MトリエタノールアミンpH 8.5:	140 mL
DMSO:	20 mL + 40 mL
4MのiPrアミン(遊離塩基)	38.5 mL

【０３６６】

方法。撹拌機、ｐＨプローブ、温度プローブ、窒素スパージ用針、真空針を装備した、４つのバッフルを有する５００ｍＬの三口丸底（ＲＢ）フラスコに、イソプロピルアミン塩酸塩（４当量）１８．２５ｇ、その後にピリドキサール５’－リン酸水和物（ビタミンＢ６）２００ｍｇを添加した。これを、ｐＨ８．５、０．１Ｍのトリエタノールアミン緩衝用水１４０ｍＬ中に溶解させた。ＤＭＳＯ（２０ｍｌ）を添加し、その後にトランスアミナーゼ酵素（配列番号８６）粉末２ｇを添加した。この溶液を４５℃にし、ｐＨを、４Ｍの水性イソプロピルアミンを用いて８．５に再び調整した。これが安定化した（約５分）後、ＤＭＳＯ　４０ｍＬ中に溶解した基質２０ｇの溶液を、３時間にわたって添加した。添加の間、かつ反応全体を通じて、ｐＨは、着実に低下した。０．１単位を超えてｐＨが低下した場合、４Ｍの水性イソプロピルアミンを連続的に添加することによってｐＨを制御した。さらに、２時間後、１２時間まで反応物に窒素をスパージした。２１時間後に、変換は９３％であった。合計３８．５ｍＬの４Ｍのイソプロピルアミン（３．０５６当量）を、この方法の間に反応物に添加した。ｐＨ制御ユニットは、熱電対、ｐＨプローブ、およびｐＨを制御するための水中４Ｍのイソプロピルアミンを有していた。

【０３６７】

生成物混合物中に存在する基質－生成物エネアミン付加体不純物（以下に記載する分別条件下で４．１分の保持時間）は、６ＮのＨＣｌ　１０．５ｍＬを用いてｐＨ２．０に混合物を酸性化し、その後４５℃で１時間撹拌することによって破壊した。引き続いてセライト６ｇを添加し、さらなる時間撹拌し、次いで、水／ＤＭＳＯ（１滴の６ＮのＨＣｌを含む９０／１０）でアジテートされた洗浄（４×３０ｍＬ）をしながら、セライトパッド（８５ｍｍ　ＩＤのフリット、湿潤セライトの１０ｍｍ厚のパッド）を通して濾過した。アッセイは、９１％のシタグリプチンおよび７％の基質ケトアミドの収率を示す。

【０３６８】

酢酸イソプロピル（ＩＰａｃ）２００ｍＬを添加し、その後、ｐＨが約１１になるまで撹拌しながら５ＮのＮａＯＨ　３２ｍＬを添加することによって、生成物をさらに処理した。層を分離し（有機層中のエマルジョンとともに、３５分の静置）、別の酢酸イソプロピル２００ｍＬを用いて水層を抽出した。最終的な抽出は、追加の酢酸イソプロピル１００ｍＬを用いて実施した。３つすべての酢酸イソプロピル層を合わせ、３０分間静置させ、残留水を排出した。次いで、有機層中の生成物を、ブライン１５０ｍＬで洗浄し（１時間未満で静置する）、分離し、Na_2SO_4で乾燥させ、次いで濾過した。溶媒をイソプロパノール（イソプロパノール（ＩＰＡ）溶液６６．２９ｇ）に替えた。最終生成物のアッセイは、以下のことを示す。

【０３６９】

２６．８重量％のシタグリプチン（１７．７３ｇ）。

【０３７０】

１．８９重量％のケトアミド基質（１．２５ｇ）。

【０３７１】

約６０．３ｍＬのＩＰＡ。

【０３７２】

生成物混合物を分別するためのＨＰＬＣ条件は以下の通りであった。

【０３７３】
カラム：Ｚｏｒｂａｘ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　Ｐｌｕｓ　Ｃ１８、４．６×５０ｍｍ、１．８ｕｍ
勾配：分　$Ｈ_{2}Ｏ$（０．１％の$Ｈ_{3}ＰＯ_{4}$）／$ＣＨ_{3}ＣＮ$
０　９０／１０
５　５／９５
６　５／９５
６．０１　９０／１０
８　停止
流量：１．５ｍＬ／分
カラム温度：２５℃
試料体積：５μＬ
検出器：２１０ｎｍのＵＶ
ＨＰＬＣ分析のための試料は、１／１の$Ｈ_{2}Ｏ$（０．１％の$Ｈ_{3}ＰＯ_{4}$）／$ＣＨ_{3}ＣＮ$中、０．２ｍｇ／ｍＬで調製した。上記クロマトグラフィー条件下の保持時間は、以下の通りであった。

【０３７４】
シタグリプチン：２．２分
ケトアミド基質：３．２分
ケトアミド基質（エノール）：３．９分
基質－生成物エネアミン：４．１分。

【０３７５】
窒素ガスのパージングにより、アミノ基転移反応の生成物であるアセトンが除去され、トランスアミナーゼ触媒反応の平衡状態を、生成物形成、およびしたがって、基質の生成物へのより高い変換率にシフトする。さらに、イソプロピルアミンの連続的な添加は、反応条件のｐＨを維持するだけでなく、アミノ基転移反応において失われるアミノ基ドナーも補充する。配列番号８６を有するトランスアミナーゼポリペプチドを、この方法において使用したが、この例示的な方法は、本明細書に開示される後続の操作されたトランスアミナーゼのいずれも使用することができることが理解されるべきである。

【０３７６】
（実施例１３）
ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換を増大させるための方法ＩＩ
以下の実施例は、基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンの、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンへの変換を増大させるために使用される第２の大規模方法を例示する。この方法は、アセトン生成物を除去し、基質の生成物への変換を増大させるために真空を使用する。先の実施例と同様に、水中のイソプロピルアミンの添加は、体積を一定に保ち、反応のｐＨを維持するのに役立つ。

【０３７７】
物質。

【０３７８】

【表４】

反応成分	量	モル当量
ケトアミド基質:	1000 g (96%) (2.36 モル)	1.0
イソプロピルアミン -HCL:	903 g (9.45 モル)	4.0
ピリドキサールリン酸 PLP:	10 g (98%) (0.04 モル)	0.017
トランスアミナーゼ(配列番号102)	50.0 g	
トリエタノールアミン:	104 g	
DMSO:	1.5 L + 2L	
4Mの水性イソプロピルアミン（遊離塩基):	157 mL	

【０３７９】

この方法のための装置は、以下の特徴を有する：熱電対、ｐＨプローブ、およびｐＨを制御するための水中の４Ｍのイソプロピルアミンのリザーバを有するｐＨ制御ユニット。反応器は、真空ラインおよび対応する制御装置（３７５トルに設定）、ならびにアセトンおよび生成物形成を測定するためのＲｅａｃｔＩＲプローブ（Ｍｅｔｔｅｒ Ｔｏｌｅｄｏ、Ｍａｒｙｌａｎｄ、ＵＳＡ）に接続する。

方法。２２Ｌの機械で撹拌される丸底（ＲＢ）フラスコは、ＲｅａｃｔＩＲプローブ、４Ｍの水性イソプロピルアミンのリザーバに接続された塩基供給ライン、ケトアミド基質のリザーバに接続されたケトアミド供給ライン、ｐＨプローブ、ならびに制御ボックスおよびトラップへの真空ラインが装備されていた。このフラスコにイソプロピルアミン塩酸塩９００ｇを装填し、その後、脱イオン水６．４Ｌ、およびトリエタノールアミン９３ｍＬ（２ｍ／ｓの先端速度）、およびピリドキサール５’－リン酸（ｐＨ８．４）１０ｇを添加した。この後に、配列番号１０２を有する、溶解したトランスアミナーゼポリペプチド５０ｇをフラスコに装填した。ＲＴで１０分撹拌した後、ＤＭＳＯ １．５Ｌを３０分にわたって添加し、反応器を４０℃に加温した。温度が安定した後、ｐＨプローブを温度プローブと交換し、ｐＨ制御装置および４Ｍのイソプロピルアミン溶液を用いて、ｐＨをｐＨ８．５に維持した。ケトアミド基質（１Ｋｇ）をＤＭＳＯ ２Ｌ中に溶解させ、５Ｌの添加漏斗に入れた。真空（最初に約５００トル、次いで添加後に一晩３７５トル）を反応器にかけ、ケトアミド溶液を反応器に４時間（６６７ｍＬ／時間）にわたって添加した。合計１．４５当量のイソプロピルアミンを２５時間後に添加した。基質の生成物への変換は、約９４％であった。

【０３８０】

反応を１日間進行させた後、５ＮのＨＣｌ ５８０ｍＬを、ｐＨ２まで反応溶液に添加し、溶液を４５℃で２時間撹拌した。２層の綿タオルを使用して、広い直径のブーフナー漏斗に溶液を通して濾過し、濾液１２．３ｋｇを得た。濾液残渣を、０．０１ＮのＨＣｌ中５％のＤＭＳＯ中でアジテートし、次いで追加の０．０１ＮのＨＣｌ中５％のＤＭＳＯ ３×２Ｌですすいだ（合計６．６ｋｇ）。残渣を酸性水溶液中に入れ、洗浄して（合計約１８Ｌ）抽出器中に入れ、次いで酢酸イソプロピル９Ｌ中に入れた。５ＮのＮａＯＨ（１．４Ｌ）を用いてｐＨを１０に調整し、５０ＬのＣｈｅｍＧｌａｓｓ容器＃１内で、１６５ＲＰＭで溶液をアジテートし、層を約１０分間静置させ、酢酸イソプロピルを分離して除いた。溶液を酢酸イソプロピル９Ｌで再び抽出し、抽出した酢酸イソプロピル層を合わせ、２０時間静置させた。この酢酸イソプロピル層を、ブライン６Ｌ（５．９ｋｇ）で洗浄した。ＩＰＡｃ溶液をアッセイし、これは、シタグリプチン８６１ｇを含有していた。ロータリー真空蒸発器上で、溶媒をＩＰＡｃ（ＩＰＡｃ １９Ｌ中８６１ｇ、９０％のアッセイ収率）からＩＰＡに、３０℃で１時間にわたって供給し、５０％の体積に濃縮することによって替えた。この時点で、シタグリプチン遊離塩基が溶液から析出した。ＩＰＡ中１％の水２Ｌを添加することによって析出物を溶解させた。ＩＰＡ中１％の水８Ｌを１時間にわたって、３５～４０℃の浴温度で添加した。追加の析出物が形成するので、追加の水４００ｍＬを添加することによって、この析出物を溶解させた。溶液を、ロータリ

ー真空蒸発器上に一晩置いたままにし、次いで追加のＩＰＡ中１％の水２Ｌとともに別の丸底フラスコに移した。濃縮により、シタグリプチンのＩＰＡ／水の溶液２．５７４６ｋｇを得た。

【０３８１】

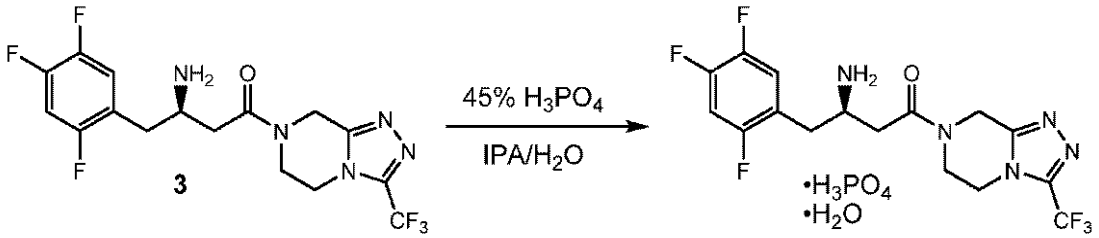
（実施例１４）

リン酸シタグリプチン一水和物の調製

リン酸シタグリプチン一水和物の調製を以下のように例示する。

【０３８２】

【化２１】



（リン酸シタグリプチン一水和物）

【０３８３】

シタグリプチンのリン酸一水和物塩を調製するための物質は、以下の通りである。

【０３８４】

【表５】

反応成分	量	モル当量
粗製物3	757 g (1.86モル)	1.0
45% w/w H_3PO_4	411 g (1.89モル)	1.02
水	347 + 491 + 100 mL	0.017
イソプロパノール	1.63 + 1.36 + 0.17 + 0.5 + 0.5 + 1.65L	
Seed	5 g	0.005
88/12イソプロパノール／水	1.4 L	

【０３８５】

方法。イソプロパノール１６３０ｍＬおよび水３４７ｍＬ中に粗製物３　７５７ｇを含有する溶液に、イソプロパノール１．３６Ｌ、その後に脱イオン水４９１ｍＬを添加した。２０Ｌの撹拌された容器に溶液を移し、次いで４５％ｗ／ｗのH_3PO_4（Ｆｉｓｈｅｒ　８５％）４１１ｇおよびＩＰＡ　１７２ｍＬを装填した。溶液を７２～８０℃に加熱することによって、初期のリン酸塩を溶解させ、追加の水１００ｍＬおよびイソプロパノール５００ｍＬを装填することによって、リン酸塩を完全に溶解させた。溶液を６２～６６℃に冷却し、純粋なリン酸シタグリプチン５ｇを播種した。反応物を６０～６５℃で３時間置いたままにし、次いで５時間にわたって２０～２５℃に冷却し、次いでさらに一晩冷却した。反応物に、イソプロパノール２．６５Ｌを２時間にわたって装填し（溶液は、約６：１のイソプロパノール／水である。）、ＲＴで１時間、および２℃で２時間置いたままにした。この物質を、８８／１２のイソプロパノール／水で湿らせることによって調製されたフィルターに通した。得られたケーキを、合計１．４Ｌの８８／１２のイソプロパノール／水で洗浄し、大気下で約３時間乾燥させ、次いでトレイに移して、窒素をスイープしながら真空乾燥器内で（２００トル）、約４０℃で３日間乾燥させ、リン酸シタグリプチン水和物９６６ｇを得た。この物質は、製造されたリン酸シタグリプチン水和物についてのすべての純度基準を満たし（または超え）、残留溶媒なし、酵素（＜１８ｐｐｍ）、ＰＬＰ補助因子（＜０．１ｐｐｍ）、またはエンドトキシン（＜０．０５ｎｇ）を示した。

【０３８６】

（実施例１５）
ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換を増大させるための方法ＩＩＩ
以下の実施例は、基質の４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オンの、生成物の（２Ｒ）－４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－アミンへの変換を増大させるのに使用される第３の大規模方法を例示する。一般に、この方法は、実施例１２に記載したのと同じ装置および条件を使用するが、より高い濃度のＤＭＳＯおよび基質を用いる。
方法：反応は、機械撹拌機、温度プローブ、ｐＨプローブ、および塩基添加ラインを装備した容器内で行った。塩基添加ラインは、水中４Ｍのイソプロピルアミン遊離塩基の供給を使用して、ｐＨを８．６から８．４の間に制御するのに使用した。容器に、水１．９２Ｌ、その後にトリエタノールアミン１０９ｍＬ（０．８２モル、０．３３当量）、および４Ｍのイソプロピルアミン溶液１．６４Ｌ（６．５６モル、２．６７当量）を添加した。次いで、１２ＮのＨＣｌ（４２４ｍＬ）を使用して、ｐＨを８．５に調整した。次いで反応器に、ＰＬＰ　６．７ｇ（０．０２７モル、０．０１１当量）、その後に、配列番号１０を有するトランスアミナーゼポリペプチド４０ｇを装填し、この混合物を、穏やかにアジテートしながら慎重に溶解させた。容器を、温度プローブ、塩基添加ライン、ｐＨプローブ、および４００ＲＰＭに設定された撹拌機を有する反応器ブロック上に配置した（注：ｐＨ制御ループはこの時点でオフである）。次に、ＤＭＳＯ２．２２Ｌを撹拌中の溶液中に添加し、反応器を４５℃に加熱した。温度が安定化されたとき、ｐＨ制御ループをオンにし、ｐＨを８．５に調整した（ｐＨは、水中４Ｍのイソプロピルアミンで制御した）。この時点で、撹拌を６００ＲＰＭに上昇させたが、渦形成を回避するために、先端速度は、２ｍ／ｓ未満に保持した。次いで、ケトアミド１．０ｋｇ（受け入れられるケトアミドは、半水化物として一般に９６～９８ｗｔ％であるので、補正重量は１ｋｇである；２．４６モル、１．００当量）を、ＤＭＳＯ　１．１１Ｌ中に溶解させた。次いでこのＤＭＳＯ／ケトアミド溶液を、反応器に２～３時間にわたって添加した。次いで反応器を、４５℃で、ｐＨを８．６～８．４の間に維持してさらに約１３時間撹拌し、アセトン除去を、３００トルの真空および２ｆｐｓの窒素スイープを用いて実現した。約１５時間の合計反応時間の後（１．３～２．０当量のイソプロピルアミン取込み）、反応は、逆相ＨＰＬＣ分析によって判断した場合、９０～９５％の変換であった。
【０３８７】
以下に記載するように、下流処理のための生成物を調製するために、濾過または直接抽出の後処理手順を使用することができる。
濾過後処理：ｐＨ制御ループをオフにし、ｓｏｌｋａ－ｆｌｏｃ　１３ｇを容器に添加し、その後、ｐＨ２～３まで１２ＭのＨＣｌを添加した。次いで反応物を、４５℃および１０００ＲＰＭで１～２時間エージングした。次いでスラリーを、フィルター（例えば、１ｋｇスケールでの、濾紙を有するフリット付きプラスチックブーフナー、またはパイロットプラントスケールでの、リサイクルループをまったく含まないスパークルフィルター（ｓｐａｒｋｌｅ　ｆｉｌｔｅｒ））に通過させた。容器およびフィルターを、０．０１ＮのＨＣｌ　１Ｌですすいだ。次いでこの水性酸性濾液にＩＰＡｃ　３Ｌを添加し、次いで、水相のｐＨを１９ＮのＮａＯＨを用いてｐＨ１１に調整した。層を撹拌しながらアジテートし、次いで静置させ、分離した（穏やかな加熱または真空は、相分別を加速する）。これを、ＩＰＡｃ　３Ｌを用いてさらに２回繰り返し、次いで合わせた有機物を、ブライン３Ｌで洗浄した（ｐＨ１１で）。次いで、シタグリプチン遊離塩基の得られたＩＰＡｃ溶液を、収率についてアッセイし（一般に８８～９２％のアッセイ収率；８８２～９２２ｇ）、下流処理してリン酸シタグリプチン一水和物にするために、溶媒をＩＰＡに替えた。
直接抽出後処理：ｐＨ制御ループをオフにし、ｐＨ２～３まで１２ＭのＨＣｌを添加した

。次いで反応物を、４５℃および１０００ＲＰＭで１～２時間エージングした。このバッチをＲＴに冷却し、次いでＩＰＡ　３Ｌを添加し、その後ＩＰＡｃ　３Ｌを添加した。次いで水層のｐＨを、１９ＮのＮａＯＨを用いて１１に調整した。混合物を２０～４５℃でアジテートし（エマルジョンを破壊するために、熱を使用することができる）、次いで静置および分離させた。ＩＰＡｃ／ＩＰＡ層を確保し、水層を８０／２０（体積／体積）のＩＰＡｃ／ＩＰＡ　３Ｌで抽出した。次いで、合わせたＩＰＡｃ／ＩＰＡ抽出物を、ブライン３Ｌで洗浄した。次いで、シタグリプチン遊離塩基の得られたＩＰＡｃ／ＩＰＡ　溶液を、収率についてアッセイし（一般に８７～９０％のアッセイ収率；８７２～９０２ｇ）、下流処理してリン酸シタグリプチン一水和物にするために、溶媒をＩＰＡに替えた。

【０３８８】

（実施例１６）

ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換を増大させるための方法ＩＶ

以下の実施例は、ケトアミド基質のシタグリプチン遊離塩基生成物への変換を増大させるために使用される第４の大規模方法、および引き続くリン酸シタグリプチンの調製を例示する。一般に、この方法は、実施例１２、１４、および１５において記載したのと同じ装置条件を使用するが、以下に詳述されるような変更を伴う。

【０３８９】

４Ｍのイソプロピルアミン溶液０．５９Ｌ、水０．６７Ｌ、およびトリエタノールアミン３９ｍＬを、０～３５℃で合わせることによって、バッファー溶液を調製した。バッファーのｐＨを、１２Ｎの塩酸を使用して、２０～２５℃で８．４～９．２に調整した。この混合物に、ＰＬＰ　１．２２ｇおよび配列番号１１０のトランスアミナーゼポリペプチド１６．２５ｇを、１５～２５℃で装填した。ＰＬＰおよび酵素を、アジテートしながら溶解させた。次に、ＤＭＳＯ　０．７２Ｌを、１５～４６℃で、最低３０分にわたってこのバッチに装填した。次いでこの酵素混合物を４４～４６℃に加熱し、次いで、４Ｍのイソプロピルアミン溶液を用いてｐＨ８．４～８．７に調整した。酵素混合物が反応後にクエンチされるまで、ｐＨをモニターし、ｐＨを８．４～８．７の範囲内に維持するために、必要に応じて４Ｍのイソプロピルアミン溶液を装填した。

【０３９０】

ケトアミド基質である４－オキソ－４－［３－（トリフルオロメチル）－５，６－ジヒドロ［１，２，４］トリアゾロ［４，３－ａ］ピラジン－７（８Ｈ）－イル］－１－（２，４，５－トリフルオロフェニル）ブタン－２－オン（４０６．２８ｇ、１．００モル）を、ＤＭＳＯ　０．４８Ｌ中に溶解させ、このＤＭＳＯ／ケトアミド溶液を、２～８時間にわたって酵素混合物に添加した。次いでこの酵素混合物を、４４～４６℃およびｐＨ８．４～８．７で、さらに７～２２時間反応させた。ＤＭＳＯ／ケトアミド溶液添加および後続の反応の両方の間、反応器の圧力を必要に応じて変更することによってアセトンを蒸発させ、それによって、反応を生成物のシタグリプチン遊離塩基の形成に推進した。さらに、反応の過程の間、ｐＨを８．４～８．７で維持するために、４Ｍのイソプロプルアミン溶液を必要に応じて装填した（一般に最低０．２５Ｌ、または１．０モル当量）。

【０３９１】

反応混合物を、ｓｏｌｋａ　ｆｌｏｃ　６５ｇを４４～４６℃で装填することによってクエンチした。ｓｏｌｋａ　ｆｌｏｃを装填した後、ｐＨ２～３に到達するまで、１２Ｎの塩酸をこのバッチに装填した。この混合物を、４４～４６℃およびｐＨ２～３で、少なくとも３時間撹拌した。次いでこの混合物を４４～４６℃で濾過し、廃ケーキを０．０１Ｎの塩酸（１．０２Ｌ～４．４７Ｌ）で洗浄した。合わせた濾液および０．０１Ｎの塩酸洗浄物を、１５～２５℃に冷却し、次いで酢酸イソプロピル（ＩＰＡｃ）２．４４Ｌを添加した。次いで見かけ上のｐＨを、１９Ｎの水酸化ナトリウムを用いて１０．５～１１．５に調整した。次いでこの混合物を、１５～４０℃でアジテートし、静置および分離した。頂部の有機層を確保し、次いでより下の水層を、ＩＰＡｃ　１．２２Ｌを用いて１５～２５℃で抽出した。次いで２つの有機抽出液を合わせ、水（０．２０Ｌ～１．２３Ｌ）を用いて１５～４０℃で洗浄した。最終的な有機層は、１００ｇ／Ｌでシタグリプチン遊離

塩基の粗ストリーム４．０７Ｌを生じ（４０７．３１ｇ、１．００モル）、これをリン酸シタグリプチン一水和物の調製において使用した。

【０３９２】

シタグリプチン遊離塩基の粗ストリーム４．０７Ｌを、２０～３５℃で、真空下で１．６８Ｌに濃縮し、次いで溶媒を、最低２．５２Ｌのイソプロパノールを使用してイソプロパノールに替えた。この溶液に、最低０．２７Ｌの水を装填することによって、すべての固体を溶解させた。水の添加は、結晶化の開始時に、一水和物の形成を増強する。リン酸水溶液（１．０２モル）をこの溶液に添加し、次いで加熱して溶解させた。

【０３９３】

次いでこの溶液を６２～６８℃に冷却し、粉砕されたリン酸シタグリプチン一水和物（例えば、Ｍｉｃｒｏｔｒａｃ分析で求めた場合、２５～４５ミクロンの間の９５パーセンタイルを伴った、１０～２０ミクロンの平均体積）２．６２ｇを播種し、６２～６８℃で３～６時間エージングさせた。スラリーを、最低２時間にわたって２０～２５℃に冷却した。このスラリーに、温度を２０～２５℃に維持しながら、最低２時間にわたってイソプロパノール０．４８Ｌを装填した。次いでこのスラリーを、最低２時間にわたって－１５℃～２０℃に冷却した。次いでこのスラリーを－１５℃～２０℃で濾過し、ウェットケーキを、水性イソプロパノール（８ｗｔ％の最小含水量）で洗浄した。このウェットケーキを、真空で、４５℃の最高温度で乾燥させることによって、リン酸シタグリプチン一水和物を得た。

【０３９４】

（実施例１７）

ケトアミド基質のシタグリプチンへの変換を増大させるための方法Ｖ

以下の実施例は、ケトアミド基質のシタグリプチン遊離塩基生成物への変換を増大させるために使用される第５の大規模方法、および引き続くリン酸シタグリプチンの調製を例示する。一般に、この大規模方法は、実施例１６において記載したのと同じ装置および条件を使用するが、以下に詳述するようないくつかの変更を伴う。

【０３９５】

４Ｍのイソプロピルアミン溶液５０．６８Ｌ、水５８．１Ｌ、およびトリエタノールアミン３．３６Ｌを、２０～２５℃で合わせることによって、バッファー溶液を調製した。次いでバッファーのｐＨを、１２Ｎの塩酸を使用して、２０～２５℃で８．８～９．２に調整した。このバッチの混合物に、ＰＬＰ　０．１１ｋｇ、および配列番号１１０のトランスアミナーゼ酵素１．４０ｋｇを、２０～２５℃で装填した。ＰＬＰおよび酵素を、アジテートしながら溶解させた（３０分後に確認した）。次に、ＤＭＳＯ　６１．７６Ｌを、２０～４６℃でこのバッチに装填した。次いでこのバッチを４４～４６℃に加熱し、この温度になった後、４Ｍのイソプロピルアミン溶液を装填して、ｐＨを８．４～８．７に調整した。

【０３９６】

ケトアミド基質（３５．００ｋｇ）を、ＤＭＳＯ　４１．１８Ｌ中に溶解させ、このＤＭＳＯ／ケトアミド溶液を、２～３時間にわたってこのバッチに添加した。次いでこのバッチを、４４～４６℃およびｐＨ８．４～８．７で、さらに１２～２２時間反応させた。ＤＭＳＯ／ケトアミド溶液添加および後続のエージングの両方の間、アセトンを除去するために、反応器の圧力を変更した（アセトン除去のための一般的な圧力条件：約３２５～３５０ｍｍＨｇの真空、および約３～６ｓｃｆｍの窒素のヘッドスペーススイープ）。さらに、反応の過程の間、ｐＨを８．４～８．７で維持するために、４Ｍのイソプロプルアミン溶液を必要に応じて装填した。反応変換結果の一般的な最後は、１５～１７時間の合計反応時間の後に８８～９３％であり、この時間は、ＤＭＳＯ／ケトアミド移動時間を含む。

【０３９７】

反応は、水４２Ｌ中のｓｏｌｋａ　ｆｌｏｃ　スラリー５．６０ｋｇを装填することによってクエンチした。ｓｏｌｋａ　ｆｌｏｃを装填した後、ｐＨ２～３に到達するまで、

１２Ｎの塩酸をこのバッチに装填した。反応物を、４４～４６℃およびｐＨ２～３で、３時間撹拌した。次いでこのバッチを、４４～４６℃で濾過し、廃ケーキを、０．０１Ｎの塩酸溶液１５４Ｌで洗浄した。

【０３９８】

合わせた濾液および洗浄液を１５～２５℃に冷却し、次いで酢酸イソプロピル（ＩＰＡｃ）２１０Ｌを添加した。次いでこのバッチの見かけ上のｐＨを、１９Ｎの水酸化ナトリウムを用いて１０．５～１１．５に調整した。次いでこの混合物を、１５～２５℃でアジテートし、静置および分離した（抽出＃１）。頂部の有機層を確保し、次いでより下の水層を、ＩＰＡｃ　１０５Ｌを用いて１５～２５℃で抽出した（抽出＃２）。次いで２つの有機抽出液を合わせ、水１７．５０Ｌを用いて３２～３８℃で洗浄した（抽出＃３）。最終的な有機層は、シタグリプチン遊離塩基の粗ストリーム２９．４４アッセイｋｇを生じた（約８５．９％のアッセイ収率）。

【０３９９】

１００ｇ／Ｌで２９４．４０Ｌ（２９．４４ｋｇ、７２．２８モル）の遊離塩基の粗ストリームを、２０～３５℃で、真空（３０～６０ｍｍＨｇ）下で１２１．５９Ｌに濃縮した。このバッチを、イソプロパノール１８２．３９Ｌを使用して、イソプロパノールに溶媒スイッチした。このバッチに、水１９．７２Ｌを装填することによって、すべての固体を溶解させた。次いで、４５ｗｔ％のリン酸水溶液１５．８７ｋｇをこのバッチに添加し、これを７２～８０℃に加熱して溶解させた。このバッチ溶液を６２～６６℃に冷却し、ピン粉砕したリン酸シタグリプチン一水和物０．１９ｋｇを播種した。このバッチを６２～６６℃で３時間エージングし、次いで２時間にわたって２０～２５℃に冷却した。このバッチに、バッチ温度を２０～２５℃に維持しながら、２時間にわたってイソプロパノール３４．４０Ｌを装填した。次いでこのバッチを、２時間にわたって－１５℃～０℃に冷却した。次いでこのスラリーを－１５℃～０℃で濾過し、ウェットケーキを、水性イソプロパノール（最低８ｗｔ％の水）７０．０５Ｌで洗浄した。このウェットケーキを、真空で、４０℃で乾燥させることによって、リン酸シタグリプチン一水和物を得た（３７．３４物理的ｋｇ、約９８％の収率）。

【０４００】

本願に引用されたすべての刊行物、特許、特許出願、および他の文献は、それぞれ個々の刊行物、特許、特許出願、または他の文献が、すべての目的ために参照により組み込まれていることが個々に示されているのと同じ程度に、すべての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０４０１】

様々な特定の実施形態を例示および説明してきたが、本発明（複数可）の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことができることが理解されるであろう。

【配列表】

0005707344000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 マンドーフ, エミリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６３, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ ２００
(72)発明者 ムーア, ジェフリー シー.
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０７０９０, ウエストフィールド, オレンダ サークル ３６７
(72)発明者 ディバイン, ポール エヌ.
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０７７２４, トリントン フォールズ, レオナルド プレイス ６
(72)発明者 ジェイニー, ジェイコブ エム.
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２３, ニュー ヨーク シティ, ダブリュー. ７２ エヌディー ストリート ５０, アパートメント １５０５

審査官 櫛引 明佳

(56)参考文献 国際公開第９８／０４８０３０（WO, Ａ１）
特表２００６－５２１３５４（ＪＰ, Ａ）
Iwasaki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.69, p.499-505(2006)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）