

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7246133号
(P7246133)

(45)発行日 令和5年3月27日(2023.3.27)

(24)登録日 令和5年3月16日(2023.3.16)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 D 307/92 (2006.01)	C 0 7 D
C 1 1 B 9/00 (2006.01)	C 1 1 B
C 1 2 P 7/00 (2006.01)	C 1 1 B
C 1 2 N 9/90 (2006.01)	C 1 2 P
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N

請求項の数 14 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2017-555602(P2017-555602)
(86)(22)出願日	平成28年4月22日(2016.4.22)
(65)公表番号	特表2018-513198(P2018-513198 A)
(43)公表日	平成30年5月24日(2018.5.24)
(86)国際出願番号	PCT/EP2016/058997
(87)国際公開番号	WO2016/170106
(87)国際公開日	平成28年10月27日(2016.10.27)
審査請求日	平成31年4月9日(2019.4.9)
審判番号	不服2021-1187(P2021-1187/J1)
審判請求日	令和3年1月28日(2021.1.28)
(31)優先権主張番号	1507170.7
(32)優先日	平成27年4月24日(2015.4.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

(73)特許権者 501105842
ジボダン エス エー
スイス国 1214 ヴェルニエ、シュ
マン ド ラ パルフュムリー 5番

(74)代理人 100102842
弁理士 葛和 清司

(72)発明者 アイクホルン、エリック
スイス国 8006 チューリッヒ、クロ
ーネンシュトラーセ 39

合議体
審判長 井上 典之
審判官 齋藤 恵
審判官 野田 定文

最終頁に続く

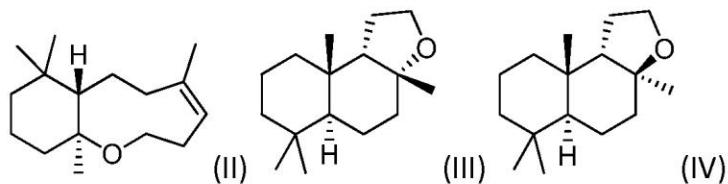
(54)【発明の名称】 アンブロクスを単離および精製するためのプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化合物 (I I)、(I I I) および (I V)

【化 1】



の 1 種以上を含む反応混合物から、(-)-アンブロックスを単離および精製する方法であって、

化合物(II)、(III)または(IV)の1種以上を含む反応混合物から、(-)-アンブロックスを選択的に結晶化するステップを含み、ここで選択的結晶化が、温かいエタノールに(-)-アンブロックスならびに化合物(II)、(III)および(IV)の1種以上を含有する混合物を溶解した溶液を得て、冷却中の当該エタノール溶液に水をゆっくり加えることで(-)-アンブロックスを選択的に結晶化させ、それによって(-)-アンブロックスは溶媒からの結晶化が生じる一方で、化合物(II)、(III)、

および(IV)は、エタノール水混合物中に溶解して残留する、前記方法。

【請求項 2】

混合物が、ホモファルネソールを含まない、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

混合物が、ホモファルネソールの 7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソール幾何異性体の混合物を含むホモファルネソールの酵素触媒環化反応の結果として形成され、反応が、酵素をコードする遺伝子を発現する組み換え微生物の存在下で行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールの混合物が、7 E , 3 E 幾何異性体が豊富である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールの混合物が、7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールからなり、他のホモファルネソール幾何異性体を含まない、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

7E, 3E異性体の7E, 3Z異性体に対する重量比が、少なくとも80:20である、請求項3~5のいずれか一項に記載の方法。

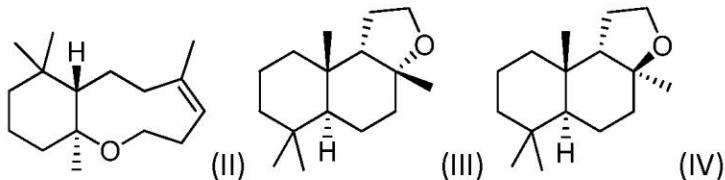
【請求項 7】

酵素が、野生型スクアレンホペン環化酵素または野生型スクアレンホペン環化酵素の変異型である、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

化合物 (I I)、(I I I) または (I V)

【化 2】



の1種以上を含む反応混合物から、(-)-アンブロックスを選択的に結晶化するステップを含み、

ここで選択的結晶化が、温かいエタノールに(-)-アンブロックスならびに化合物(I I)、(I I I)および(I V)の1種以上を含有する混合物を溶解した溶液を得て、冷却中の当該エタノール溶液に水をゆっくり加えることで(-)-アンブロックスを選択的に結晶化させ、それによって(-)-アンブロックスは溶媒からの結晶化が生じる一方で、化合物(I I)、(I I I)、および(I V)は、エタノール水混合物中に溶解して残留する、(-)-アンブロックスの匂いを改善または増強する方法。

【請求項 9】

混合物が、ホモファルネソールを含まない、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

混合物が、ホモファルネソールの 7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソール幾何異性体の混合物を含むホモファルネソールの酵素触媒環化反応の結果として形成され、反応が、酵素をコードする遺伝子を発現する組み換え微生物の存在下で行われる、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールの混合物が、7 E , 3 E 幾何異性体が豊富である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 1 2】

7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールの混合物が、7 E , 3 E および 7 E , 3 Z ホモファルネソールからなり、他のホモファルネソール幾何異性体を含まない、請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

7 E , 3 E 異性体の 7 E , 3 Z 異性体に対する重量比が、少なくとも 8 0 : 2 0 である、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

酵素が、野生型スクアレンホペン環化酵素または野生型スクアレンホペン環化酵素の変異型である、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

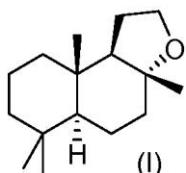
本発明は、異性体 (-) - アンブロックス (A m b r o x) を調製、単離および精製する方法に関する。より具体的には、本発明は、生物変換によって、(-) - アンブロックスを調製する方法、ならびに反応混合物からそれを回収および精製する方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

A M B R O F I X (商標) は、一般式 (I)

【化 1】

20



を有する、鏡像異性体的に純粋な化合物 (-) - アンブロックスの、所有者であるジボダン (G i v a u d a n) の商品名である。

A M B R O F I X (商標) は、パーフューマーのパレット成分において非常に重要な分子である。これは、あらゆる香料製品における使用のための、極めて強力で、極めて実質的で、かつ極めて安定なアンバー様 (ambery) ノートを出す。A M B R O F I X (商標) は、ジボダンから入手可能であり、本格的なアンバーグリス (ambergris) 匀いノートを得るのに最も好適な材料である。

30

【0 0 0 3】

現在、A M B R O F I X (商標) は、自然由来の出発物質から合成により生産されている。特定の出発物質の供給と質は、気候条件ならびに社会経済的要因に依存している。さらに、出発物質が天然資源から少量の產生量で抽出されることもあり得るため、ほぼ確実に、工業規模ではそれらの使用をますます不経済なものにしていくであろう価格で市販されている。したがって、A M B R O F I X (商標) の大量生産的な工業的供給を、合理的費用で利用し続けていこうとするならば、工業化可能な、より費用対効果の高いプロセスに対する必要性が存在する。

40

【0 0 0 4】

A M B R O F I X (商標) への工業的に拡張可能なバイオ技術的経路は、完全に合成的な手順よりも、潜在的により複雑でなく、より汚染が少ないとから、魅力的であろう。

(-) - アンブロックスを供給するための生物変換を試みるのに潜在的に使用可能な基質は、ホモファルネソールである。影響力のあるその論文において、Neumannら (Biol. Chem. Hoppe-Seyler Vol. 367 pp 723-726 (1986)) は、酵素スクアレンホペン環化酵素 (S H C) を用いた酵素的触媒下での、ホモファルネソールの (-) - アンブロックスへの転換の実現性について議論した。用いられたホモファルネソールは、この分子の 4

50

種の幾何異性体混合物であった。4種の異性体のうち、7E, 3E幾何異性体（通常の命名法を用いた）だけを環化することができる所以、所望の(-)-アンブロックスの非常に低い収量が得られるに過ぎない。

【0005】

JP 2009-60799(花王)は、それによりSHCが(-)-アンブロックスを產生するためのホモファルネソール基質に作用する合成を開示している。基質は、4種の幾何異性体(3Z, 7Z; 3E, 7Z; 3Z, 7E; および3E, 7E)全ての混合物である。同文献は、SHCを含有するホモファルネソール抽出物からの(-)-アンブロックスの調製を開示するのみである。ホモファルネソール混合物は、(-)-アンブロックスとその9-エピ立体異性体に変換され、精製は、蒸留またはカラムクロマトグラフィーにより行うことができる。花王は、SHCを產生するそのままの微生物を用いてホモファルネソールを(-)-アンブロックスに変換するプロセスについては記載しておらず、さらに、(-)-アンブロックスを嗅覚的に純粋な形態で得ることができるそのようなプロセスにより得られる複雑な混合物の下流のプロセシングに関して、全く技術的な教示を提供していない。

【0006】

出願人の知る限り、従来技術は、ホモファルネソールのSHC触媒生物変換を含む、(-)-アンブロックスを嗅覚的に純粋な形態で提供するための、実行可能で工業的に拡張可能なプロセスについて全く記載していない。

さらに、ホモファルネソールの生物変換が工業的規模で実現されるようになっても、極めて純度の高い3E, 7E-ホモファルネソールの費用効率の高いソースが入手可能でなければならない。しかしながら、ホモファルネソールの合成経路は文献(例えば、US 2013/0273619を参照)に記載されているが、出願人の知る限り、費用対効果の高い、現在入手可能な純粋な7E, 3E-ホモファルネソールの工業的規模のソースは存在しない。

【0007】

価値ある香料成分(-)-アンブロックスへの、経済的に実現可能でありかつ工業的に拡張可能な経路を提供する必要がある。

同時係属中の特許出願PCT/EP2014/072891(WO2015/059293として公開)およびPCT2014/EP/072882(WO2015/059290として公開)において、出願人は、7E, 3E幾何異性体が豊富な7E, 3E/Z-ホモファルネソール混合物を調製する効率的方法について記載している。7E, 3E/Z-ホモファルネソール混合物は、ベータ-ファルネセンから調製され、この出発物質に含有されている異性体情報は、7位のホモファルネソール二重結合がE-配置で固定されるというように、保存されている。しかしながら、この洗練された化学も、まだ3E/Z異性体混合物をもたらす。純粋な7E, 3E-ホモファルネソールは、合成的には難易度が高いままであり、異性体混合物の経済的に不利な精製という手段によってのみ達成され得る。

【0008】

驚くべきことに、出願人は、7E, 3E/Z-ホモファルネソール混合物が、生物変換プロセスを受けることができ、それによりホモファルネソール混合物が、酵素、特にホモファルネソールを(-)-アンブロックスに生物変換することができるスクアレンホベン環化酵素(SHC)生物触媒、を発現する組み換え微生物の存在下で酵素的に環化され、(-)-アンブロックスを驚くほど容易な下流プロセシングにより嗅覚的に純粋な形態で単離し得る反応混合物を產生することを見出した。

【0009】

本発明の一つの側面において、(-)-アンブロックスを含む反応混合物を提供するための、ホモファルネソールの酵素触媒環化が提供され、ここで、ホモファルネソールは、ホモファルネソールの7E, 3E/Z-幾何異性体の混合物を含み、反応は、酵素を產生する組み換え微生物、より具体的には酵素を產生する無傷の(intact)組み換え微生物の存在下で行われる。

【0010】

10

20

30

40

50

本発明の態様において、環化反応は、ホモファルネソールを(-) - アンプロックスに生物変換することができる S H C 生物触媒の存在下で行われる。

S H C 生物触媒は、野生型もしくは変異型酵素であるか、または S H C 酵素をコードする遺伝子を発現する微生物、好ましくは組み換え大腸菌微生物である。S H C 生物触媒は、これらに限定されないが、精製された S H C 酵素、S H C 酵素を含有する粗 (crude) 抽出物、または(例えば、担体上に) 固定化された S H C 酵素などのあらゆる形態で用いることができ、あるいは、生物触媒は、S H C 酵素を含有する、無傷の組み換え全細胞および/または断片化細胞または膜分画などの、S H C を產生したもしくは產生する微生物であってもよい。

【0011】

10

本発明の具体的な態様においては、ホモファルネソール混合物は、7 E , 3 E - 幾何異性体が豊富である。

より具体的な態様においては、ホモファルネソール混合物は、少なくとも 7 E , 3 E / 7 E , 3 Z の重量で 55 / 45 である。

より具体的な態様においては、ホモファルネソール混合物は、少なくとも 7 E , 3 E / 7 E , 3 Z の重量で 70 / 30 である。

さらにより具体的な態様において、ホモファルネソール混合物は、少なくとも 7 E , 3 E / 7 E , 3 Z の重量で 80 / 20 である。

さらにより具体的な態様において、ホモファルネソール混合物は、少なくとも 7 E , 3 E / 7 E , 3 Z の重量で 90 / 10 である。

20

さらにより具体的な態様において、ホモファルネソール混合物は、少なくとも 7 E , 3 E / 7 E , 3 Z の重量で 95 / 5 である。

本発明の具体的な態様においては、ホモファルネソール混合物は、ホモファルネソールの 7 E , 3 E / Z - 幾何異性体からなり、他の幾何異性体を含まない。

【0012】

30

当業者は、ホモファルネソールに関連して用いられる用語 7 E 、 7 Z 、 3 E または 3 Z が、それぞれ、ホモファルネソールの 7 位および 3 位における二重結合の配向性について言及することを理解する。7 E , 3 E - ホモファルネソール化合物は CAS No. 459-89-2 を有するのに対し、7 E , 3 Z - ホモファルネソール化合物は CAS No. 138152-06-4 を有する。用語 7 E , 3 E / Z - ホモファルネソールの使用は、その化合物の混合物について言及する。

【0013】

40

本発明の方法にしたがって、環化反応における基質として有用なホモファルネソール混合物を得る方法は、上記で言及した同時係属中の出願 PCT/EP2014/072891 (WO2015/059293 として公開) および PCT2014/EP/072882 (WO2015/059290 として公開) において記載されており、これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。一般論として、これらは、N - アルキル - N - ニトロソ尿素の有機溶液を用いて、ファルネセン、より具体的には、アルファ - ファルネセンおよび/またはベータ - ファルネセンを、それに対応するシクロプロパン化されたファルネセン誘導体に変換することによって進行するホモファルネソール混合物の合成について記載している。次いで、シクロプロパン化された誘導体は、7 E , 3 E 幾何異性体に選択的なホモファルネソール混合物を提供する、ブロンステッド酸の存在下での開環および転位反応を受ける。出発物質としてファルネセンを用いることは、ホモファルネソールの 7 位における二重結合の E - 構造が固定されるのを確保するため、特に好ましい。

【0014】

本発明の特定の態様を形成する特別な反応条件は、同時係属中の出願ならびに本明細書の下記における例に記載されており、ここではこれ以上詳述しない。

(-) - アンプロックスを含有する反応混合物を提供するホモファルネソールの環化は、スクアレンホペン環化酵素 (S H C) により触媒され得る。S H C は、野生型酵素 (例えば、配列番号 1) またはその変異型 (例えば、配列番号 2 または配列番号 4) であって

50

もよい。S H Cは、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus acidocaldarius* (バシラス・アシドカルダリウス) (*Bacillus acidocaldarius*)))、ジモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*)、または(US20120135477A1の例3bに記載されているように)ブラディリゾビウム・ジャポニクム (*Bradyrhizobium japonicum*)から得ることができる。

【0015】

しかしながら、酵素はまた、当該分野において通常知られている技術を用いて、組み換え手段により產生することもできる。

酵素に関して用いられる用語「組み換え」は、組み換えDNA技術によって產生される、すなわち所望の酵素をコードする外来性DNAコンストラクトによって形質転換された細胞から產生される、酵素を言うものとする。したがって、用語「組み換えDNA」は、ベクターに、自己複製プラスミドもしくはウイルスに、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA(もしくは、天然の染色体上の部位以外の位置において、相同な細胞のゲノム)に組み込まれた組み換えDNAを包含する。

10

【0016】

核酸分子は、原核生物および/または真核生物宿主細胞における発現を可能にする発現制御配列に動作可能に連結される。本明細書において用いられる「動作可能に連結される」は、発現制御配列が、目的のコード配列の発現を有効に制御するように遺伝子コンストラクトに組み込まれていることを意味する。上で言及した転写/翻訳制御エレメントは、誘導性および非誘導性、構成的、細胞周期により制御される、代謝により制御されるプロモーター、エンハンサー、オペレーター、サイレンサー、リプレッサー、ならびに当業者に公知であり、遺伝子発現を駆動または別様に制御する他のエレメントを包含するが、これらに限定されない。かかる制御エレメントは、構成的発現に向かわせるかあるいは、例えばCUP-1プロモーター、例えばt e t オンまたはt e t オフシステムに採用されるt e t リプレッサー、l a c システム、t r p システム制御エレメントのように誘導性発現を可能にする、制御エレメントを包含するが、これらに限定されない。例として、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)は100 μMから1.0 mMの濃度範囲内においてタンパク質発現の効果的な誘導因子である。この化合物は、l a c オペロンの転写を惹起するラクトース代謝物質であるアロラクトースの分子模倣体であり、それゆえに、遺伝子がl a c オペレーターの制御下にあるときにタンパク質発現を誘導するために用いられる。

20

【0017】

同様に、核酸分子は、追加のポリペプチド配列、例えばマーカーまたはレポーターとして機能する配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成し得る。マーカーおよびレポーター遺伝子の例には、ベータ-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ(HPH)、チミジンキナーゼ(TK)、(ベータ-ガラクトシダーゼをコードする)l a c Z、およびキサンチングアミニホスホリボシリトランスフェラーゼ(XGprt)が含まれる。本開示の実施に関係する標準的手順の多くと同じく、当業者は追加の有用な試薬、例えばマーカーまたはレポーターの機能を果たし得る追加の配列を知っているであろう。

30

【0018】

組み換えポリヌクレオチドは、野生型S H Cまたはその変異型などのS H C酵素をコードすることができ、これは発現および任意の精製のためにベクター中に挿入され得る。ある種のベクターは、その中に追加のDNAセグメントがライゲーションされている環状二本鎖DNAループを代表するプラスミドである。あるベクターは、それらが機能的に連結された遺伝子の発現を制御することができる。これらのベクターは「発現ベクター」と呼ばれる。通常は、DNA組み換え技術に好適な発現ベクターはプラスミド型である。典型的には、発現ベクターは、野生型S H Cまたはその変異型などの遺伝子を含む。プラスミ

40

50

ドは最も多くの場合に用いられるベクター型であるので、本明細書において、用語「プラスミド」および「ベクター」は交換可能に用いられる。

【0019】

かかるベクターは、宿主細胞中に天然には存在しないDNA配列、通常はRNAに転写またはタンパク質に翻訳（「発現」）されないDNA配列、および非組み換え宿主に導入したい他の遺伝子またはDNA配列を包含するが、これらに限定されないDNA配列を包含し得る。典型的には、組み換え宿主のゲノムは、1種以上の組み換え遺伝子の安定な導入によって拡張されるということが理解されるであろう。しかしながら、自己または複製プラスミドもしくはベクターもまた、本開示の範囲内において用いられ得る。さらに、本開示は、低コピー数、例えば単一コピー、または高コピー数であるプラスミドまたはベクターを用いて実施され得る。

10

【0020】

好ましい態様において、本開示のベクターは、プラスミド、ファージミド、ファージ、コスミド、人工細菌および人工酵母染色体、ノックアウトまたはノックインコンストラクト、合成核酸配列、あるいはカセットを含み、一部は直鎖状ポリヌクレオチド、プラスミド、メガプラスミド、植物、細菌、哺乳類、もしくは酵母人工染色体などの合成または人工染色体の形態で產生され得る。

【0021】

導入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、ベクターの導入時に細胞内で產生されることが好ましい。多様な遺伝子基質がプラスミド中に組み込まれ得る。プラスミドは多くの場合、標準的なクローニングベクター、例えば細菌マルチコピーープラスミドである。基質同士は同じかまたは異なるプラスミド中に組み込まれ得る。多くの場合、異なる型の選択可能なマーカーを有するプラスミドの少なくとも2つの異なる型が用いられ、少なくとも2つの型のベクターを含有する細胞の選択を可能にする。

20

【0022】

典型的には、細菌または酵母細胞が、当分野において周知であるように下記ヌクレオチド配列のいずれか1種以上によって形質転換され得る。インビオ組み換えのためには、ゲノムまたは他の遺伝子と組換えられるべき遺伝子が、標準的な形質転換技術を用いて宿主を形質転換するために用いられる。好適な態様においては、複製起点を提供するDNAがコンストラクト中に包含される。複製起点は当業者によって適切に選択され得る。遺伝子の性質に応じて、配列が、それら自体で複製起点として作動可能である遺伝子またはゲノムに既に存在する場合には、補足的な複製起点は必要とされないこともある。

30

【0023】

細菌または酵母細胞は、かかるDNAが細胞内に導入されたときに、外来性または異種DNAによって形質転換され得る。形質転換DNAは統合され(integrated)、すなわち細胞のゲノム中に共有結合的に連結されてもよく、もしくは統合されなくてもよい。原核生物および酵母において、例えば、形質転換DNAはプラスミドなどのエピソームエレメントとして維持され得る。真核生物細胞に関しては、安定にトランスフェクションされた細胞は、トランスフェクションされたDNAが、それが染色体複製を介して娘細胞に受け継がれるように染色体に統合されたものである。この安定性は、形質転換DNAを含有する娘細胞の集団で構成される細胞株またはクローンを樹立する真核生物細胞の能力によって示される。

40

【0024】

一般的に、導入されるDNAは、DNAの受容者である宿主に元々内在してはいないが、所与の宿主からDNAセグメントを単離し、引き続いてそのDNAの1つ以上の追加コピーを同じ宿主に導入して、例えば遺伝子産物の產生を増強するかまたは遺伝子の発現パターンを変化させることは本開示の範囲内である。いくつかの場合には、導入されたDNAは、内因性の遺伝子またはDNA配列を、例えば相同組み換えまたは部位特異的変異導入により、改変するかまたはさらには置換するであろう。好適な組み換え宿主には、微生物、植物細胞、および植物が含まれる。

50

【 0 0 2 5 】

本開示はまた、組み換え宿主をも特徴とする。用語「組み換え宿主」はまた、「遺伝子改変宿主細胞」または「トランスジェニック細胞」ともまた言われ、異種核酸を含むか、またはそのゲノムが少なくとも1つの組み込まれたDNA配列によって拡張された宿主細胞を指す。本開示の宿主細胞は、上で概説されているようにポリヌクレオチドまたはベクターによって遺伝子改変され得る。

【 0 0 2 6 】

本開示の目的のために用いられ得る宿主細胞には、例えば、本開示のポリヌクレオチド分子を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、細菌人工染色体、またはコスマドDNA発現ベクターによって形質転換され得る細菌（例えば大腸菌および枯草菌）などの原核生物細胞；例えば本開示のポリヌクレオチド分子を含有する組み換え酵母発現ベクターによって、形質転換され得る酵母（例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）およびピキア（*Pichia*））のような単純な真核生物細胞、が包まれるが、それに限定されない。本開示のポリヌクレオチドを導入するために用いられる宿主細胞およびそれぞれのベクターに応じて、ポリヌクレオチドは例えば染色体もしくはミトコンドリアDNAに統合し得るか、または例えばエピソームに、のように染色体外に、維持され得るか、または一過性にのみ細胞内に含まれ得る。

10

【 0 0 2 7 】

特に遺伝子工学、および1種以上の遺伝子または遺伝子の集合クラスターを細胞に導入することに言及して本明細書において用いられる用語「細胞」または產生細胞は、あらゆる原核生物または真核生物細胞を言うと理解される。原核生物および真核生物宿主細胞は両方とも、本開示に従った使用を企図され、大腸菌もしくはバシラス種のような細菌宿主細胞、S・セレビシエなどの酵母宿主細胞、スピドブテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）などの昆虫宿主細胞、またはHeLaおよびJurkatなどのヒト宿主細胞を包含する。

20

【 0 0 2 8 】

具体的には、細胞は真核生物細胞、好ましくは真菌、哺乳類もしくは植物細胞、または原核生物細胞である。好適な真核細胞には、例えば限定なしに哺乳類細胞、酵母細胞、または（Sf9を包含する）昆虫細胞、（黒色素胞細胞を包含する）両生類細胞、または（カエノラブディティス・エレガансを包含する）カエノラブディティスの細胞を包含する蠕虫細胞が含まれる。好適な哺乳類細胞には、例えば限定なしに（Cos-1およびCos-7を包含する）COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、HEK293 T-RexTM細胞、または他のトランスフェクション可能な真核細胞株が含まれる。好適な細菌細胞には、限定なしに大腸菌が含まれる。

30

【 0 0 2 9 】

好ましくは、大腸菌、バシラス、ストレプトミセス（*Streptomyces*）などの原核生物、またはHeLa細胞もしくはJurkat細胞のような哺乳類細胞、またはシロイスナズナ（*Arabidopsis*）のような植物細胞が用いられ得る。

好ましくは、細胞はアスペルギルス種または真菌細胞であり、好ましくは、これは属サッカロミセス、カンジタ、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）、ハンゼヌラ（*Hansenula*）、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）、ヤロウイア（*Yarrowia*）、ピキア、およびアスペルギルスからなる群から選択され得る。

40

好ましくは、大腸菌宿主細胞は、産業界および規制当局によって認識されている大腸菌宿主細胞である（大腸菌 K12宿主細胞または例に示されている大腸菌 BL21宿主細胞を包含するが、これらに限定されない）。

【 0 0 3 0 】

本開示で用いるための1種の好ましい宿主細胞は大腸菌であり、これは本明細書に記載されているように組み換えるに調製され得る。それゆえに、組み換え宿主は、組み換え大腸菌宿主細胞であり得る。大腸菌については、利用可能な変異体、プラスミド、代謝の詳細なコンピュータモデル、および他の情報のライブラリーがあり、生成物収率を増強する

50

ための種々のモジュールの合理的設計を可能にする。サッカロミセスについて上で記載されているものと類似の方法が、組み換え大腸菌微生物を作るために用いられ得る。

1つの態様において、組み換え大腸菌微生物は、S H C 遺伝子をコードするヌクレオチド配列、またはそのバリエント、ホモログ、変異体、誘導体、または断片を包含するが、これらに限定されないその機能的同等物／相同物を含む。

【 0 0 3 1 】

本開示に使用するための別の好ましい宿主細胞はS・セレビシエであり、これは合成生物学においてシャシー生物として広く用いられている。それゆえに、組み換え宿主はS・セレビシエであり得る。S・セレビシエについては、利用可能な変異体、プラスミド、代謝の詳細なコンピュータモデル、および他の情報のライブラリーがあり、生成物収率を増強するための種々のモジュールの合理的設計を可能にする。組み換えS・セレビシエ微生物を作るための方法は既知である。

10

【 0 0 3 2 】

細胞の培養は従来の様式で行われる。培養培地は炭素源、少なくとも1つの窒素源、および無機塩を含有し、ビタミンがそれに追加される。この培地の構成成分は、当該微生物種を培養するために従来用いられているものであり得る。

本方法において用いられる炭素源には、組み換え宿主細胞によって代謝されて増殖および／または(-)-アンブロックスの産生を促進し得るあらゆる分子が含まれる。好適な炭素源の例には、(例えばモラセス中に見いだされる)スクロース、フルクトース、キシロース、グリセロール、グルコース、セルロース、デンプン、セロビオース、または他のグルコース含有ポリマーを包含するが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 3 】

宿主として酵母を採用する態様においては、例えば、スクロース、フルクトース、キシロース、エタノール、グリセロール、およびグルコースなどの炭素源が好適である。炭素源は、培養期間に渡って宿主生物に提供することができ、また代替的には、生物を別のエネルギー源、例えばタンパク質の存在下においてある期間増殖させ、それから流加相(fed-batch phase)の間のみ炭素源を提供することができる。

【 0 0 3 4 】

本開示の方法において使用するための組み換え宿主細胞微生物の好適性は、周知の方法を用いる単純な試験手順によって決定され得る。例えば、試験されるべき微生物は、微生物の増殖のために一般的に用いられるpH、温度、および通気条件において富栄養培地(例えば、LB培地、バクトトリプトン酵母エキストラクト培地、栄養培地等)で増殖させ得る。一旦、所望の生物変換生成物を產生する組み換え微生物(すなわち組み換え宿主細胞)が選択されれば、生成物は、典型的には產生宿主細胞株によって大スケールで、好適な発現システムおよび発酵によって、例えば細胞培養物中の微生物產生によって、產生される。

30

【 0 0 3 5 】

本開示の1つの態様においては、M9Aなどの限定最少培地が細胞培養に用いられる。M9A培地の構成成分は、 KH_2PO_4 1.4 g / L、 K_2HPO_4 1.6 g / L、クエン酸 $Na_3 \cdot 2H_2O$ 1 g / L、 $(NH_4)_2SO_4$ 7.5 g / L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g / L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.015 g / L、グルコース 5 g / L、および酵母エキストラクト 1.25 g / Lを含む)。

40

本開示の別の態様においては、LBなどの富栄養培地が用いられた。LB(Luria-Bertani)培地の構成成分は10 g / Lのトリプトン、5 g / Lの酵母エキストラクト、5 g / Lの $NaCl$ を含む。

【 0 0 3 6 】

ミネラル培地およびM9ミネラル培地の他の例は、例えばUS6524831B2およびUS2003/0092143A1に開示されている。

組み換え微生物は、バッチ(batch)、流加(fed batch)、もしくは連続プロセス、またはその組み合わせによって増殖させることができる。典型的には、組み換え微生物は

50

、発酵槽(fermentor)内で定められた温度で好適な栄養源、例えば炭素源、の存在下において所望の期間増殖させ、ホモファルネソールを所望の量で(-) - アンブロックスに生物変換する。

【0037】

組み換え宿主細胞はいずれかの好適な様式で、例えばバッチ培養または流加培養によって、培養され得る。本明細書において用いられる用語「バッチ培養」は、培養培地が培養の間に追加も取り出しあれない培養方法である。本明細書において用いられる用語「流加」は、培養培地が培養の間に追加されるが、培養培地は取り出されない培養方法を意味する。

【0038】

本開示の1つの態様は、細胞系システムにおいて(-) - アンブロックスを產生する方法を提供し、前記方法は、野生型SHCまたはその変異型を好適な条件下において細胞系システムにおいて產生すること、ホモファルネソールを細胞系システムに供給する(feed)こと、細胞系システムを用いて產生された野生型SHCまたはその変異型を用いてホモファルネソールを(-) - アンブロックスに変換することと、細胞系システムからアンブロックスを回収すること、およびシステムから(-) - アンブロックスを単離することを含む。他のスクレオチド配列の発現は、(-) - アンブロックスを作る生物変換経路を増強するために役立つ。

【0039】

本開示のさらなる態様は、(-) - アンブロックスを作る生物変換方法であり、前記方法は、野生型SHCまたはその変異型遺伝子を含む宿主細胞を増殖させること、野生型SHCまたはその変異型酵素を宿主細胞において產生すること、ホモファルネソール(例えばEEH)を宿主細胞に供給すること、ホモファルネソールのアンブロックスへの変換を促進するために適切なpH、温度、および可溶化剤の条件下において宿主細胞をインキュベートすること、ならびに(-) - アンブロックスを回収することを含む。宿主細胞における野生型SHCまたはその変異型酵素の產生は、ホモファルネソールが好適な反応条件下において宿主細胞に添加されたときに(-) - アンブロックスを作る方法を提供する。達成される変換は、より多くの生体触媒およびSDSを反応混合物に添加することによって増強され得る。

【0040】

組み換え宿主細胞微生物は、引き続く生物変換ステップのための野生型SHCまたは変異型体酵素を発現する好適な量の細胞を提供するために、数多くのやり方で培養することができる。生物変換ステップのための適用可能な微生物は大幅に変わるので(例えば酵母、細菌、および真菌)、当然のことながら、培養条件はそれぞれの種の特定の要件に合わせて調整され、それらの条件は周知であり文書化されている。組み換え宿主細胞微生物の細胞を増殖させるための当分野において既知の方法はどれでも、本開示の引き続く生物変換ステップに利用可能な細胞を產生するために用いることができる。典型的には、細胞は、生物変換反応のための十分なバイオマスを产生するため(光学密度(OD)として測定可能であるように)特定の密度まで増殖させる。選ばれる培養条件は、得られる細胞(バイオマス)の量に影響を与えるのみならず、培養条件の質もまたどのようにバイオマスが生体触媒になるかに影響を与える。野生型SHCまたは変異型遺伝子を発現し野生型SHCまたは変異型酵素を产生する組み換え宿主細胞微生物は、生物変換反応における使用に好適である生体触媒と呼ばれる。いくつかの態様において、生体触媒は、野生型SHCまたは変異型を产生する組み換え全細胞であるか、またはそれは懸濁液もしくは固定されたフォーマットであり得る。

【0041】

1つの態様においては、生体触媒は、(十分なバイオマスを作り出すために)十分量で产生され、収穫され、生物変換ステップの前に洗浄される(かつ、任意に保存される(例えば凍結または凍結乾燥される))。

さらなる態様においては、細胞は(十分な生体触媒を作り出すために)十分量で产生さ

10

20

30

40

50

れ、次いで、生物変換反応のために生体触媒を収穫および洗浄する必要なく、反応条件が調整される。このワンステップ（または「ワンポット」）方法は、それがコストを減じながらプロセスを単純化するので有利である。細胞を増殖させるために用いられる培養培地は、反応条件が生物変換反応を促進するように調整されている場合には、生物変換反応における使用にもまた好適である。

【0042】

本開示の生物変換方法は、ホモファルネソール原料ストックの(-) - アンブロックスへの変換をもたらすための時間、温度、pH、および可溶化剤の条件下において行われる。反応混合物のpHは、SHC変異型酵素では4～8、好ましくは5から6.5、より好ましくは4.8～6.0の範囲内、野生型SHC酵素では約pH5.0から約pH7.0の範囲内であってもよく、反応混合物への緩衝液の添加によって維持することができる。この目的のための例示的な緩衝液はクエン酸緩衝液である。好ましい温度は約15および約45の間、好ましくは約20および約40の間であるが、これは好熱性生物では、特に好熱性微生物からの野生型酵素が用いられる場合にはより高く、55まであり得る。温度は生物変換プロセスの間は一定に保たれてもよく、または変更されてもよい。

10

【0043】

出願人は、可溶化剤（例えば界面活性剤、洗剤、可溶性増強剤、水混和性有機溶媒等）を生物変換反応中に包含することが有用であり得ることを示している。界面活性剤の例には、Triton X-100、Tween 80、タウロデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、および／またはラウリル硫酸ナトリウム（SLS）が含まれるが、これらに限定されない。

20

出願人は、他のより有用でない可溶化剤の長いリストから、特に有用な可溶化剤として SDSを選択および同定した。特に、出願人は、ホモファルネソールの(-) - アンブロックスへの生物変換反応について反応速度および収率の観点から、例えばTriton X-100よりも顕著に優れた可溶化剤として SDSを同定した。

【0044】

理論によって拘束されることを望むものではないが、組み換え微生物宿主細胞へのSDSの使用は、SDSがSHC酵素（これは膜結合酵素である）をホモファルネソール基質に対してよりアクセス可能にするために、宿主細胞膜と有利に相互作用し得るので有利であり得る。加えて、反応混合物中における好適なレベルでのSDSの包含は、エマルジョン（水中のホモファルネソール）の特性を改善し、および／または宿主細胞内のSHC酵素へのホモファルネソール基質のアクセスを改善し得る一方で、同時に破壊（例えば、野生型SHCまたは変異型酵素の変性／不活性化）を防ぐ。

30

【0045】

生物変換反応に用いられる可溶化剤（例えばSDS）の濃度は、バイオマス量および基質（EEH）濃度によって影響される。すなわち、可溶化剤（例えばSDS）濃度、バイオマス量、および基質（EEH）濃度の間には、ある程度の相互依存性がある。例として、ホモファルネソール基質の濃度が増大すると、効率的な生物変換反応が起こるために十分量の生体触媒および可溶化剤（例えばSDS）が必要とされる。例えば可溶化剤（例えばSDS）濃度が低すぎる場合には、準至適な（suboptimal）ホモファルネソール変換が観察され得る。他方で、例えば可溶化剤（例えばSDS）濃度が高すぎる場合には、生体触媒が無傷の微生物細胞の破壊および／またはSHC/HAC酵素の変性／不活性化のいずれかによって影響されるというリスクが存在し得る。

40

【0046】

バイオマス量および基質（EEH）濃度との関連では、SDSの好適な濃度の選択は、当業者の知識の範囲内である。例として、好適なSDS、基質（EEH）、およびバイオマス濃度を決定するための予測モデルが当業者に利用可能である。

野生型SHC酵素についての生物変換反応の温度は、約45～60、好ましくは55である。

野生型SHC酵素についての生物変換反応のpH範囲は、約5.0から7.0、より好

50

ましくは約5.6から約6.2、さらにはより好ましくは約6.0である。

S H C 変異型酵素についての生物変換反応の温度は、約 34℃ から約 50℃ 、好ましくは約 35℃ である。

S H C 変異型酵素についての生物変換反応の pH は、約 4 . 8 ~ 6 . 4、好ましくは約 5 . 2 ~ 6 . 0 である。

【 0 0 4 7 】

好ましくは、生物変換反応に用いられる可溶化剤は、SDSである。

[SDS] / [細胞] 比は、 E E H ホモファルネソールに対する生体触媒の比が約 2 : 1 であるときに、約 10 : 1 ~ 20 : 1 の範囲内、好ましくは約 15 : 1 ~ 18 : 1 、好ましくは約 16 : 1 である

S H C 変異型酵素についての生物変換反応における SDS 濃度は、ホモファルネソール濃度が E E H 約 125 g / l であり、生体触媒濃度が 250 g / l である（約 175 の O D (650 nm) に対応する）ときに、約 1 ~ 2 % の範囲内、好ましくは約 1.4 ~ 1.7 % の範囲内、さらにはより好ましくは約 1.5 % である。

E EH ホモファルネソール基質に対する生体触媒の比は約 0.5 : 1 ~ 2 : 1 の範囲内、いくつかの態様においては 2 : 1、好ましくは約 1 : 1 または 0.5 : 1 である。

[0 0 4 8]

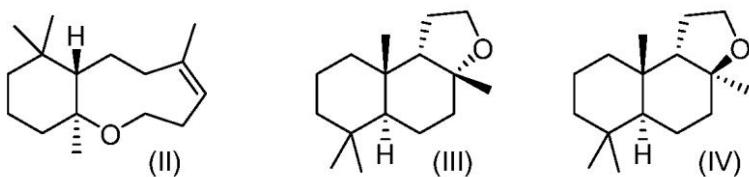
いくつかの態様において、(-) - アンブロックスは、ホモファルネソール基質が加えられる生体触媒を用いて產生される。既知の手段（例えばペリスタポンプ、注入シリジ等）を用いて供給することによって基質を加えることが可能である。ホモファルネソールは油可溶性化合物であり、油フォーマットで提供される。生体触媒が水相に存在するということに鑑みて、生物変換反応は、ホモファルネソールが生物変換反応混合物に加えられるときには2相システムと見なすことができる。これは可溶化剤（例えばS D S）が存在するときでさえも当てはまる。

好適な生物変換プロセスのさらなる詳細は、本明細書下記の例において開示される。

【 0 0 4 9 】

本発明による生物変換プロセスは、所望の(-)-アンブロックス、およびまた多数の副生成物をも含有する反応混合物を产生する。より具体的には、反応混合物は、(-)-アンブロックスに加えて、式(I I)に記載の(-)-アンブロックスの新規構造異性体、ならびに式(I I I)および(I V)に記載の(-)-アンブロックスの既知の立体異性体を含む、副生成物の複雑な混合物を含有する。

【化 2】



[0 0 5 0]

出願人は、いかなる特定の理論に拘束されることも意図しないが、式(II)の化合物は、ホモファルネソールの7E, 3Z-幾何異性体の環化により形成されると考えている。これは、>500ng/1の検知閾値を有し、実際には無臭であると記載される。

上述の通り、出願人は、式(II)の化合物は新規分子であると考えており、そのようにこの化合物は本発明のさらなる側面を形成する。

[0 0 5 1]

化合物(II)からなるもしくはこれを含む香料成分(perfume ingredient)および香料組成物、ならびにこれを含有する芳香品は、本発明の付加的側面を形成する。

高級香水または、パーソナルケア、家庭用ケアおよび繊維ケア組成物などの機能性香料

組成物といった香料用途における、式(II)の化合物の香料成分としての使用は、本発明のさらなる付加的側面を形成する。

(-) - アンブロックスと嗅覚的に許容可能な量の化合物(IV)との混合物は、本発明のまた他の側面を形成する。

【0052】

式(II)の化合物、または他の副生成物(III)もしくは(IV)のいずれか、または実際に本発明の方法に従って形成された(-) - アンブロックスにおける不純物として存在するあらゆる物質との関連において、本明細書において用いられる用語「嗅覚的に許容可能な量」は、化合物または物質が、その匂い検知閾値未満の量で、または(-) - アンブロックスの嗅覚的特性に影響を及ぼすようにはその嗅覚的特徴に寄与しない量で、(-) - アンブロックスとの混合物中に存在することを意味するものと理解される。嗅覚的に許容可能な量のあらゆるそのような化合物または物質を含有する(-) - アンブロックスは、ex - スクラレオールの合成的手順により得られ、Givaudanから入手できる、AMBROFIX(商標)などの、(-) - アンブロックスの市販グレードの匂い特性を有するものとして、熟練したパーカーフューマーに同定可能であろう。10

【0053】

本発明の好ましい態様において、反応混合物は、未反応のホモファルネソールを全く含まないか、または実質的に含まない。

出願人は、ホモファルネソールが、(-) - アンブロックスに対して、ならびに生物変換プロセスの上記副生成物に対して、強力な溶媒であることを発見した。そのように、相当な量のホモファルネソールの存在下では、(-) - アンブロックスおよび副生成物が、扱いにくい粗混合物中で一緒に溶解されたままで残存し、そこから嗅覚的に純粋な形態で(-) - アンブロックスを分離して最終的に単離することは困難で、時間がかかる。(-) - アンブロックスと化合物(II)、(III)および(IV)との混合物中における未反応ホモファルネソールのレベルを減少させることにより、下流のプロセシングおよび(-) - アンブロックスの単離 / 精製がかなり容易になることが見出された。20

【0054】

下流のプロセシングは、当業者により理解される通り、生物変換プロセスにより形成される有用な化合物の製造において、重要な工程である。化合物合成の一部として、その化合物の物理的特性に影響を与える。バイオテクノロジー的方法による香料成分の調製の場合においては、標的化合物の所望の匂い特性が、発酵培地または生体触媒中に存在し得る不純物および副生成物の複雑な混合物の匂いの寄与によってゆがめられないように、標的化合物は、嗅覚的に純粋な形態で反応混合物から分離することができることが望ましい。30

【0055】

したがって、本発明は、別の側面において、化合物(II)、(III)および(IV)の1種以上を含む反応混合物から、(-) - アンブロックスを単離および精製する方法を提供する。

本発明のさらに別の側面においては、化合物(II)、(III)および(IV)の1種以上を含有する反応混合物から、(-) - アンブロックスを分離および精製するステップを含む、(-) - アンブロックスの匂いを改善または増強する方法が提供される。40

【0056】

単離および精製された形態においては、(-) - アンブロックスは、化合物(II)、(III)もしくは(IV)のいずれも含有せず、または、前記化合物のいずれかを含有するとしても、それぞれは、嗅覚的に許容可能な量で存在すべきである。

本明細書における上記のようなプロセスなどの生物変換プロセスから得られる反応混合物は、一般的に、粗(-) - アンブロックスならびに副生成物(II)、(III)および(IV)の1種以上、ならびに細胞原料および / またはその断片を含有する固相；ならびに水および / またはいくらかの未反応ホモファルネソールを含む液相(单数)または液相(複数)、を含む。

【0057】

50

固相は、液相（単数または複数）からろ過または遠心により分離してもよい。さらに、適切な孔サイズを有するフィルターを選択することによって、細胞原料および／または断片から粗（-）-アンブロックスの分離を達成することもまた可能である。一旦、細胞原料および／またはその断片から粗（-）-アンブロックスが分離されれば、化合物（I I）、（I I I）および（I V）から（-）-アンブロックスを単離するさらなる作業手順を経る前に、それは洗浄されてもよい。

【0058】

あるいは、ろ過または遠心の代わりに、（-）-アンブロックスの融点を超える温度まで温め、そうすると、反応混合物は、（-）-アンブロックスが細胞原料および断片を含有する水相の上に油相を形成する。任意に、および（-）-アンブロックスの完全な回収を確実にするため、水性の細胞原料は、（トルエンなどの）水非混和性の有機溶媒により洗浄して、水相に混入している可能性がある残留（-）-アンブロックスを除去することができ、これら洗浄液は油相に合わせることができる。その後、油相は、蒸発により濃縮されて、（-）-アンブロックスならびに副生成物（I I）、（I I I）および（I V）の1種以上を含む粗混合物を提供することができ、この混合物は、次いで（-）-アンブロックスを単離および精製するためのさらなる作業手順を経ることができます。

【0059】

別の態様においては、（-）-アンブロックスを含有する油相を形成するために反応混合物を温める代わりに、反応混合物は、好適な（トルエンなどの）水非混和性の有機溶媒により抽出して、（-）-アンブロックスならびに化合物（I I）、（I I I）および（I V）の1種以上を含有する有機相を形成させることができ、これは、細胞原料および断片を含有する水相から分離することができる。有機相は、蒸発により濃縮して、（-）-アンブロックスならびに化合物（I I）、（I I I）および（I V）の1種以上を含む粗混合物を提供することができ、これは、（-）-アンブロックスを単離および精製するためのさらなる作業手順を経ることができます。

【0060】

さらに別の代替的方法においては、反応混合物は、細胞原料および断片から蒸留物を除去するために蒸気蒸留することができる。蒸留物は、（-）-アンブロックスならびに化合物（I I）、（I I I）および（I V）の1種以上を含む二相性混合物の油相を水相から分離し、次いで（-）-アンブロックスを単離および精製するためのさらなる作業手順を経る前に、二相性混合物として集めることができます。

【0061】

本発明の具体的な態様においては、（-）-アンブロックスを単離および精製する前記方法は、化合物（I I）、（I I I）または（I V）の1種以上を含有する混合物から（-）-アンブロックスを選択的に結晶化するステップを含む。

用語「選択的に結晶化する」は、それによって（-）-アンブロックスは溶媒からの結晶化が生じる一方で、化合物（I I）、（I I I）、および（I V）は、単離された結晶材料が（-）-アンブロックスのみを含有するか、またはそれが化合物（I I）、（I I I）または（I V）のいずれかを含有する場合には、それらは嗅覚的に許容可能な量でしか存在しない程度に、結晶化溶媒中に溶解して残留しているプロセスステップを言う。

【0062】

結晶化は、好適な有機溶媒中において行われ得る。溶媒の選択は、室温および高温におけるまたは煮沸溶媒における溶解度の違いなどの考察；ならびに冷却溶媒における回収可能な結晶量の必要性についての考察に基づく。通常、分離されるべき化合物は、比較的極性である溶媒に溶解しており、次いで、比較的極性の弱い溶媒が添加されて溶解している化合物のその溶解性の限界をもたらすことができ、それにより結晶化が始まることになる。また、工業的プロセスにおいては、費用だけでなく取り扱いの安全性という問題にも関係する。好適な溶媒には、メタノール、アセトン、石油エーテル、ヘキサン、t - ブチルメチルエーテル、T H F および酢酸エチルが含まれるが、これらに限定されない。好ましい溶媒には、トルエンまたはエチルアルコールが含まれる。溶媒の組み合わせもまた、採

10

20

30

40

50

用してよい。

【0063】

本発明の特に好ましい態様においては、選択的結晶化は、温かいメタノールに、(-) - アンブロックスならびに化合物(I I)、(I I I)および(I V)の1種以上を含有する混合物を溶解して、水などの非溶媒を冷却中の当該エタノール溶液にゆっくり加えることで(-) - アンブロックスを選択的に結晶化させることにより、行われる。

(-) - アンブロックスと、それぞれが構造異性体および(-) - アンブロックスの2種の立体異性体である副生成化合物(I I)、(I I I)および(I V)との密接な構造的関係を考慮すると、(-) - アンブロックスがそのような混合物から選択的に結晶化され、高収率で嗅覚的に純粋な形態での(-) - アンブロックスをもたらし得ることは注目すべきことであった。当業者は、化合物が、(-) - アンブロックスと共に結晶化して、下流のプロセシングが、実際に見出されるよりも、はるかにさらに複雑で、時間がかかり、かつ費用がかかるようになることを当然予期するはずである。

10

【0064】

(-) - アンブロックスが、結晶化により化合物(I I)、(I I I)および/または(I V)を含有する混合物から分離される、驚くべき容易な方法は、本発明の際立った優位性を示している。

(-) - アンブロックスが結晶化により分離され得る容易性は、(-) - アンブロックスならびに副生成物(I I)、(I I I)および(I V)の沸点が非常に近いために蒸留などの他の精製技術によって(I I)、(I I I)および/または(I V)を含有する混合物から、(-) - アンブロックスがかかる容易な方法およびかかる高い収率では回収され得ないという観察とは対照的である可能性があった。

20

【0065】

(-) - アンブロックスとの関連において用いられる、用語「嗅覚的に純粋な」は、(-) - アンブロックスが、化合物(I I)、(I I I)もしくは(I V)、または反応混合物中において見出される他のあらゆる材料を含まないことを意味するか、あるいは、かかる化合物または材料が存在する場合には、本明細書においてその語が定義されている通り嗅覚的に許容可能な量でそれらが存在することを意味することが意図される。

本発明の態様において、嗅覚的に純粋な形態での(-) - アンブロックスは、化合物(I I)、(I I I)または(I V)のいずれかを5重量%未満含有する。

30

【0066】

より具体的な態様においては、嗅覚的に純粋な形態の(-) - アンブロックスは、化合物(I I)、(I I I)または(I V)の各々を、4重量%未満、3重量%未満、2重量%未満、1重量%未満、0.9重量%未満、0.8重量%未満、0.7重量%未満、0.6重量%未満、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満もしくは、0.05重量%未満含有する。

化合物(I I)、(I I I)および/または(I V)を含有する混合物からの選択的結晶化による(-) - アンブロックスの分離の質は、それが分離される混合物の組成により影響され得る。より具体的には、化合物(I I)、(I I I)および/または(I V)の混合物からの結晶化による(-) - アンブロックスの分離の質は、(-) - アンブロックスの混合物中における他の化合物(I I)、(I I I)および/または(I V)に対する重量比が、70:30、より具体的には80:20、より具体的には90:10、さらにより具体的には95:5、およびさらにより具体的には97:3より大きい場合に、改善された。

40

【0067】

さらに、結晶化による(-) - アンブロックスの分離の質は、それが分離される混合物中に存在する未反応ホモアルネソールの量に影響され得る。より具体的には、分離の質は、(-) - アンブロックスが結晶化されて分離される混合物の重量に基づき、未反応ホモアルネソールのレベルが、30重量%未満、より具体的には20重量%未満、より具体的には10重量%未満、より具体的にはさらに5重量%未満、およびより具体的にはさ

50

らに3重量%未満、より具体的にはさらに2重量%未満、およびより具体的にはさらに1重量%未満である場合に、改善される。

【0068】

好ましくは、本発明の生物変換プロセスにおいて用いられる試薬および反応条件は、反応が、ホモファルネソールの100%の変換を進めまたは実質的にそのように変換を進め、したがって、反応混合物においては未反応ホモファルネソールは残らないようにするものである。しかしながら、未反応ホモファルネソールが存在する場合には、経済的に不利ではあるが、例えば蒸留などによって(-)-アンブロックスおよび他の副生成物からそれを分離することができる。

【0069】

したがって、本発明の具体的な態様においては、化合物(II)、(III)および(IV)の1種以上を含む混合物から(-)-アンブロックスを単離および精製する方法であって、この混合物がホモファルネソールを含まない、または実質的に含まない、前記方法が提供される。

より具体的な態様においては、化合物(II)、(III)および(IV)の1種以上を含み、ホモファルネソールを含まない、または実質的に含まない混合物からの(-)-アンブロックスの単離および精製は、(-)-アンブロックスの選択的結晶化により達成される。

【0070】

本発明の方法により得られる(-)-アンブロックスは、嗅覚的に純粋な形態で得られる。嗅覚的に純粋な(-)-アンブロックスは、本発明の別の側面を形成する。

結晶形態の(-)-アンブロックスは、本発明のさらに別の側面を形成する。

本発明の方法にしたがって形成される(-)-アンブロックスは、1種以上のさらなる香料成分と混合して、高級香水における使用ならびに、パーソナルケア、繊維ケアおよび家庭用ケア製品などの消費者製品における使用を含む、香料製品における使用を満たす香料組成物を形成してもよい。

【0071】

したがって、本発明は、別のその側面において、(-)-アンブロックスおよび少なくとも1種の他の香料成分を含む香料組成物を提供し、前記香料組成物は、嗅覚的に許容可能な量の、化合物(II)、(III)または(IV)の1種以上を含有する。

本発明は、下記例を参照してさらに説明されるであろう。

【0072】

例

例1：

ホモファルネソールの調製

一般的な分析条件：

非極性GC/MS：50 / 2分、20 / 分200、35 / 分270。HP 7890AシリーズGCシステムを有するGC/MSアジレント5975C MSD。非極性カラム：SGEからのBPX5、5%フェニル95%ジメチルポリシロキサン0.22mm×0.25m m×12m。キャリアガス：ヘリウム。インジェクター温度：230。スプリット1：50。フロー：1.0ml/分。トランスマッパー：250。MS - 四重極型：106。MSソース：230。

【0073】

A) THF中のMNUの調製

水(400ml)中の尿素(175g、2.9mol)およびメチルアミン塩酸塩(198g、2.9mol)の溶液を攪拌下において3.5時間、加熱還流(105)する。40で、水(200ml)中に溶解したNaNO₂(101g、1.45mol)を加える。15分後に、THF(1000ml)を加え、これは透明な二相性混合物をもたらす。濃H₂SO₄(110g、1.1mol)を0~5で加え、1.5時間以内で攪拌する。0~5でのさらなる0.5時間後に、2つの透明な相が25で分離する。有

10

20

30

40

50

機相 (A) (1065 ml、理論上は1.35 M) は0~5℃で数日間保存するか、または直ちにシクロプロパン化反応容器に進む。

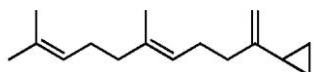
【0074】

相分離の後に、水相を THF によって2回抽出する(2×1 L)。これにより 1100 ml の相Bおよび1075の相Cが得られる。相Aは、引き続くシクロプロパン化反応において末端アルケンのシクロプロパンへの51%の変換を生じる一方で、相Bは<0.5%のシクロプロパンを生じ、相Cは検出可能な変換を生じない。我々は、>99%のMNUが最初の相分離の後に抽出されると結論づける。したがって、通常は、水相を、濃KOH水溶液および酢酸による処理後の(有機相Aからの)最初の相分離の後に捨てる。

【0075】

B) THF 中のMNUを用いるE- ファルネセンの調製

【化3】



THF (136 ml、184 mmol) 中のN-メチル-N-ニトロソウレア 1.35 M を、0℃において、0~5℃のE-ベータ-ファルネセン (CAS 18794-84-8) (25 g、122 mmol) およびKOH水溶液 (50 ml、40%) の激しく攪拌した混合物に滴下添加する。4 ml のMNU溶液を添加後に、0.5 ml ジクロロメタン中に予め溶解したPd(acac)₂ (7.4 mg、0.024 mmol、0.02%) を添加する。残りのMNU溶液を0~5℃で4時間かけて添加する。この段階におけるGCは、28%の未変換E-ベータ-ファルネセン、65%の所望のモノシクロプロパン(上に示されている)、および3%のビスシクロプロパン化された化合物5を示した。

25℃での16時間後に、酢酸 (100 ml) を0~5℃で添加し、次いでtert-ブチルメチルエーテル (250 ml) を添加する。相分離の後に、有機相を2 MのHCl (250 ml) によって洗浄し、水相をtert-ブチルメチルエーテル (250 ml) によって抽出する。組み合わせた有機層を水 (2×100 ml)、10%NaOH水溶液 (2×100 ml)、および水 (2×100 ml) によって洗浄し、MgSO₄によって乾燥して、濾過し、濃縮してやや黄色の液体 26.9 gを得る。これは、9%のE-ベータ-ファルネセン、82%の所望のモノシクロプロパン化合物、および6%のビスシクロプロパン化された副生成物を含有する。

【0076】

所望の化合物は、蒸留精製によってさらに単離され得る。

1 g のK₂CO₃ (1 g) の添加および40~60 mbarでの30 cmスチールコイルカラムによる蒸留により、147 g のモノシクロプロパン化合物 (68%corr) を135~145℃で得る。画分をプールして、純度100%のモノシクロプロパン化合物 92 gを得る。

【0077】

E- ファルネセンの分析データ：

1H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 5.1 (2 m, 2 H), 4.6 (2 H), 2.2 (2 H), 2.1 (4 H), 2.0 (2 H), 1.7 (s, 3 H), 1.6 (2 s, 6 H), 1.3 (1 H), 0.6 (2 H), 0.45 (2 H) ppm. 13C-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 150.9 (s), 135.1 (s), 131.2 (s), 124.4 (d), 124.1 (d), 106.0 (t), 39.7 (t), 35.9 (t), 26.7 (t), 25.7 (q), 17.7 (q), 16.0 (d), 6.0 (t) ppm. GC/MS: 218 (2%, M+), 203 (5%, [M - 15]+), 175 (11%), 147 (31%), 134 (15%), 133 (20%), 121 (12%), 107 (55%), 95 (16%), 93 (30%), 91 (20%), 82 (11%), 81 (33%), 79 (42%), 69 (100%), 67 (22%), 55 (20%), 53 (21%), 41 (75%). IR (フィルム): 3081 (w), 2967 (m), 2915 (m), 2854 (m), 1642 (m), 1439 (m), 1377 (m), 1107 (w), 1047 (w), 1018 (m), 875 (s), 819 (m), 629 (w). C16H26の分析計算値: C, 88.00; H, 12.00. 結果: C, 87.80; H, 12.01.

10

20

30

40

50

【0078】

C) (7E)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オール((7E)-ホモファルネソール)の調製

圧力管内における(E)-(6,10-ジメチルウンデカ-1,5,9-トリエン-2-イル)シクロプロパン(E-ファルネセン)(1g、4.6mmol)、ドデカン(0.2g、1.15mmol、内部標準)、およびL-(+)-酒石酸(1g、6.9mmol)の混合物を攪拌下において150度加熱する。18時間および(GCによる)完全な変換の後に、混合物を水(50ml)およびトルエン(50ml)に注ぐ。相を分離し、水相をトルエン(50ml)で抽出する。組み合わせた有機層を濃Na₂CO₃水溶液(50ml)および濃NaCl(2×50ml)で洗浄し、MgSO₄によって乾燥して、濾過し、減圧下で蒸発させることにより、茶色がかった樹脂(1.35g)を得る。これを30%KOH水溶液(4.3ml)と混合し、25度2時間攪拌する。GC分析により、内部標準に従って96%の(7E)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オールの形成が明らかになる。E/Z比68:22。E異性体の分析データは文献からのものと一致している。例えばP. Kocienski, S. Wadman J. Org. Chem. 54, 1215 (1989)を参照。

10

【0079】

例2SHCプラスミド調製および生体触媒產生SHCプラスミド調製

20

アリシクロバチルス・アシドカルダリウス スクアレン-ホペン環化酵素(AacSHC)(GenBank M73834, Swissprot P33247)をコードする遺伝子を、プラスミドpET-28a(+)に挿入した。そこでは、それは大腸菌によるタンパク質產生のためのIPTG誘導性T7プロモーターの制御下にある。プラスミドを標準的なヒートショック形質転換プロトコールを用いて大腸菌株BL21(DE3)に形質転換した。

【0080】

エルレンマイヤーフラスコ培養

タンパク質產生のためには、富栄養培地(LB培地)または最少培地いずれかを用いた。M9は最少培地の一例であり、これを用いて成功した。

【0081】

30

培地調製

デフォルトとして選んだ最少培地は、350ml培養のために下記のように調製した：35mlクエン酸/リン酸ストック(KH₂PO₄ 133g/l、(NH₄)₂HPO₄ 40g/l、クエン酸·H₂O 17g/g、pHは6.3に調整)にH₂O 307mlを加え、pHは必要に応じて32%NaOHで6.8に調整した。50%MgSO₄ 0.850mlをオートクレーブした後に、微量元素溶液(次項の組成物)溶液0.035ml、チアミン溶液0.035ml、および20%グルコース7mlを加えた。

【0082】

SHC生体触媒產生(生体触媒產生)

小スケールの生体触媒產生(野生型SHCまたはSHC変異型)、350ml培養(培地に50μg/mlカナマイシンを補った)は、SHC產生プラスミドを含有する大腸菌株BL21(DE3)の前培養から植菌した。細胞は、一定の攪拌(250rpm)をしながら37度およそ0.5の光学密度(OD_{650nm})まで増殖させた。

40

次いで、300μMの濃度までIPTGを添加することによってタンパク質產生を誘導し、続いて一定の振盪をしながらさらなる5~6時間のインキュベーションをした。得られたバイオマスは最終的に遠心によって集め、50mMのTris-HCl緩衝液pH7.5によって洗浄した。細胞はさらなる使用まで4または-20度ペレットとして保存した。一般的に、用いた培地とは関係なく、培養1リットルから、2.5から4グラムの細胞(湿重量)が得られた。

【0083】

50

発酵を調製し、750 ml の Infors HT 反応容器内で実施した。発酵容器に脱イオン水 168 ml を加えた。反応容器には全ての必要なプローブ (pO₂、pH、サンプリング、消泡剤)、C + N フィード (feed) および水酸化ナトリウムのボトルを装備し、オートクレーブした。オートクレーブ後、反応容器に下記成分を加える：

20 ml 10 × リン酸 / クエン酸緩衝液
 14 ml 50 % グルコース
 0.53 ml MgSO₄ 溶液
 2 ml (NH₄)₂SO₄ 溶液
 0.020 ml 微量元素溶液
 0.400 ml チアミン溶液
 0.200 ml カナマイシンストック。

10

【0084】

反応条件は下記の通り設定する：pH = 6.95、pO₂ = 40 %、T = 30 °C、300 rpm で攪拌。カスケード：300 での rpm セットポイント、最少 300、最大 1000、フロー L / 分 セットポイント 0.1、最少 0、最大 0.6。消泡剤コントロール：1 : 9。

種培養から、0.4 ~ 0.5 の OD_{650 nm} になるよう発酵槽に植菌した。この種培養を LB 培地 (+ カナマイシン) 中で 37 °C、220 rpm で 8 時間増殖させた。発酵は最初にバッチモードで 11.5 時間実施し、その後にフィード溶液 (滅菌グルコース溶液 143 ml H₂O + 35 g グルコース)、これには、滅菌後、(NH₄)₂SO₄ 溶液 17.5 ml、MgSO₄ 溶液 1.8 ml、微量元素溶液 0.018 ml、チアミン溶液 0.360 ml、カナマイシンストック 0.180 ml が添加されていた) による C + N フィードを開始した。およそ 4.2 ml / 時間の一定の流速でフィードを実施した。グルコースおよび NH₄⁺ 測定が外部からなされ、培養物中の C および N 源の利用可能性を評価した。通常は、グルコースレベルは非常に低いままである。

20

【0085】

培養物は合計およそ 25 時間増殖させ、そこでそれらは典型的には 40 ~ 45 の OD_{650 nm} に達した。次いで、(IPTG パルスとして、または注入シリジ用いて 3 ~ 4 時間かけて) 発酵槽に IPTG をおよそ 1 mM の最終濃度になるように添加し、温度を 40 °C および pO₂ を 20 % に設定することによって SHC 産生を開始した。SHC 産生の誘導は 40 °C で 16 時間続いた。誘導終了時、細胞は、遠心によって集め、0.1 M クエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.4 で洗浄し、さらなる使用まで -20 °C でペレットとして保存した。

30

【0086】

結果 1 a

一般的に、産生された生体触媒の特異的活性は、全ての他の条件が不变である状態では、富栄養培地と比較して最少培地を用いたときにより高かった。誘導は 30 または 37 °C で成功した。誘導が 40 ~ 43 °C でなされたときには、より高い特異的活性の生体触媒が得られるということが着目された。

【0087】

40

結果 1 b

下記表 1 は、2 つの例について、誘導開始および誘導終了の両方における培養体積、光学密度、および細胞の量と、集められたバイオマスの量（湿重量）とを示している。

【表1】

表1

	体積 誘導開始 (ml)	OD _{650nm} 誘導開始	計算された 細胞 (g)	体積 誘導終了 (ml)	OD _{650nm} 誘導終了	集められた 細胞 (g)
例1	273	40	10.9	342	55	28
例2	272	44	12.0	341	57	23

植菌時のOD_{650nm}: 0.45(例1)および0.40(例2)。開始体積: 205ml。

10

【0088】

野生型 S H C アミノ酸配列 (配列番号 1) (GenBank M73834, Swissprot P33247)
MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDR
DRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFI
QSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPPEIMFLGKRMPLNIYEFGSWARATVV
ALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRGAKGWIFDALDRALHGYQKLSVH
PFRRRAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMDTQHPAFIKGWEGLELY
GVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLDRQITVPGDW
AVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRDAMTKGFRWIVG
MQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPSEDTVTAHVLECFGSGFYDDAWKV
RRAVEYLKREQKPDGSWGRGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQH
QNPDGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAARRGVQYLVET
QRPDGGWDEPYYTGTGFPDFYLGTYMRHVFPTLALGRYKQAIERR

20

【0089】

変異型 F601Y S H C アミノ酸配列 (配列番号 2) - 配列番号 1 に関する変異型
MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDR
DRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFI
QSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPPEIMFLGKRMPLNIYEFGSWARATVV
ALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRGAKGWIFDALDRALHGYQKLSVH
PFRRRAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMDTQHPAFIKGWEGLELY
GVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLDRQITVPGDW
AVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRDAMTKGFRWIVG
MQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPSEDTVTAHVLECFGSGFYDDAWKV
RRAVEYLKREQKPDGSWGRGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQH
QNPDGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAARRGVQYLVET
QRPDGGWDEPYYTGTGYPDFYLGTYMRHVFPTLALGRYKQAIERR

30

【0090】

変異型 F605W S H C ヌクレオチド配列 (配列番号 3)
ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCGCCGGCCTACGCGCGACGCTGGATCGCGCGGTGGA
GTATCTCCTCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGCCGCTCTGAGCAACG
TCACGATGGAAGCGGAGTACGTCTCTTG GCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGAT
CGCATGGAGAAGATCCGGCGTACCTGTTGCACGAGCAGCGCAGGGACGGCACGTGGC
CCTGTACCCGGGTGGGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGGCGTACGTCGCGCTCA
AGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGGAGCCATGAGAAGGCCTCCGGTTCAATT
AGCCAGGGCGGGATCGAGTCGCGCGTGTTCACGCGGATGTGGCTGGCGCTGGTGG
AGAATATCCGTGGAGAAGGTGCCATGGTCCC GCCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGC
GCATGCCGCTAACATCTACGAGTTGGCTCGTGGCTCGGGCGACCGTCGTCGGCGCTC
TCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTCCCGCTGCCGAGCGGGCGCGTGGCGCTC
GCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCCGGCGGGTGCCAAGGGAGGGGGTGGGTGGA
TCTTCGACGCGCTCGACCGGGCGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTCGGTGCACCGTTC
50

CGCCGCGCGGCCGAGATCCGCGCCTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGG
 CAGCTGGGGCGGGATTCAAGCCGCCTGGTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCG
 ACATGACGCAGCATCCGGCGTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTG
 GAGCTGGATTACGGAGGATGGATGGTTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGG
 CCTCGCCGTGCTCGCGCTCGCGCTGCCGGCTTCCGGCCGATCACGACCCTGGTCA
 AGGCAGGGCGAGTGGCTGGACCGGCAGATCACGGTCCGGCGACTGGCGGTGAAG
 CGCCCGAACCTCAAGCCGGCGGTTCGCGTCCAGTCAGACAAACGTGTACTACCCGGA
 CGTGGACGACACGGCGTCGTGGTGTGGCGCTAACACCCCTGCCTGCCGGACGAGC
 GCCGCAGGCAGGGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTCGGCATGCAGAGCTCG
 AACGGCGGTTGGGGCGCTACGACGTCGACAACACGAGCGATCTCCGAACCACATCCC
 GTTCTCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGCCGTAGAGGACGTACCGCCCCACGTGC
 TCGAGTGTTCGGCAGCTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGTATCCGGCGCGGGTG
 GAATATCTCAAGCGGGAGCAGAACGCCGGACGGCAGCTGGTCGGTGGGCGTCAA
 TTACCTCTACGGCACGGCGCGGTGGTGTGGCGCTGAAGGCGGTGGGATCGACACGC
 GCGAGCCGTACATTCAAAGGCCTCGACTGGTCGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGC
 GGCTGGGCGAGGACTGCCGCTCGTACGAGGATCCGGCTACGCGGGTAAGGGCGGAG
 CACCCCGTCGAGACGCCCTGGCGCTGATGGCGCTCATCGCGGGCGCAGGGCGGAGT
 CCGAGGCCGCGCGCCGCGGTGCAATACTCGTGGAGACGCAGCGCCCCGGACGGCGG
 TGGGATGAGCCGTACTACACGGCACGGCTCCAGGGATTGGTACCTCGGCTACAC
 CATGTACCGCCACGTGTTCCGACGCTCGCGCTCGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGC
 GCAGGTGA

【0091】

変異型 F 6 0 5 W S H C アミノ酸配列（配列番号 4）- 配列番号 1 に関しての変異型
 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDR
 DRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFI
 QSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPPEIMFLGKRMLPNIYEFGSWARATVV
 ALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRGAKGGGWIFDALRALHGYQKLSVH
 PFRRRAEIRALDWLLERQAGDSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPAFIKGWEGLELY
 GVLEDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGDW
 AVKRPNLKPGGFAFQFDNVYPDVDDTAVVWALNTLRPDERRRDAMTKGFRWIVG
 MQSSNGGWAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPSEVDV р VLECFGSGFYDDAWKVI
 RRAVEYLKREQKPDGSWFGRGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQH
 QNPDGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAARRGVQYLVET
 QRPDGGWDEPYYTGTGFPGDWYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

【0092】

例3

7 E , 3 E / Z - ホモファルネソール混合物の生物変換

下記反応条件を用いて生物変換を行った：

反応（合計体積 150 . 1 g ）は、合計ホモファルネソール 146 g / l を含有する Infor sHT 750 ml 発酵槽において、0 . 1 M クエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 5 . 4 中で、86 : 14 の 7 E , 3 E : 7 E , 3 Z の混合物であるホモファルネソール基質、細胞 250 g / l (例 2 の方法に従って形成された、発酵) 、および SDS 1 . 55 % を用いて実施した。反応は 35 で一定の攪拌 (900 rpm) をしながら実施し、pH コントロールは水中の 10 から 40 % クエン酸を用いて行った。

反応混合物は、下記の例 4 に記載の単離および精製ステップに処された。

【0093】

例4下流のプロセシング手順

7 E , 3 E / Z - ホモファルネソール (86 : 14 3 E : 3 Z) の生物変換から形成された反応混合物は、蒸気蒸留に処された。蒸留物は、二相性混合物として集められた。

10

20

30

40

50

有機相は保持し、水相は捨てた。有機相の組成物は、GCにより分析し、結果は、下の表2に示す（「粗」参照）。

次いで、有機相を、乾燥により濃縮した。その後、エタノールを粗乾燥生成物に加え、生成物が溶解するまで混合物を温めた。室温の水をゆっくりと加え、ときおり攪拌し、氷浴で冷却しながら（-）-アンブロックスを結晶化させる。

【0094】

表2は、結晶化された生成物についてのGC分析結果を示す。データは、結晶化されたサンプルにおいて見出された副生成物（a）、（b）または（c）が実際に含まれない（-）-アンブロックスの濃い濃縮を示す。

表2における「a」、「b」および「c」は、それぞれ化合物（II）、化合物（IV）および化合物（III）を言うことに着目すべきである。「EZH」および「EEH」は、それぞれ7E, 3Z-ホモファルネソールおよび7E, 3E-ホモファルネソールを言う。

【表2】

表2

	ピーク面積(GC)						(-)-アンブロックス(%)
	a	b	c	(-)-アンブロックス	EZH	EEH	
粗	215073	190376	588769	6751605	13429	14184	86.9
結晶化	10088	8951	64625	9032941	0	0	99.1

【0095】

例5

反応プロセスの固相の抽出：

（-）-アンブロックスが水に可溶性ではなくかつおよそ75未満の温度で液体ではないということを考慮すると、これらの特性は、水混和性溶媒（例えばエタノール）および水非混和性溶媒（例えばトルエン）のいずれかを用いて生体内変換の固相から生成物を抽出するための潜在的利点と考えられた。

【0096】

200m1の反応プロセスを遠心して液体（水）相から固体を分離した（Sorvall GS3、5000rpm、10分、10）。これにより、およそ80m1の固体ペレットをおよそ120m1の液相から分離した。MTBE抽出後の水相の分析（ガスクロマトグラフィー）は、それが初期に反応プロセス200m1中に存在する（-）-アンブロックスのおよそ0.3%以下を含有するということを示した。トルエンおよびエタノール99%を固相から（-）-アンブロックスを抽出するために用いた。

【0097】

トルエン抽出：

固相80m1を、45m1トルエン（固相体積のおよそ1/2、30秒の激しい振盪、遠心（Sorvall GS3、5000rpm、10分、10）によって6×抽出した。溶媒相をその（-）-アンブロックス含量についてGCにより分析した。反応プロセス中に初期に存在する（-）-アンブロックスの99.5%超が、1.35×初期全反応プロセス体積（200m1）または3.4×固相体積という合計トルエン体積に相当する6回の抽出によって抽出された。

【0098】

エタノール抽出：

固相80m1をおよそ160m1（2倍体積）の99%エタノールによって抽出し（Inf

10

20

30

40

50

ors Multifors HT、35°、1000 r p m、30分)、次に遠心をした。(-)-アンブロックスは抽出手順の間に結晶化しなかった。4回の洗浄(合計640 mlのエタノール、すなわち3.2×全初期反応プロセス体積または8×固相の体積)の後に、反応プロセス中に初期に存在したアンブロックスの約99%が回収された。最初の抽出ステップにおいて(-)-アンブロックスの結晶化を防ぐために十分なエタノールが必要とされる(エタノールに可溶性)。固相の1または1/2倍体積のみを最初の抽出ステップに用いたときには、べたついたペーストが得られ、これは取り扱うことが困難であり、(-)-アンブロックスは遠心の間にペレット上の針状体として結晶化した。温度は、この結晶化の原因となる因子ではないようであった(抽出および遠心は室温およびおよそ35°~40°で試験した)。

10

【0099】

エタノール相中の(-)-アンブロックス濃度および液相のエタノール/水比(固相の残留水分)は、結晶形成の原因となるように見えた。しかしながら、エタノールの体積を固相の1倍体積まで減ずることが可能であるということが着目された。

【0100】

(-)-アンブロックスは室温では液相に存在しないので、これはバイオマスと共に分離し、有機溶媒(例えば、水混和性溶媒(例えばエタノール)または水非混和性溶媒(例えばトルエン))で抽出することができる。(-)-アンブロックスを反応混合物の固相に分離する遠心ステップは、それが(-)-アンブロックスを抽出するために必要とされる溶媒の量を減ずるので有利である。

20

【0101】

例6

官能分析

目的:「粗」材料中および「結晶化された」材料中において形成された(-)-アンブロックスならびに化合物(I I)、(I I I)および(I V)の官能分析を行うこと。

E,E-ホモファルネソールの生体内変換は、(-)-アンブロックスおよび化合物(I V)をもたらす。

E,Z-ホモファルネソールの生体内変換は、マクロ環エーテル化合物(I I)およびエピ-アンブロックス化合物(I I I)をもたらす。

(-)-アンブロックスの粗混合物は、それぞれ87.1重量%、2.8重量%、2.5重量%、および7.6重量%の量で存在する、所望の(-)-アンブロックス、化合物(I I)、(I I I)および(I V)を含む。

30

【0102】

粗混合物が選択的に結晶化された場合(実験室規模)、結晶化された材料は、粗混合物と同じ構成成分を有するが、それぞれ99.1重量%、0.1重量%、0.1重量%、および0.7重量%の量で存在する。

官能分析結果は下記の通りであった:

(-)-アンブロックス:匂い閾値 0.2 ng / l。

化合物(I V):弱い、IsoE、ウッディー、GC検出閾値 5~10 ng。

化合物(I I):「無臭」(GC閾値 > 500 ng)。

40

化合物(I I I):(-)-アンブロックスよりも約10×高いGC閾値(およそ2 ng)。

【0103】

結論

3つの副生成物(化合物I I、I I I、およびI V)の官能分析は、(-)-アンブロックスからのものよりも弱い匂いを示す。

事実、エピ-アンブロックス(化合物I I I)の匂いは、(-)-アンブロックスよりも約10倍弱く、それが本質的に無臭であるということを示唆している。

【0104】

例7

50

蒸気抽出によるアンブロックス回収

(蒸気抽出した) 粗(-) - アンブロックスおよび結晶化した(-) - アンブロックスについて得られた純度

E E : E Z - ホモファルネソール 8 6 : 1 4 の生体内変換は、水蒸気抽出する反応混合物をもたらした。蒸気蒸留物は、二相性混合物として集められた。有機相を保持し、水相を捨てた。有機相の組成を G C によって分析し、結果を下の表に示した(「粗」参照)。次いで、有機相を乾燥状態まで濃縮した。次に、粗乾燥生成物にエタノールを添加し、混合物を生成物が溶解するまで温めた。室温で水をゆっくり添加し、ときおり攪拌し、氷浴で冷却しながら(-) - アンブロックスを結晶化させる。

【0105】

表のデータはまた、蒸気抽出 / 蒸留ステップの後に得られた生成物(「粗」)および結晶化した生成物((-) - アンブロックス)についての G C 解析結果をも示している。表における「E Z H」および「E E H」への言及は、それぞれ(3 Z , 7 E) ホモファルネソールおよび 7 E , 3 E ホモファルネソールを言う。

下の表データは、特定の出発材料(E E H : E Z H 8 6 : 1 4)が、W T S H C または S H C 誘導体を用いて所望の最終生成物(-) - アンブロックスおよび副生成物(I I 、I V 、および I I I)の極めて特異的な混合物を产生するということを示している。選択的結晶化のデータは、実際に、副生成物(I I)、(I V)または(I I I)が結晶化したサンプル中において見出されることがない状態で、(-) - アンブロックスの濃い濃縮を示している。従って、この E E : E Z 混合物は、比較的単純明解で費用対効果の高いように選択的に結晶化される嗅覚的に純粋な(-) - アンブロックス生成物を提供する。

【0106】

【表3】

表: 結晶化した生成物についての G C 解析結果を示す。

	ピーク面積(GC)						アンブロックス (%)
	(II)	(IV)	(III)	アンブロックス	EZH	EEH	
粗	215073	190376	588769	6751605	13429	14184	86.9
結晶化	10088	8951	64625	9032941	0	0	99.1

10

20

30

【0107】

蒸気抽出 / 濾過は(-) - アンブロックスを単離するための環境親和性の方法である。なぜなら、これは、便利な、溶媒を含まない(-) - アンブロックスの単離を提供し、生体触媒の不活性化を伴うからである。

生物変換反応を用いて產生された(-) - アンブロックスは、溶媒を用いて全反応混合物から(例えば、水非混和性溶媒を用いて、または蒸気抽出 / 蒸留によって、または濾過によって) または固相から(例えば水混和性溶媒を用いて) 、当業者に既知である方法を用いて抽出され得る。

【配列表】

0007246133000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 12 N 15/00 Z N A

(56)参考文献

国際公開第2013 / 156398 (WO , A1)
米国特許出願公開第2013 / 0273619 (US , A1)
特開2000 - 198778 (JP , A)
特表2012 - 528578 (JP , A)
特開2009 - 060799 (JP , A)
Journal of the American Chemical Society , 20
02年 , 124 (14) , 3647 - 3655
Tetrahedron , 1987年 , 43 (8) , 1871 - 9

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C07D
REGISTRY (STN)
Caplus (STN)