

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7633156号
(P7633156)

(45)発行日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(24)登録日 令和7年2月10日(2025.2.10)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 317/62 (2006.01)

C 0 7 D 317/62

C S P

C 0 7 K 2/00 (2006.01)

C 0 7 K 2/00

Z N A

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/00

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/48 (2006.01)

C 1 2 N 9/48

請求項の数 2 (全122頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-521504(P2021-521504)

(86)(22)出願日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(65)公表番号 特表2022-505464(P2022-505464
A)

(43)公表日 令和4年1月14日(2022.1.14)

(86)国際出願番号 PCT/GB2019/053023

(87)国際公開番号 WO2020/084307

(87)国際公開日 令和2年4月30日(2020.4.30)

審査請求日 令和4年10月17日(2022.10.17)

(31)優先権主張番号 1817444.1

(32)優先日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

前置審査

(73)特許権者 518160355

ユナイテッド キングダム リサーチ ア
ンド イノベーションイギリス国 エスエヌ2 1エフエル ウ
ィルトシャー スウィンドン ノース ス
ター アヴェニュー ポラリス ハウス

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

最終頁に続く

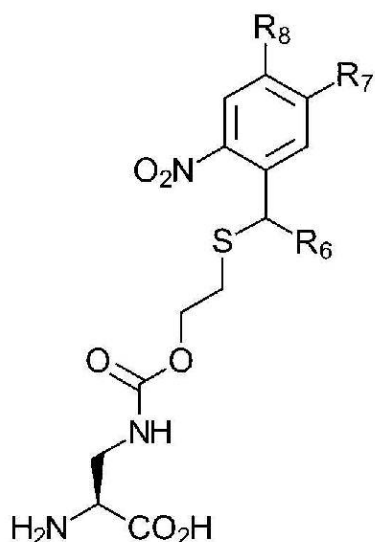
(54)【発明の名称】 方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

非天然アミノ酸が、下記式

【化 1】



(式中、 R_6 は、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 CO_2H 、 CO_2R' 、 SO_2R' 、 G_{5-20} アリール、 C_{3-20} ヘテロアリール、 $NHC(O)R'$ 及び NHR' から選択され、

R_7 及び R_8 は、 H 、 OH 、 $O(C_{1-6}$ アルキル)、 $O(C_{5-20}$ アリール) 及び $O(C_{3-20}$ ヘテロアリール) から独立して選択されるか、又は R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成し、

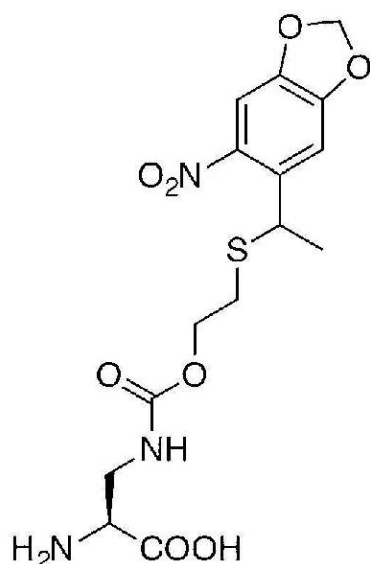
各 R' は、 G_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル 及び C_{5-20} アリール から独立して選択される)

を有する、非天然アミノ酸又はその塩、溶媒和物、互変異性体、構造異性体以外の異性体若しくは混合物。

【請求項 2】

非天然アミノ酸が、下記式

【化 2】



を有する、請求項 1 に記載の非天然アミノ酸又はその塩、溶媒和物、互変異性体、構造異性体以外の異性体若しくは混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリペプチドへの 2, 3-ジアミノプロピオン酸 (DAP、2,3-diamino propionic acid) の遺伝的組込み、DAP を含む非天然アミノ酸、DAP を含む非天然アミノ酸を tRNA にチャージするための tRNA シンテターゼ、並びに得られるポリペプチドを、例えば、酵素反応における基質及び／又は中間体の捕捉において、使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの酵素は、酵素活性部位のセリン又はシステイン側鎖に結合した共有結合中間体を介して進行する反応を行う (Holliday, G.L., Mitchell, J.B.O. & Thornton, J.M. Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. Journal of molecular biology 390, 560-577 (2009))。ヒドロキシル又はスルフィドリル基と基質中のカルボニル基との反応によって、活性化エステル又はチオエステル中間体が形成され、これは、選択された求核剤とのさらなる反応を介して急速に生成物に変換される。チオエステル及びエステルの半減期は通常、数分～数時間である (Yang, W. & Drueckhammer, D.G. Understanding the relative acyl-transfer reactivity of oxoesters and thioesters: computational analysis of transition state delocalization effects. Journal of the American Chemical Society 123, 11004-11009 (2001)) ので、これらの重要なアシル-酵素中間体を単離して特徴付けることは困難である。

【0003】

これらの中間体を安定的に捕捉する戦略により、ネイティブ基質 (native substrate) の同定、並びに他の方法では定義が難しい中間体及び機能状態の特徴付けが可能になる。公知のアプローチでは、カルボニル基の求電子置換を有する基質類似体を使用して、アシル-酵素中間体の類似体を捕捉することができる (Liu, B., Schofield, C.J. & Wilmoth, R.C. Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. Journal of Biological Chemistry 281, 24024-24035 (2006)、Ngo, P.D., Mansoorabadi,

S.O. & Frey, P.A. Serine Protease Catalysis: A Computational Study of Tetrahedral Intermediates and Inhibitory Adducts. *J Phys Chem B* 120, 7353-7359 (2016)、Cleary, J.A., Doherty, W., Evans, P. & Malthouse, J.P.G. Quantifying tetrahedral adduct formation and stabilization in the cysteine and the serine proteases. *Bba-Proteins Proteom* 1854, 1382-1391 (2015))。他の公知の場合には、酵素活性部位の変異が、そのアシル-酵素中間体の安定化を可能にし得る (Scaglione, J.B. et al. Biochemical and structural characterization of the tautomycin thioesterase: analysis of a stereoselective polyketide hydrolase. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 5726-5730 (2010))。これらのアプローチは貴重な洞察を提供したが、基質類似体の合成を必要とし、非ネイティブ活性部位又は非ネイティブ基質との複合体をもたらす、これがこれらの技術の欠点となっている。ユビキチン分野では、E2の重要なシステイン残基をリジンで置き換え、ユビキチンのC末端にアミド結合を作ることが可能であり；これが、タンパク質ユビキチン化経路への多くの洞察をもたらした (Cappadocia, L. & Lima, C.D. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 118, 889-918 (2018)、Plechanovova, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H. & Hay, R.T. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 489, 115-U135 (2012))。しかし、このコンジュゲーションは通常、高いpHを必要とし、得られる置換はイソステリック(isosteric)とは言い難く、これがこのアプローチの欠点となっている。したがって、この戦略は、アシル-酵素中間体を介して進行するほとんどの酵素クラスへの適用が好適でなく、これは、当技術分野における課題である。

10

20

【0004】

アシル-酵素中間体は、酵素中のシステイン又はセリン残基のスルフヒドリル又はヒドロキシ側鎖と基質中のカルボニル基との間で形成され、これは、非リボソーム性ペプチドシンターゼ (NRPS、non-ribosomal peptide synthetase) 及びプロテアーゼによって媒介されるものを含む多様な生物学的転換において遍在する。これらの重要なチオエステル及びエステル中間体は不安定であって、通常、半減期が数分から数時間であり、このことがそれらの特徴付けを困難にしている。これは、当技術分野における課題である。

【0005】

2, 3-ジアミノプロピオン酸 (DAP) を含むポリペプチドは、当技術分野において開示されている。具体的には、DAPを有する1種又は2種以上のポリペプチドが、従来技術において固相合成／コンジュゲーション技術によって生産されている (Virdee, S., Macmillan, D., & Waksman, G. (2010) *Chemistry & Biology* vol 17 pages 274-284 "Semisynthetic Src SH2 domains demonstrate altered phosphopeptide specificity induced by incorporation of unnatural lysine derivatives."を参照)。しかし、従来の固相合成／コンジュゲーション技術による、DAPを含むポリペプチドの生産には多くの課題がある。例えば、従来技術の技術を用いて、生物学的に最も重要なドメイン又はモチーフ、例えば、酵素の活性部位にDAPを組み込むことは極めて困難であるか又は不可能である。これは、活性部位が化学的コンジュゲーションには利用できないため、及び／又は固相合成によって作られるタンパク質が、正しいコンフォメーションを達成するために化学的リフォールディングを必要とするためである。これは、労力を要するだけでなく、非常に信頼性がなく、予測不可能であり、非常に多くの場合失敗に終わる。これらは、当技術分野における課題である。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Holliday, G.L., Mitchell, J.B.O. & Thornton, J.M. Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. *Journal of molecular biology* 390, 560-577 (2009)

【文献】Yang, W. & Drueckhammer, D.G. Understanding the relative acyl-trans

50

fer reactivity of oxoesters and thioesters: computational analysis of transition state delocalization effects. *Journal of the American Chemical Society* 123, 11004-11009 (2001)

【文献】Liu, B., Schofield, C.J. & Wilmoth, R.C. Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24024-24035 (2006)

【文献】Ngo, P.D., Mansoorabadi, S.O. & Frey, P.A. Serine Protease Catalysis: A Computational Study of Tetrahedral Intermediates and Inhibitory Adducts. *J Phys Chem B* 120, 7353-7359 (2016)

【文献】Cleary, J.A., Doherty, W., Evans, P. & Malthouse, J.P.G. Quantifying tetrahedral adduct formation and stabilization in the cysteine and the serine proteases. *Bba-Proteins Proteom* 1854, 1382-1391 (2015)

【文献】Scaglione, J.B. et al. Biochemical and structural characterization of the tautomycetin thioesterase: analysis of a stereoselective polyketide hydrolase. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 5726-5730 (2010)

【文献】Cappadocia, L. & Lima, C.D. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 118, 889-918 (2018)

【文献】Plechánovová, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H. & Hay, R.T. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 489, 115-U135 (2012)

【文献】Virdee, S., Macmillan, D., & Waksman, G. (2010) *Chemistry & Biology* vol 17 pages 274-284 "Semisynthetic Src SH2 domains demonstrate altered phosphopeptide specificity induced by incorporation of unnatural lysine derivatives"

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明によって提供される重要な技術的進歩は、2,3-ジアミノプロピオン酸(DAP)を含むポリペプチドを生産する新しい方法である。これは、従来技術において改変するのが困難又は不可能であった場所へのDAPの組み込み、例えば、酵素活性部位への組み込みにおいて特に有用である。

【0008】

これらの方法は、天然に存在する翻訳機構(例えば、細胞自体のリボソーム)を介するポリペプチドへの組み込みに役立つ新しい非天然アミノ酸に基づく。これらの方法にはまた、直交性tRNAに新しい非天然アミノ酸をチャージすることができる新しいtRNAシンテターゼが関与する。新しい非天然アミノ酸は、ポリペプチドに組み込まれると、容易に脱保護されて、ポリペプチド主鎖中にDAPを残すことができる。

【0009】

したがって、本発明は、従来技術の技術を使用しては現在可能でない、一連のタンパク質への及び／又はタンパク質内の一連の場所へのDAPの組み込みを可能にする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、一態様において、本発明は、式(I)若しくは(II)

【0011】

10

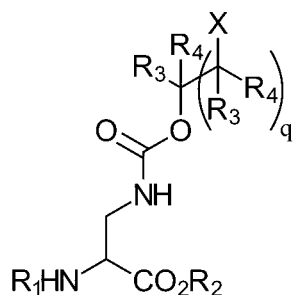
20

30

40

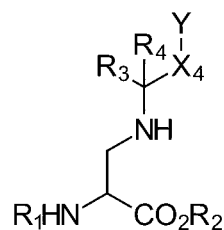
50

【化 1】



(I)

又は



(II)

10

【 0 0 1 2】

〔式中、

 R_1 は、H、アミノ酸残基又はペプチドであり、 R_2 は、H、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル又は C_{5-20} アリールであり、 q は、1、2又は3であり、 R_3 又は R_4 はそれぞれ、H、ハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{5-20} アリール、 C_{3-20} ヘテロアリール、 OC_{1-6} アルキル、 SC_{1-6} アルキル、 $NH(C_{1-6}$ アルキル) 及び $N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ から独立して選択され、

20

 X は、 X_1-Y 、 $S-S-R_5$ 、 $Se-Se-R_5$ 、 $O-NH-R_5$ 、 $S-NH-R_5$ 、 $Se-NH-R_5$ 、 X_2-Y_1 、 X_3-Y_2 、 N_3 又は $NH-S(O)_2-Y_3$ であり、 X_1 は、S、Se、O、NH 又は $N(C_{1-6}$ アルキル) であり、 X_2 は、S、Se 又は O であり、 X_3 は、 $NH-C(O)-O$ であり、 X_4 は、 $NH-C(O)-O$ 、O、S 又は NH であり、 R_5 は、H、ハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{5-20} アリール、 C_{3-20} ヘテロアリール、 OC_{1-6} アルキル、 $NH(C_{1-6}$ アルキル)、 $N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、ペプチド、糖、 C_{3-20} ヘテロシクリル及び核酸から選択され、

30

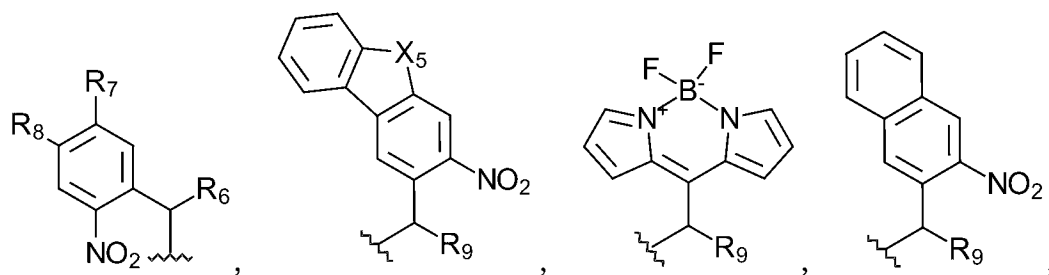
 Y は、

【 0 0 1 3】

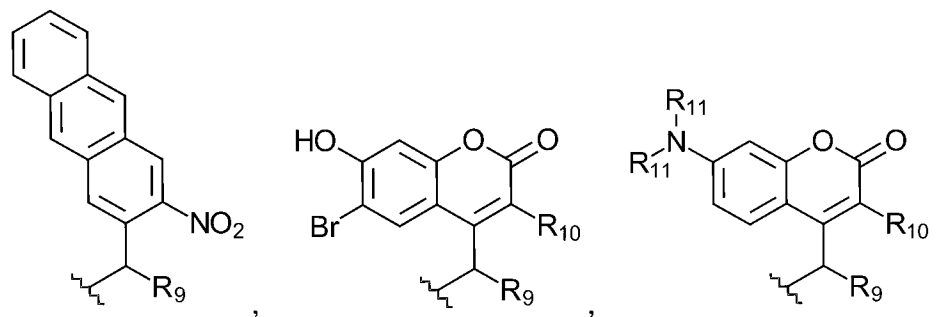
40

50

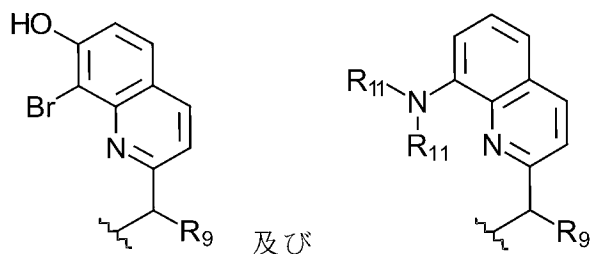
【化 2】



10



20



及び

【 0 0 1 4】

30

から選択される保護基であり、

R_6 は、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 CO_2H 、 CO_2R' 、 SQ_2H 、 SO_2R' 、 G_{5-20} アリール、 C_{3-20} ヘテロアリール、 $NHC(O)R'$ 及び NHR' から選択され、

R_7 及び R_8 は、 H 、 OH 、 $O(C_{1-6}$ アルキル)、 $O(C_{5-20}$ アリール) 及び $O(C_{3-20}$ ヘテロアリール) から独立して選択されるか、又は R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成し、

各 R' は、 G_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル及び C_{5-20} アリールから独立して選択され、

R_9 は、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 CO_2H 、 CO_2R' 、 SQ_2H 、 SO_2R' 及び G_{5-20} アリールから選択され、

40

R_{10} は、 H 、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} ハロアルキルから選択され、

R_{11} は、 H 、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} ハロアルキルから選択され、

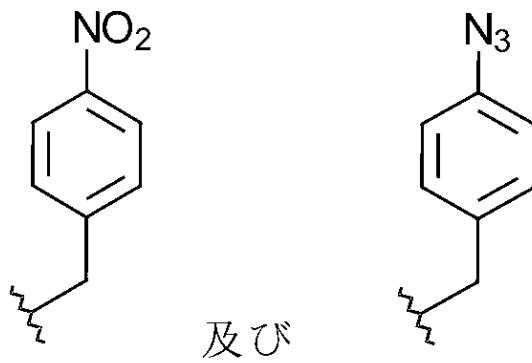
X_5 は、 S 、 O 、 NH 、 $N-C(O)-O-R'$ 、 $N-S(O)_2H$ 、 $N-S(O)_2R'$ 又は NR' であり、

Y_1 は、

【 0 0 1 5】

50

【化 3】



10

【 0 0 1 6】

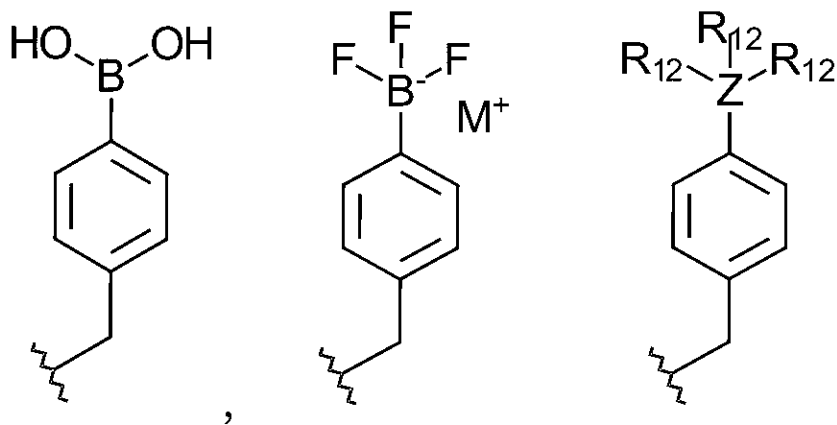
から選択される保護基であり、

 Y_2 は、

【 0 0 1 7】

【化 4】

20



30

【 0 0 1 8】

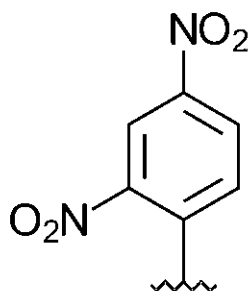
、 $t-Bu$ 及び CH_2Ph から選択される保護基であり、 M^+ は、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 又は $N(R_{13})_4^+$ であり、 Z は、 Si 又は Ge であり、 R_{12} は、 C_{1-6} アルキル又は $C(O)-(C_{5-20}$ アリール) であり、 R_{13} は、 H 、 C_{1-6} アルキル、アリル又は C_{5-20} アリールであり、 Y_3 は、保護基

【 0 0 1 9】

40

50

【化 5】



10

【0020】

である]

の非天然アミノ酸又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物を提供する。

【0021】

一態様において、本発明は、前述の非天然アミノ酸を含むポリペプチドであって、前記非天然アミノ酸がペプチド結合を介して前記ポリペプチドに結合されている、ポリペプチドを提供する。

20

【0022】

一態様において、本発明は、DAPを含むポリペプチドを調製する方法であって、前述のポリペプチドを脱保護するステップを含む、方法に関する。好適には、前記脱保護するステップは、 365 nm 、 35 mW cm^{-2} における1分間の照射を含む。

【0023】

一態様において、本発明は、変異Y271C、N311Q、Y349F及びV366Cを含むPyLRS tRNAシンテターゼに関する。好適には、前記PyLRS tRNAシンテターゼは、前記変異を含むメタノサルシナ・バーケリ (*Methanosarcina barkeri*) PyLRS (MbPyLRS) tRNAシンテターゼである。

30

【0024】

一態様において、本発明は、2,3-ジアミノプロピオン酸 (DAP) を含むポリペプチドを生産する方法であって、前述の非天然アミノ酸をポリペプチドに遺伝的に組み込むステップと、前記非天然アミノ酸を脱保護して2,3-ジアミノプロピオン酸 (DAP) にする任意のステップとを含む、方法に関する。

【0025】

好適には、ポリペプチドの生産は、

(i) ポリペプチドをコードする核酸を用意するステップであって、核酸が、請求項1～10のいずれかに記載の非天然アミノ酸をコードする直交性コドンを含む、ステップと、
(ii) 前記直交性コドンを認識できる直交性tRNAシンテターゼ／tRNA対の存在下で前記核酸を翻訳し、前記非天然アミノ酸をペプチド鎖に組み込むステップとを含む。

40

【0026】

好適には、前記直交性コドンは、アンバーコドン (TAG) を含み、前記tRNAは、Mb tRNA_{CUA}を含み、前記tRNAシンテターゼは、変異Y271C、N311Q、Y349F及びV366Cを有するMbPyLRSシンテターゼを含む。

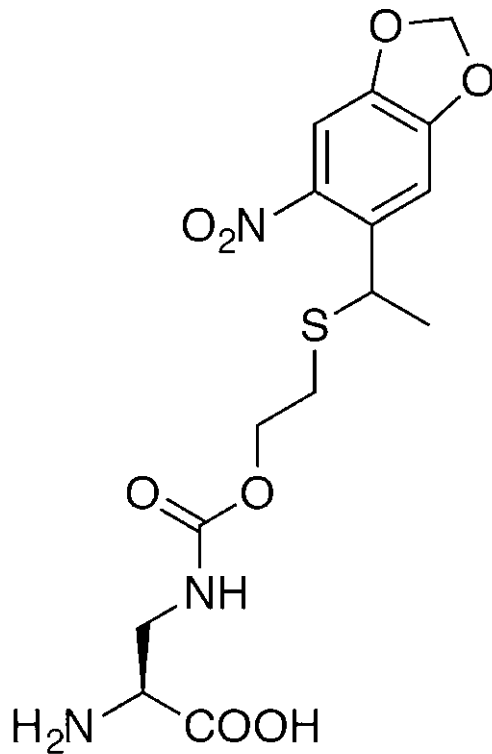
【0027】

好適には、前記非天然アミノ酸は、

【0028】

50

【化 6】



10

20

【 0 0 2 9 】

を含む。

【 0 0 3 0 】

一態様において、本発明は、前述のポリペプチド又は前述の方法であって、前記ポリペプチドが酵素であり、前記非天然アミノ酸が、前記酵素の活性部位内のアミノ酸残基に対応する位置に組み込まれる、ポリペプチド又は方法に関する。

30

【 0 0 3 1 】

一態様において、本発明は、前述のペプチドであって、前記ペプチドが酵素であり、前記酵素が、International Nomenclature and Classification of Enzymesによる E C 3 . 4 ペプチダーゼ、E C 3 . 4 . 2 2 . 4 4 ペプチダーゼ又は E C 2 . 3 . 2 . 2 3 E 2 ユビキチン結合酵素である、ペプチドに関する。

【 0 0 3 2 】

一態様において、本発明は、1 ~ 2 0 個の 2 , 3 -ジアミノプロピオン酸 (D A P) 基を含む、前述のポリペプチドに関する。好適には、前記ポリペプチドは、単一の 2 , 3 -ジアミノプロピオン酸 (D A P) 基を含む。

40

【 0 0 3 3 】

一態様において、本発明は、前述のポリペプチド又は前述の方法であって、前記非天然アミノ酸が、野生型ポリペプチド中のシステイン、セリン又はトレオニン残基に対応する位置に、任意に野生型ポリペプチド中のシステイン又はセリン残基に対応する位置に、組み込まれるポリペプチド又は方法に関する。

【 0 0 3 4 】

一態様において、本発明は、2 , 3 -ジアミノプロピオン酸 (D A P) を含むポリペプチドの生産における、前述の非天然アミノ酸の使用に関する。好適には、ポリペプチドの

50

生産は、前述の方法を実施することを含む。

【0035】

一態様において、本発明は、酵素の基質を捕捉する方法であって、

- a) 活性部位に少なくとも1つの2, 3-ジアミノプロピオン酸(DAP)基を含む酵素を用意するステップと、
- b) 前記酵素を、前記酵素の候補基質と接触させるステップと、
- c) インキュベートして前記DAP基を前記候補基質と反応させるステップとを含む、方法である。

好適には、前記基質は代謝産物である。

好適には、前記酵素は、ペプチダーゼ、又はユビキチン結合酵素、又はヒドロラーゼ、又は炭素-硫黄結合を形成する酵素である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

次に、添付の図面を参照して、本発明の実施形態をさらに説明する。

【図1】アシル-酵素中間体を介して進行する活性部位における、システイン及びセリン求核剤を有する酵素の一般的なメカニズムを示す図である。a、b、活性部位のセリン又はシステイン求核剤は、カルボニル基と反応して、 R_1-XH （式中、Xは通常、NH、O、Sである）の喪失によって崩壊してアシル-酵素中間体となる四面体の中間体（図示せず）を形成する。求核性 R_3 （通常、ヒドロキシル、アミン又はチオール）によるアシル-酵素中間体の攻撃により、結合した基質断片が放出され、酵素が再生される。c、システイン又はセリンを2, 3-ジアミノプロピオン酸(DAP)で置き換えると、切断に対して抵抗性の第1のアシル-酵素中間体へと進行する酵素が作製され得る。

【図2】バリノマイシンシンテターゼ及び提示される、バリノマイシンの生合成を示す図である。バリノマイシンシンテターゼのサブユニットVlm1及びVlm2は、D- α -ヒドロキシイソ吉草酸(D- α -hiv)、D-バリン(D-val)、L-乳酸(L-lac)及びL-バリン(L-val)を逐次的に縮合させて、テトラデプシペプチジル(D-hiv-D-val-L-lac-L-val)中間体を形成する。D- α -hiv及びL-lacは、ケトレダクターゼ(KR)ドメインを含む、特殊なモジュール1及び3による、それらの前駆体ケト酸の選択及びケト還元によって生じる。テトラデプシペプチジル中間体がオリゴマー化されてオクタデプシペプチジル中間体及び次いでドデカデプシペプチジル中間体となり、ドデカデプシペプチジル中間体は末端チオエステラーゼ(TE)ドメインによって環化されて、バリノマイシンを産生する。A：アデニル化ドメイン、PCP：ペプチジル担体タンパク質ドメイン；C：縮合ドメイン。カノニカルなNRPSの合成サイクルについては、補図1を参照のこと。

【図3-1】～

【図3-3】組換えタンパク質へのDAP組込みの遺伝的指示を示す図である。a、本明細書中で検討したDAP及び保護バージョンの構造。1：2, 3-ジアミノプロピオン酸(DAP)。2：(S)-3-((アリルオキシ)カルボニル)アミノ)-2-アミノプロパン酸。3：(S)-2-アミノ-3-((2-ニトロベンジル)アミノ)プロパン酸。4：(2S)-2-アミノ-3-((1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル)アミノ)プロパン酸。5：(2S)-2-アミノ-3-((1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エトキシ)カルボニル)アミノ)プロパン酸。6：(2S)-2-アミノ-3-((2-((1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル)チオ)エトキシ)カルボニル)アミノ)プロパン酸。b～f、抽出物に対して行った、LC-MSアッセイによる化合物2～6の細胞内濃度の決定。ダークブルー色のトレースは、各化合物について100 μ M標準物質を表す。ライトブルー色のトレースは、各化合物について10 μ M標準物質を表す。赤色のトレースは、化合物の非存在下で増殖させた細胞に起因する。茶色のトレースは、化合物の非存在下で増殖させたが、10 μ Mまでの化合物でスパイクされた細胞に起因する。緑色のトレースは、1 mMの化合物の存在下で増殖

させた細胞に起因する。g, DAPRS/tRNA_{CUA}対の表現型決定。DAPRS/tRNA_{CUA}対及びcat(112TAG)を含む細胞を、6の存在下又は非存在下で、示された濃度のクロラムフェニコールにおいてプレーティングした。h, 150位に6又はBocKのいずれかを含むsfGFPの発現。発現及び精製後、等容量のタンパク質溶液をSDS-PAGEゲルにロードし、クーマシー染色するか(上部ゲル)、又は α -His抗体を用いてウエスタンブロットによって分析した(下部ゲル)。i, コードされた6がUV光で脱保護されて、中間体(赤)となり、それが自然に断片化して、DAPが露出された。j, sfGFPにおける6の脱保護に続いて、ESI-MS分析を行った。緑色のトレース: 150位に6を含む精製sfGFP: 予想質量: 28096.27 Da; 実測質量: 28097.21 Da。赤色のトレース: 6を中間体に変換するための照射後の、6を含むsfGFP: 予想質量: 27902.22 Da; 実測質量: 27904.14 Da。青色のトレース: 照射(6を中間体に変換するための)及び中間体をDAP(1)に変換するためのさらなるインキュベーション後の、6を含むsfGFP: 予想質量: 27798.23 Da; 実測質量: 27800.88 Da。各トレースはまた、N末端メチオニンの自然消失によって生じるタンパク質付加物の質量を示す。

【図4a】～

【図4b】TEV(C151DAP)によりアシル-酵素中間体を安定的にトラップすることを示す図である。図4aは、TEVプロテアーゼの示されたバリエーションを、Ub-*tev*-Hisと共にインキュベートしたことを示す。TEV(wt)の使用は、TEV切断配列の切断を生じる。TEV(C151A)の使用は最小切断を生じる。TEVの活性部位におけるDAPの存在は、クーマシーゲルに新しいバンドの存在をもたらし、これは、イソペプチド連結TEV(C151DAP)-Ub複合体(左)を表す。反応の α Ub及び α Streptウエスタンブロットにより、複合体の同一性が確認される(TEVコンストラクトは、Streptタグを含む)。図4bは、イソペプチド連結TEV(C151DAP)-Ub複合体のタンデム質量分析を示す。タンデム質量分析は、所望の部位におけるDAP修飾(modification)及び残基上の予想される*tev*-Gly-Gly修飾を、はっきりと同一し、これは、DAP上のUb捕捉と一致する。

【図5】テトラデブシペプチジル-SNACからVlm TEによって作られた小分子生成物がオリゴマー化経路を明確化することを示すグラフである。テトラデブシペプチジル-SNAC 7(1.7mM)とVlm TE(6.5 μ M)との反応のHR-LC-ESI-MSからの抽出されたイオンクロマトグラム(EIC)。a, TE_wtは主生成物としてバリノマイシンを産生する。オクタデブシペプチジル-SNAC 11、ドデカデブシペプチジル-SNAC 15、及び16量体デブシペプチジル-SNAC 19の存在により、補足図10bのオリゴマー化のシナリオが確認される。b, TE_{DAP}は少量のオクタデブシペプチジル-SNAC 11を産生する。c, 酵素を含まない対照反応は、溶液中のチオエステルの無触媒加水分解に由来する可能性が高い少量のテトラデブシペプチド9を示す。各化合物の正確な質量分析及びm/z計算値からの偏差に関しては、補足表2を参照。

【図6-1】～

【図6-2】TE_{DAP}の複合体の結晶構造を示している。a, TE_wtの代表的な電子密度(1.0 σ において輪郭が描かれた2mF_o-DFcマップ)。b, TE_wtの構造。リッド(灰色)はほぼ完全に秩序化されているが、タンパク質のコアよりも高いB因子を有する。c, TE_{DAP}のデコンボリューション質量スペクトル。d, デオキシーテトラデブシペプチジル-SNAC 8と共にインキュベートされたTE_{DAP}のデコンボリューション質量スペクトル。e, バリノマイシンと共にインキュベートされたTE_{DAP}のデコンボリューション質量スペクトル。f及びg, テトラデブシペプチジル-TE_{DAP}(f)及びドデカデブシペプチジル-TE_{DAP}(g)のデブシペプチド残基に関する不偏mF_o-DFc電子密度マップ(緑色のメッシュ、2.5 σ)。アミド結合が、ジアミノプロピオン酸(DAP、茶色のスティック)及びデブシペプチド残基(シアン色のスティック)を連結させる。h及びi, テトラデブシペプチジル-TE_{DAP}(h)及びド

デカデブシペプチジル-TE_{DAP} (i) 複合体の活性部位。DAP及びval 4 (h) 又はval 12 (i) によって形成されたアミドのカルボニル酸素は、A 2399及びL 2464の主鎖アミンによって形成されたオキシアニオンホールに近接して位置付けられている。触媒三残基H 2625及びD 2490がスティックで示されている。j, テトラデブシペプチジル-TE_{DAP}のリッドは、TE_{wt}に見られるものと類似した位置にあるが、k, ドデカデブシペプチジル-TE_{DAP}の全ての結晶学的に独立した分子 (P 1及びH 3空間群構造から) は、TE_{wt}に見られるものとははっきり異なる、一連の類似したコンフォメーションである。l, テトラデブシペプチジル-TE_{DAP}及びドデカデブシペプチジル-TE_{DAP}の構造間におけるリッドヘリックスL α 1~L α 4の実質的なコンフォメーション変化の図解。わかりやすくするために、可動ヘリックスは、徐々に波長が高くなる色で示されている。

10

【図7】PCPDメインとTEドメインとの相互作用のモデル化及び推定上の経路を示す図である。a, ドデカデブシペプチジル-TE_{DAP}とEntF PCP-TEジドメインとの構造との重ね合わせ (Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S.D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488 (2011)) が、活性部位へのPPE部分の進路を示す。b, リッドは、ドデカデブシペプチドが直線的に伸長するのを立体的に防ぎ、この立体ブロック及びリッドとドデカデブシペプチドとの非常に疎水性の大きい非特異的相互作用により、カールバック (curling back) に好都合に働く。c, オクタデブシペプチジル-TEから始まるオリゴマー化及び環化の仮説上の経路。i, 観察されるアポ/テトラデブシペプチドのコンフォメーションにおけるL α 1の位置が、ペプチドコンフォメーションの伸長を促進している。ii, テトラデブシペプチジル-PCPは、PCPDメインに結合した約30 Åのテトラデブシペプチジル-PPEを収容しそれを活性部位に向けて導くことができるであろう、ドデカデブシペプチド様リッドのコンフォメーションをおそらく使用して、その末端ヒドロキシルにオクタデブシペプチドを受け入れる。iii, PCPDメインは、Ser 2463に戻すためのチオエステルを提示する。iv, 最後に、ドデカデブシペプチド-TE_{DAP}構造において観察されるリッドのコンフォメーションは、環化のためにドデカデブシペプチドをSer 2463に向かってカールバックするのに役立つことができるであろう。

20

【図8-1】～

30

【図8-2】補足図1である。

【図9-1】～

【図9-2】補足図2である。

【図10】補足図3である。

【図11-1】～

【図11-2】補足図4である。

【図12】補足図5である。

【図13-1】～

【図13-2】補足図6である。

【図14-1】～

40

【図14-2】補足図7である。

【図15】補足図8である。

【図16】補足図9である。

【図17】補足図10である。

【図18】補足図11である。

【図19】補足図12である。

【図20】補足図13である。

【図21】補足図14である。

【図22】補足図15である。

【図23-1】～

50

【図 2 3 - 2】 写真を示す図である。UBE2L3 (C86DAP) を用いたユビキチン化試験。A: Ub 及び β -メルカプトエタノールの存在下及び非存在下における、UBE2L3 (wt)、UBE2L3 (C86A) 又は UBE2L3 (C86DAP) のいずれかを用いたユビキチン化反応のクーマシー染色。Ub 及び β -メルカプトエタノールの存在下又は非存在下における、UBE2L3 (wt)、UBE2L3 (C86A) 又は UBE2L3 (C86DAP) のいずれかを用いたユビキチン化反応の α HA (B) 及び α UBE2L3 (111-125) (C) ウェスタンブロット。Ub-UBE2L3: チオエステル連結 (UBE2L3 [wt]) 又はイソペプチド連結 (UBE2L3 [C86DAP]) E2-Ub 複合体。UBE2L3 (C86DAP) と Ub の間に形成された複合体は、 β -メルカプトエタノールの存在に感受性でなく、これは、 β -メルカプトエタノールの存在下で低減される UBE2L3 (wt) と Ub との複合体とは異なる。

10

【図 2 4】 写真を示す図である。

【図 2 5】 写真を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

ここで、本発明者らは、遺伝的にコードされた 2, 3-ジアミノプロピオン酸がどのように酵素反応の構造的洞察を可能にするかを開示する。特に、本発明者らは、バリノマイシンの生合成におけるアシル-チオエステラーゼ中間体を介するこのアプローチを例示する。

【0038】

20

本発明は、(例えば) 大腸菌 (*E. coli*) において産生される組換えタンパク質への 2, 3-ジアミノプロピオン酸 (DAP) の効率的な組み込みを遺伝的に指示する戦略を可能にする。本発明者らは、触媒残基、例えば、システイン又はセリン残基を DAP でどのように置き換えるかを教示する。これは、安定なアミド結合を介して連結されているアシル-酵素複合体の効率的な捕捉を可能にする。

【0039】

例えば、バリノマイシンシンテターゼ (Vlm TE, valinomycin synthetase) のチオエステラーゼドメインが、直鎖テトラデプシペプチドのドデカデプシペプチドへの逐次三量体化と、ドデカデプシペプチドのバリノマイシンへの逐次環化の両方を促進する生合成経路を解明することによって、本発明を実証する。DAP コンジュゲートとしての Vlm TE の触媒サイクルにおける最初及び最後のアシル-TE 中間体を捕捉することによって、本発明の使用は、NRPS の TE ドメインのコンフォメーション変化が直鎖基質のオリゴマー化から環化への切り替えをどのように制御するかについての構造的洞察を提供する。本発明によって可能になるこのような戦略は、多様なアシル-酵素中間体の特徴付けを容易にすることに用途を見出す。さらに、本発明は、機能が知られていない酵素に対するネイティブ基質の捕捉及び同定を可能にすることに用途を見出す。

30

【0040】

一態様において、本発明は、前述の同種組換えポリペプチドに関する。好適には、前記ポリペプチドは、前述の方法によって作られる。

【0041】

40

一態様において、本発明は、本明細書中に記載された方法に従って生産されたポリペプチドに関する。これらの新しい方法の生成物であるということだけでなく、このようなポリペプチドは、前述の非天然アミノ酸を含む又は DAP を含むという技術的特徴を有する。

【0042】

変異は、当技術分野におけるその普通の意味を有し、言及される残基、モチーフ又はドメインの置換、トランケーション又は欠失を指し得る。変異は、ポリペプチドレベルで、例えば、変異配列を有するポリペプチドの合成によって行ってもよいし、又はヌクレオチドレベルで、例えば、変異配列をコードする核酸であって、その後に翻訳されて変異ポリペプチドを産生し得る核酸を作ることによって行ってもよい。アミノ酸が所与の変異部位の置換アミノ酸と特定されない場合、好適には、前記部位のランダム化を使用する。デフ

50

オルトの変異として、アラニン（A）を使用し得る。好適には、特定の部位において使用する変異は、本明細書中に記載する通りである。

【0043】

断片は、長さが、好適には少なくとも10アミノ酸、好適には少なくとも25アミノ酸、好適には少なくとも50アミノ酸、好適には少なくとも100アミノ酸、好適には少なくとも200アミノ酸、好適には少なくとも250アミノ酸、好適には少なくとも300アミノ酸、好適には少なくとも313アミノ酸、又は好適には目的のポリペプチドの大部分である。

【0044】

本発明の方法は、インビボでも又はインビトロでも実施できる。

10

【0045】

一実施形態において、好適には、本発明の方法は、人体又は動物体には適用されない。好適には、本発明の方法は、インビトロの方法である。好適には、この方法は、人体又は動物体の存在を必要としない。好適には、この方法は、人体又は動物体の診断又は手術又は治療の方法ではない。

【0046】

用語「含む（comprises）」（comprise、comprising）は、当技術分野におけるその普通の意味、すなわち、述べられた特徴又は特徴の群が含まれるという意味を有すると理解すべきであるが、この用語は、任意の他の述べられた特徴又は特徴の群もまた存在することを排除するものではない。

20

【0047】

DAPの組み込み

本発明者らは、スルフヒドリル又はヒドロキシル基をアミノ基で置き換える、触媒システイン又はセリン残基の、アミノ酸での選択的な置き換えが、アミド結合を介して連結されたアシル-酵素中間体の捕捉を可能にすると仮定した（図1c）。リジン側鎖のアミンの共役酸は10.5のpKaを有するのに対し、DAPのベータアミノ基の共役酸のpKaは9.4である（Hay, R.W. & Morris, P.J. Interaction of DL-2,3-Diaminopropionic Acid and Its Methyl Ester with Metal Ions .1. Formation Constants. J Chem Soc A, 3562-& (1971)）。さらに、DAPがペプチドに組み込まれると、pKaは、主鎖アミドの電子求引効果によって実質的に低下する：DAPのカルボキシレートへの単一のペプチド結合は、ベータアミノ基の共役酸のpKaを7.5に低下させ（Lan, Y. et al. Incorporation of 2,3-Diaminopropionic Acid into Linear Cationic Amphipathic Peptides Produces pH-Sensitive Vectors. Chembiochem 11, 1266-1272 (2010)）、より長いペプチドにおいては6.3のpKaが報告された（Lan, Y. et al. Incorporation of 2,3-Diaminopropionic Acid into Linear Cationic Amphipathic Peptides Produces pH-Sensitive Vectors. Chembiochem 11, 1266-1272 (2010)）。したがって、本発明者らは、DAPを使用して、酵素の活性部位内のCys又はSerを置き換えたならば、DAP側鎖のかなりの部分が生理的pHにおいて中性アミンとして存在すると予想した。これらのアミンは、求核剤として作用するのに利用でき、酵素の基質とアミド結合を形成し得る。水溶液中におけるアミンの半減期はほぼ500年程度であり（Radzicka, A. & Wolfenden, R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. Journal of the American Chemical Society 118, 6105-6109 (1996)）、本発明者らは、不安定なチオエステル及びエステル中間体のアミド類似体を実質的に安定化され、それによって求核剤又は溶媒との後続反応が進行しないか又は大幅に減弱されると予想した（図1c）。

30

40

【0048】

二次代謝産物を産生する巨大酵素である非リボソーム性ペプチドシンターゼ（NRPS）及びポリケチドシンセターゼ（PKS、polyketide synthase）は、それらの合成サイクルにおいて非常に複雑なアシル-酵素中間体を生成する。これらの分子機械は、チオ

50

テンプレート生合成経路を使用して、小さいアシル分子を組み立てて、臨床的な抗がん剤、抗生物質、抗真菌剤及び免疫抑制剤を含む、広範な生物学的に活性な天然産物にする（補足図1）。それらの詳細な分子機能を解き明かそうとする従来技術の試みは、それらの複数のアシル-酵素中間体を高分解能で特徴付けるといった難題によって妨げられてきた。この難題は、直鎖ペプチジル又はデブシペプチジル基質をオリゴマー化又は環化するNRPS経路からのチオエステラーゼ（TE、thioesterase）ドメインによって例示される。これらのTEドメインは、抗生物質であるグラミシジンS（Hoyer, K.M., Mahlert, C. & Marahiel, M.A. The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chemistry & biology* 14, 13-22 (2007))、嘔吐毒素であるセレウリド（Alonzo, D.A., Magarvey, N.A. & Schmeing, T.M. Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PloS one* 10, e0128569 (2015)、Magarvey, N.A., Ehling-Schulz, M. & Walsh, C.T. Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. *Journal of the American Chemical Society* 128, 10698-10699 (2006))、シデロフォアであるエンテロバクチン及びバチリバクチン（Shaw-Reid, C.A. et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology* 6, 385-400 (1999)、May, J.J., Wendrich, T.M. & Marahiel, M.A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276, 7209-7217 (2001))、抗がん性のコングロバチン（Zhou, Y. et al. Iterative Mechanism of Macrodiolide Formation in the Anticancer Compound Conglobatin. *Chemistry & biology* 22, 745-754 (2015))、DNAビスインターカレーターであるチオコラリン（Robbel, L., Hoyer, K.M. & Marahiel, M.A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *FEBS J* 276, 1641-1653 (2009))並びに抗菌性、抗腫瘍性及び細胞毒性を有するカリウムイオノフォアデブシペプチドであるバリノマイシン（Magarvey, N.A., Ehling-Schulz, M. & Walsh, C.T. Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. *Journal of the American Chemical Society* 128, 10698-10699 (2006)、Jaitzig, J., Li, J., Sussmuth, R.D. & Neubauer, P. Reconstituted biosynthesis of the nonribosomal macrolactone antibiotic valinomycin in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 3, 432-438 (2014))の生合成に参与する。それらは最初に、それらのペプチジル中間体を、生物活性化合物において見られるコピー数まで、しかしそれを超えずに、オリゴマー化し、次いで、完成生成物の最終放出及び環化を触媒しなければならない。さらに、合成サイクルに再組み込むことができないために役に立たない副生物である、遊離の直鎖ペプチドが自然加水分解によって実質的に形成されないように、必要とされるオリゴマー化及び環化は十分に高速でなければならない。

【0049】

アシル-TE中間体の高分解能構造は、TEが基質の運命をどのように制御するかについての機能的洞察を提供し、実質的な進歩に相当するであろう。一握りの高分解能アシル-TE構造が得られており、中でも最も注目すべきはポリケチドであるピクロマイシンを形成するTE及び非ネイティブ基質類似体に関するものである（Akey, D.L. et al. Structural basis for macrolactonization by the pikromycin thioesterase. *Nat Chem Biol* 2, 537-542 (2006))。これらは、推定上のオキシアニオンホールの同定に役立ち、TEドメインの「リッド」要素と基質との相互作用を実証した。TEドメインの構造研究は、小分子基質の低いK_d値の組合せ（Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a st

ructural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. Journal of molecular biology 359, 876-889 (2006))、T Eドメインへの結合時におけるペプチド鎖の複数のコンフォメーション (Tseng, C.C. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. Biochemistry 41, 13350-13359 (2002)、Bruner, S.D. et al. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. Structure 10, 301-310 (2002))、及び特に、結晶学的な時間的尺度と比較して高速であるアシル-T E 中間体の加水分解速度 (Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. Journal of molecular biology 359, 876-889 (2006)、Bruner, S.D. et al. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. Structure 10, 301-310 (2002)) が組み合わさることによって妨げられてきた。これらは、従来技術のアプローチに関連する課題である。

本発明によって提供される安定なアシル-T E 中間体にアクセスする能力は、非リボソーム性ペプチドの生合成並びにポリケチド及び脂肪酸の生合成におけるT Eドメイン選択性のメカニズムを、当業者が特徴付けできるようにする意味ある利点である。

【0050】

以下により詳細に記載するように、本発明者らは、温和な条件下でDAPに翻訳後変換され得るアミノ酸を組み込んでいるアミノアシル-tRNAシンターゼ/tRNA_{CUA}対を進化させた。本発明者らは、大腸菌において産生された組込みタンパク質へのDAPの部位特異的組込みへのこの対の使用を実証する。本発明者らは、システインプロテアーゼ及びNRPS T Eドメインに関するアシル-酵素中間体の効率的な捕捉を実証する。バリノマイシンシンターゼ (Vlm)、2-タンパク質、4-モジュールNRPSは、ヒドロキシ酸 (アルファー-ケト酸のインサイチュ還元由来) 及びアミノ酸をテトラデブシペプチド中間体に代替的に連結し、T Eドメイン (Vlm T E) が漸進的にドデカデブシペプチドへと三量体化し、次いで関してバリノマイシンを生じることが提示されている (Magarvey, N.A., Ehling-Schulz, M. & Walsh, C.T. Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. Journal of the American Chemical Society 128, 10698-10699 (2006)、Jaitzig, J., Li, J., Sussmuth, R. D. & Neubauer, P. Reconstituted biosynthesis of the nonribosomal macrolactone antibiotic valinomycin in Escherichia coli. ACS Synth Biol 3, 432-438 (2014)) (図2)。

本発明者らは、テトラデブシペプチドをバリノマイシンに変換するための生合成経路を解明するのに使用される本発明を実証する。Vlm T E中の触媒セリンをDAPで置き換えることによって、本発明者らは、安定なデオキシーテトラデブシペプチジル-N-T E_{DAP}及びドデカデブシペプチジル-T E_{DAP}コンジュゲートにどのようにアクセスするかを実証する。これらのコンジュゲートの構造的特徴付けは、Vlm T Eの触媒サイクルにおける最初及び最後のアシル-T E 中間体についての洞察を提供する。したがって、本発明は、基質の運命が、直鎖前駆体をオリゴマー化及び環化するNRPSのT Eドメインのコンフォメーション変化によってどのように決定され得るかを検討し/明らかにすることに用途を見出す。

【0051】

好適には、ポリペプチドは、前述した単一のDAP基及び/又は非天然アミノ酸の残基を含む。これは、前述したDAP基/非天然アミノ酸を対象とする可能性がある、あらゆるさらなる化学修飾に対する特異性、並びに/又はDAPが酵素の活性部位に存在する場合における捕捉の特異性を維持するという利点を有する。例えば、目的のポリペプチド中に前述した単一のDAP基/非天然アミノ酸しか存在しない場合には、部分修飾/又は部

分脱保護の問題、又は同じポリペプチド中の代わりのDAP基間で異なる反応微小環境の問題（これは、ポリペプチドの異なる場所にある異なるDAP基間に不等な反応性をもたらす可能性がある）の可能性が有利に回避される。

【0052】

好適には、ポリペプチドは2個のDAP基を含み；好適には、ポリペプチドは3個のDAP基を含み；好適には、ポリペプチドは4個のDAP基を含み；好適には、ポリペプチドは5個のDAP基を含み；好適には、ポリペプチドは10個又はさらにはそれ以上のDAP基、例えば、15～20個のDAP基を含む。最も好適には、ポリペプチドは1～5個のDAP基を含む。最も好適には、ポリペプチドは1個のDAP基を含む。

【0053】

原則として、前述の複数の非天然アミノ酸（同じ非天然アミノ酸の複数のコピー又は2種若しくは3種以上の異なる非天然アミノ酸のそれぞれの1つ若しくは2つ以上のコピーのいずれか）が、同じ又は異なる直交性コドン／直交性tRNA対によって組み込まれる可能性がある。好適には、複数の非天然アミノ酸が（前述の直交性tRNAシンテターゼと一緒に）、複数のアンバーコードンの挿入／翻訳によって組み込まれる。

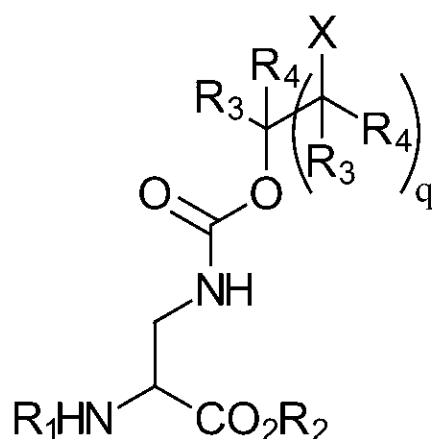
【0054】

新規化学物質（NCE）

新規化学物質（NCE、novel chemical entity）は、従来の方法で一般式を用いて本明細書中に記載される。式（I）若しくは（II）

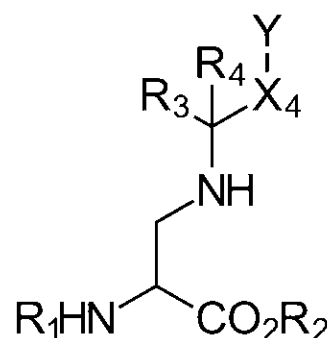
【0055】

【化7】



(I)

又は



(II)

【0056】

〔式中、

R₁は、H、アミノ酸残基又はペプチドであり、

R₂は、H、C₁–6アルキル、C₁–6ハロアルキル又はC₅–20アリールであり、

qは、1、2又は3であり、

R₃又はR₄はそれぞれ、H、ハロ、C₁–6アルキル、C₁–6ハロアルキル、C₅–20アリール、C₃–20ヘテロアリール、OC₁–6アルキル、SC₁–6アルキル、NH（C₁–6アルキル）及びN（C₁–6アルキル）₂から独立して選択され、

Xは、X₁–Y、S–S–R₅、Se–Se–R₅、O–NH–R₅、S–NH–R₅、Se–NH–R₅、X₂–Y₁、X₃–Y₂、N₃又はNH–S（O）₂–Y₃であり、

X₁は、S、Se、O、NH又はN（C₁–6アルキル）であり、

10

20

30

40

50

X_2 は、S、Se 又は O であり、

X_3 は、 $NH-C(O)-O$ であり、

X_4 は、 $NH-C(O)-O$ 、O、S 又は NH であり、

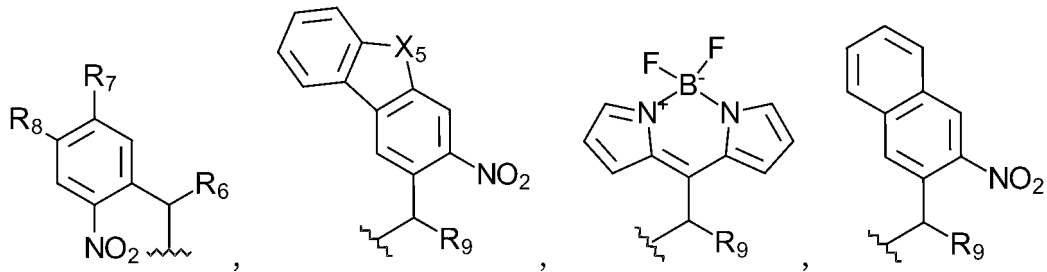
R_5 は、H、ハロ、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル、 C_5-20 アリール、 C_3-20 ヘテロアリール、 OC_1-6 アルキル、 $NH(C_1-6$ アルキル)、 $N(C_1-6$ アルキル) $_2$ 、ペプチド、糖、 C_3-20 ヘテロシクリル及び核酸から選択され、

Y は、

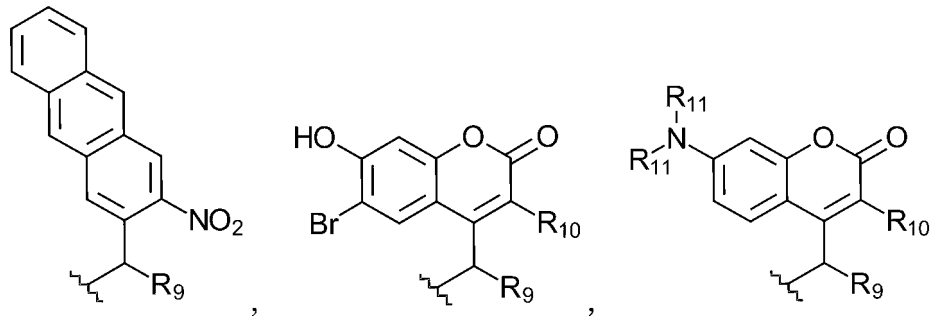
【0057】

【化8】

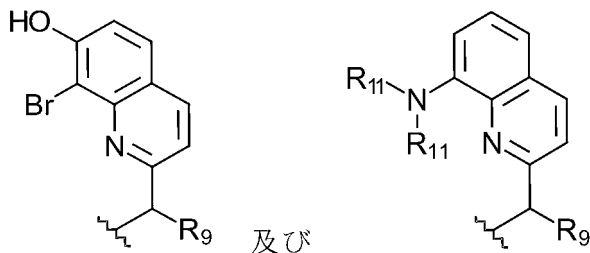
10



20



30



【0058】

から選択される保護基であり、

40

R_6 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル、 CO_2H 、 CO_2R' 、 SQ_2H 、 SO_2R' 、 G_5-20 アリール、 C_3-20 ヘテロアリール、 $NHC(O)R'$ 及び NHR' から選択され、

R_7 及び R_8 は、H、OH、 $O(C_1-6$ アルキル)、 $O(C_5-20$ アリール) 及び $O(C_3-20$ ヘテロアリール) から独立して選択されるか、又は R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成し、

各 R' は、 G_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル及び C_5-20 アリールから独立して選択され、

R_9 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル、 CO_2H 、 CO_2R' 、 SQ_2H 、 SO_2R' 及び G_5-20 アリールから選択され、

50

R_{10} は、H、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} ハロアルキルから選択され、

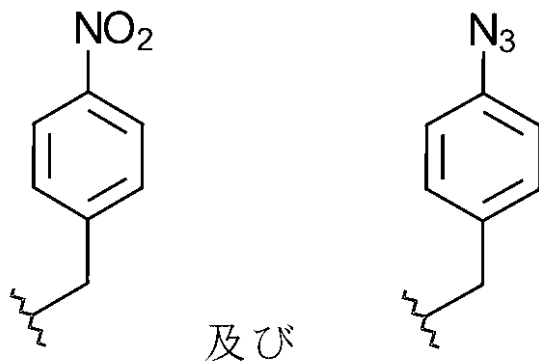
R_{11} は、H、 C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} ハロアルキルから選択され、

X_5 は、S、O、NH、 $N-C(O)-O-R'$ 、 $N-S(O)_2H$ 、 $N-S(O)_2R'$ 又は NR' であり、

Y_1 は、

【0059】

【化9】



10

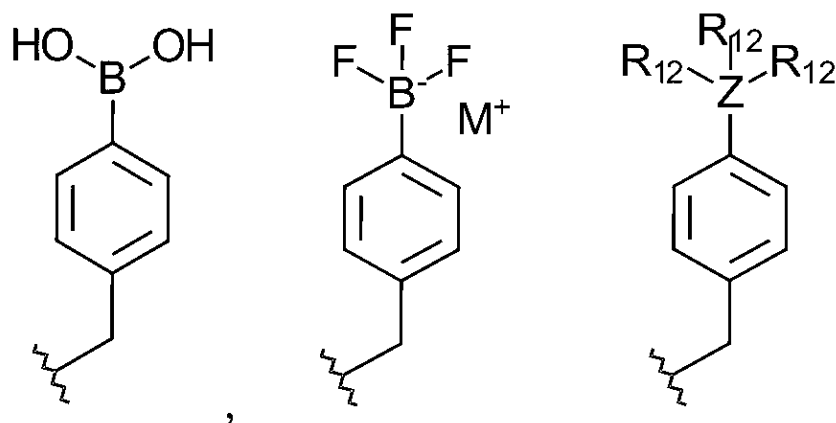
【0060】

から選択される保護基であり、

Y_2 は、

【0061】

【化10】



30

【0062】

、 $t-Bu$ 及び CH_2Ph から選択される保護基であり、

M^+ は、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 又は $N(R_{13})_4^+$ であり、

Z は、Si又はGeであり、

R_{12} は、 C_{1-6} アルキル又は $C(O)-(C_{5-20}$ アリール)であり、

R_{13} は、H、 C_{1-6} アルキル、アリール又は C_{5-20} アリールであり、

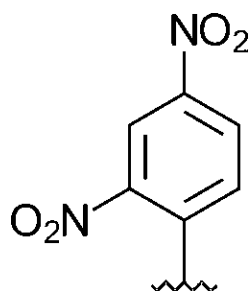
Y_3 は、保護基

【0063】

40

50

【化 1 1】



10

【0064】

である]

の非天然アミノ酸又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物が記載される。

【0065】

用語「又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物」は、示された構造の塩、溶媒和物、互変異性体、異性体形態も含まれることを意味する。その混合物は、これらの形態の混合物が存在すること、例えば、本発明の化合物が互変異性体の塩を含み得ることを意味する。

20

【0066】

「薬学的に許容される」物質は、健全な医学的判断の範囲内で、対象の組織と接触して使用するのに好適であって、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などがなく、合理的な利益対リスク比に相応し、それらの意図された使用に効果的な物質を指す。

【0067】

「医薬組成物」は、1種又は2種以上の原薬と1種又は2種以上の賦形剤との組合せを指す。

【0068】

本明細書中で使用するように、「溶媒和物」は、溶質（例えば、式（I）～（II）又は本明細書中の任意の他の化合物若しくはその塩）と溶媒によって形成された可変化学量論の複合体(complex of variable stoichiometry)を指す。薬学的に許容される溶媒和物は、結晶化の間中に溶媒分子が結晶格子中に組み込まれる結晶化合物の場合に形成され得る。組み込まれる溶媒分子は、水分子又は非水分子、例えば、これらに限定されないが、エタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド、酢酸、エタノールアミン及び酢酸エチル分子であり得る。

30

【0069】

「独立して選択される」は、例えば、「R₃又はR₄はそれぞれ、H、ハロ、C₁₋₆アルキル、．．．から独立して選択され」という文脈に関連して使用され、官能基の各事例、例えば、R₃が、列挙された選択肢から、化合物中のR₃又はR₄のあらゆる他の事例とは独立して選択されることを意味する。したがって、例えば、化合物中のR₃の第1の事例ではHが選択され得、化合物中のR₃の次の事例ではメチルが選択され得、化合物中のR₄の第1の事例ではエチルが選択され得る。

40

【0070】

本明細書中で、C₁₋₆アルキルは、一般に1～6個の炭素原子を有する、直鎖及び分枝飽和炭化水素基、より好適には、C₁₋₅アルキル、より好適にはC₁₋₄アルキル、より好適にはC₁₋₃アルキルを指す。アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、ペンター1-イル、ペンター2-イル、ペンター3-イル、3-メチルブター1-イル、3-メチルブタ

50

－２－イル、２－メチルブター２－イル、２，２，２－トリメチルエター１－イル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチルなどが挙げられる。

【００７１】

本明細書中で、「アミノ酸残基」は、アミノ酸のアミン又はカルボン酸末端のいずれかがペプチド結合で置き換えられているアミノ酸を指す。

【００７２】

C₅－２０アリールは、少なくとも１つの芳香環を有し、それらの環員を構成する特定の数の炭素原子を有する、完全に不飽和の単環式、二環式及び多環式芳香族炭化水素を指す（例えば、C₆－１４アリールは、環員として６～１４個の炭素原子を有するアリール基を指す）。アリール基は、そのような結合又は置換が原子価要件に反しない限り、任意の環原子において親基又は基質に結合でき、１つ又は２つ以上の非水素置換基を含むことができる。アリール基の例としては、フェニル、ビフェニル、シクロブタベンゼニル、ナフタレニル、ベンゾシクロヘプテニル、アズレニル、ビフェニレニル、アントラセニル、フェナントレニル、ナフタセニル、ピレニル、シクロヘプタトリエンカチオンに由来する基などが挙げられる。少なくとも１つが芳香環である縮合環を含むアリール基の例としては、これらに限定されないが、インダニル、インデニル、イソインデニル、テトラリニル、アセナフテニル、フルオレニル、フェナレニル、アセフェナントレニル及びアセアントレニルが挙げられる。

【００７３】

「ハロ」又は「ハロゲン」は、－Ｆ、－ＣＩ、－Ｂｒ又は－Ｉを指す。

【００７４】

「C₁－６ハロアルキル」は、水素原子のうちの１つ又は２つ以上がハロ原子で置き換えられているC₁－６アルキル基に由来する基を指す。好適には、C₁－６ハロアルキルは、CH₂F、CHF₂、CF₃、CH₂Cl、CHCl₂又はCCl₃である。

【００７５】

「C₃－２０ヘテロアリール」は、炭素又はヘテロ原子のいずれであろうと、３～２０個の環原子を含み、そのうち１～１０個が環ヘテロ原子である、不飽和の単環式、二環式及び多環式芳香族基を指す。好適には、各環は、３～７個の環原子及び１～４個のヘテロ原子を有する。好適には、各環ヘテロ原子は、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される。二環式及び多環式は、前記で列挙した単環式複素環のいずれかがベンゼン環に縮合している、あらゆる二環式又は多環式基を含み得る。ヘテロアリール基は、そのような結合又は置換が原子価要件に反しない又は化学的に不安定な化合物をもたらさない限り、任意の環原子において親基又は基質に結合でき、１つ又は２つ以上の非水素置換基を含むことができる。

【００７６】

単環式ヘテロアリール基の例としては、これらに限定されないが、以下に由来するものが挙げられる：

N₁： ピロール、ピリジン；

O₁： フラン；

S₁： チオフェン；

N₁O₁： オキサゾール、イソオキサゾール、イソオキサジン；

N₂O₁： オキサジアゾール（例えば、１－オキサー２，３－ジアゾリル、１－オキサー２，４－ジアゾリル、１－オキサー２，５－ジアゾリル、１－オキサー３，４－ジアゾリル）；

N₃O₁： オキサトリアゾール；

N₁S₁： チアゾール、イソチアゾール；

N₂： イミダゾール、ピラゾール、ピリダジン、ピリミジン（例えば、シトシン、チミン、ウラシル）、ピラジン；

N₃： トリアゾール、トリアジン；及び

N₄： テトラゾール。

【0077】

縮合環を含むヘテロアリールの例としては、これらに限定されないが、以下に由来するものが挙げられる：

O₁： ベンゾフラン、イソベンゾフラン、クロメン、イソクロメン、クロマン、イソクロマン、ジベンゾフラン、キサテン；

N₁： インドール、イソインドール、インドリジン、イソインドリン、キノリン、イソキノリン、キノリジン、カルバゾール、アクリジン、フェナントリジン；

S₁： ベンゾチオフラン、ジベンゾチオフェン、チオキサテン；

N₁O₁： ベンゾオキサゾール、ベンゾイソオキサゾール、ベンゾオキサジン、フェノキサジン；

N₁S₁： ベンゾチアゾール、フェノチアジン；

O₁S₁： フェノキサチン；

N₂： ベンゾイミダール、インダゾール、ベンゾジアジン、ピリドピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、フタラジン、ナフチリジン、ベンゾジアゼピン、カルボリン、ペリミジン、ピリドインドール、フェナジン、フェナントロリン、フェナジン；

O₂： ベンゾジオキサソール、ベンゾジオキサソ、オキサントレン；

S₂： チアントレン；

N₂O₁： ベンゾフラザン；

N₂S₁： ベントチアジアゾール；

N₃： ベンゾトリアゾール；

N₄： プリン（例えば、アデニン、グアニン）、プテリジン。

【0078】

「C₃₋₂₀ヘテロシクリル」は、炭素原子又はヘテロ原子のいずれであろうと、3～20個の環原子から構成され、そのうち1～10個が環ヘテロ原子である、環原子を有する、飽和又は部分不飽和の単環式、二環式及び多環式基を指す。好適には、各環は3～7個の環原子及び1～4個のヘテロ原子を有する（例えば、好適には、C₃₋₅ヘテロシクリルは、3～5個の環原子及び1～4個のヘテロ原子を環員として有するヘテロシクリル基を指す）。環ヘテロ原子は、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される。

【0079】

二環式シクロアルキル基と同様に、二環式ヘテロシクリル基は、孤立した環、スピロ環、縮合環及び架橋環を含み得る。ヘテロシクリル基は、そのような結合又は置換が原子価要件に反しない又は化学的に不安定な化合物をもたらさない限り、任意の環原子において親基又は基質に結合でき、1つ又は2つ以上の非水素置換基を含むことができる。

【0080】

単環式ヘテロシクリル基の例としては、これらに限定されないが、以下に由来するものが挙げられる：

N₁： アジリジン、アゼチジン、ピロリジン、ピロリン、2H-ピロール又は3H-ピロール、ピペリジン、ジヒドロピリジン、テトラヒドロピリジン、アゼピン；

O₁： オキシラン、オキセタン、テトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、テトラヒドロピラン、ジヒドロピラン、ピラン、オキセピン；

S₁： チイラン、チエタン、テトラヒドロチオフェン、テトラヒドロチオピラン、チエパン；

O₂： ジオキサラン (dioxoiane)、ジオキサソ及びジオキセパン；

O₃： トリオキサソ；

N₂： イミダゾリジン (imidazoiidine)、ピラゾリジン、イミダゾリン、ピラゾリン、ピペラジン；

N₁O₁： テトラヒドロオキサゾール、ジヒドロオキサゾール、テトラヒドロイソオキサゾール、ジヒドロイソオキサゾール、モルホリン、テトラヒドロオキサジン、ジヒドロオキサジン、オキサジン；

N₁S₁： チアゾリン、チアゾリジン、チオモルホリン；

N_2O_1 : オキサジアジン ;

O_1S_1 : オキサチオール及びオキサチアン (チオキサン) ; 並びに

$N_1O_1S_1$: オキサチアジン。

【0081】

置換単環式ヘテロシクリル基の例としては、環状形態の糖、例えば、フラノース、例えば、アラビノフラノース、リキソフラノース、リボフラノース及びキシロフラノース、並びにピラノース、例えば、アロピラノース (aliopyranose)、アルトロピラノース、グルコピラノース、マンノピラノース、グロピラノース、イドピラノース、ガラクトピラノース及びタロピラノースに由来するものが挙げられる。

【0082】

本明細書中で使用する用語「ペプチド」は、ペプチド結合によって互いに結合された複数のアミノ酸残基を含む直鎖分子を指す。

【0083】

保護基は、官能基の化学修飾によって分子中に導入されて、官能基の特徴的な化学的性質を一時的にマスクして、官能基が別の反応に干渉するのを防ぐ基である。光分解反応によって除去され得る (例えば、光分解反応によって除去され得る / 除去可能である / 脱保護され得る) 保護基は、放射線エネルギー、例えば、光によって除去され得る基である。保護基は、Wuts, P.G.M. and Greene, T.W., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Edition, Wiley-Interscience, 2007及びP. Kocienski, *Protective Groups*, 3rd Edition (2005)に記載されている。

【0084】

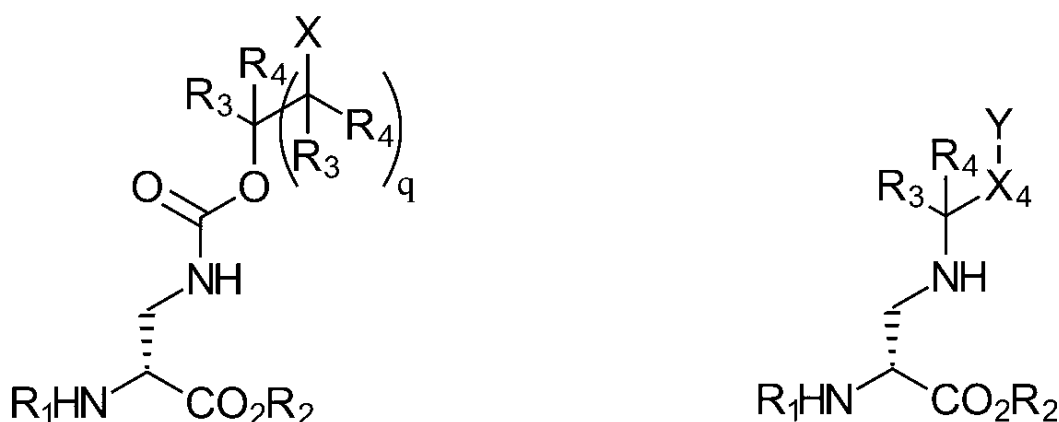
「糖」置換基は、糖のヒドロキシル基からのHが、式 (I) 又は (II) の化合物の残りの部分に糖置換基を結合する結合で置き換えられた単糖又は多糖を表す。好適には、糖は単糖である。好適には、糖は、グルコース、マンノース又はガラクトースである。好適には、保護基は光不安定性であり、したがって、300 nm超の波長 λ_{max} において脱保護され得る。これらは、生体系に有害でない波長である。

【0085】

一態様において、好適には、式 (I) 又は (II) の非天然アミノ酸は、

【0086】

【化12】

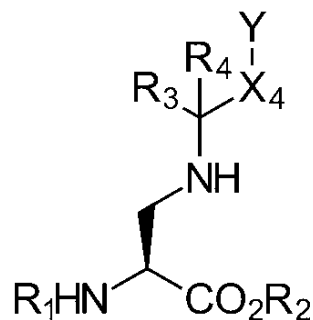
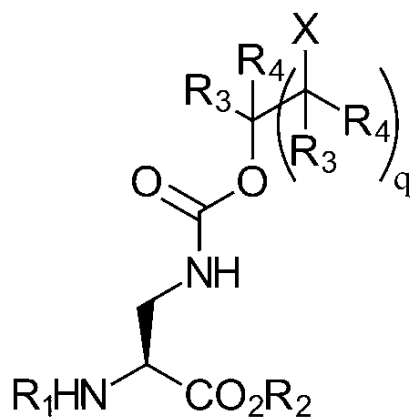


【0087】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。したがって、この態様において、式 (I) 又は (II) の非天然アミノ酸はD型である。

【0088】

より好適には、式 (I) 又は (II) の非天然アミノ酸は、
 【0089】
 【化13】



10

【0090】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。したがって、このより好適な態様において、式 (I) 又は (II) の非天然アミノ酸は L 型である。

20

【0091】

好適には、式 (I) 又は (II) の非天然アミノ酸は、

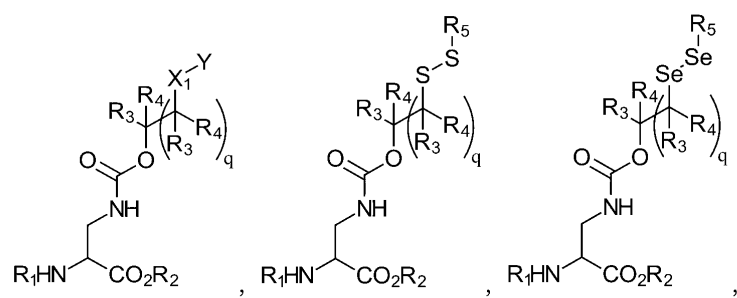
【0092】

30

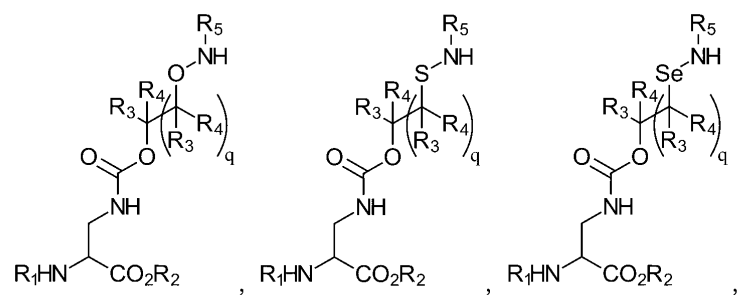
40

50

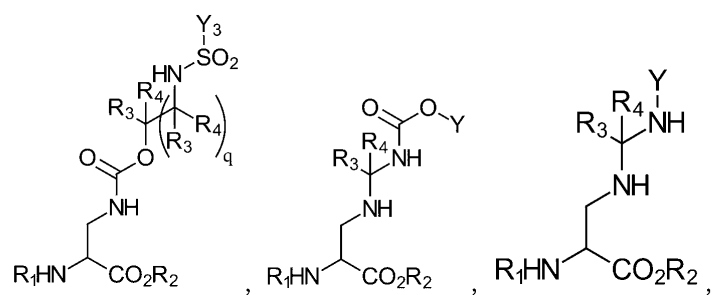
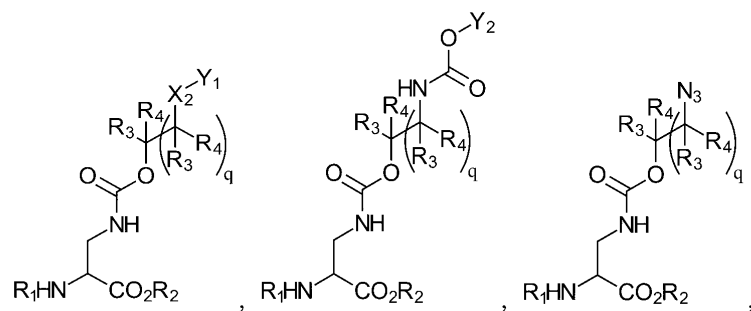
【化 1 4】



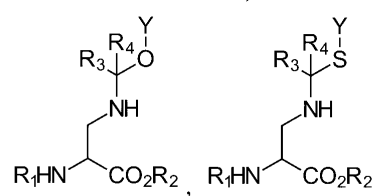
10



20



30



40

【0093】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。好適には、式（Ⅰ）又は（Ⅱ）の前記非天然アミノ酸はD型である。より好適には、式（Ⅰ）又は（Ⅱ）の前記非天然アミノ酸はL型である。

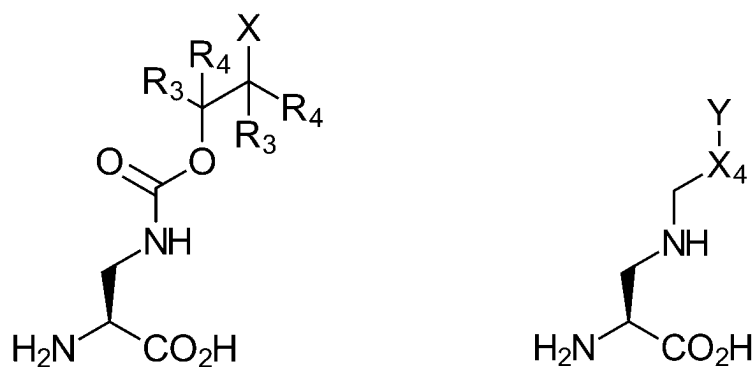
【0094】

より好適には、式（Ⅰ）又は（Ⅱ）の非天然アミノ酸は、

【0095】

50

【化 1 5】



10

【 0 0 9 6】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【 0 0 9 7】

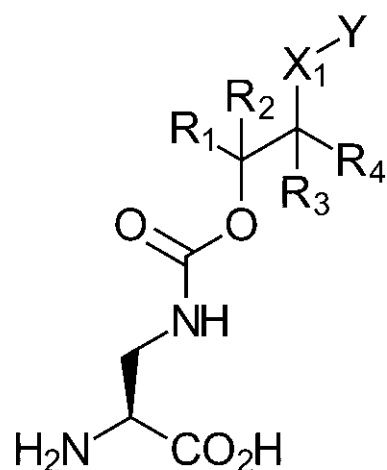
好適には、非天然アミノ酸は、式（Ⅰ）の非天然アミノ酸又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【 0 0 9 8】

好適には、式（Ⅰ）の非天然アミノ酸は、下記式

【 0 0 9 9】

【化 1 6】



30

40

【 0 1 0 0】

を有する又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

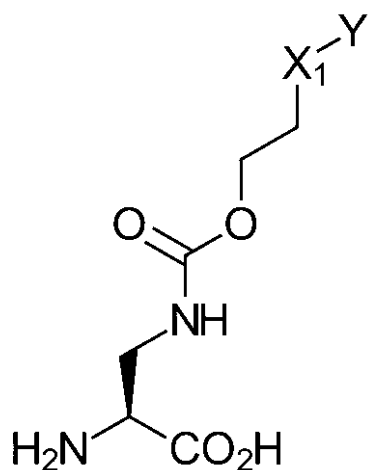
【 0 1 0 1】

好適には、式（Ⅰ）の非天然アミノ酸は、下記式

【 0 1 0 2】

50

【化 17】



10

【0103】

を有する又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

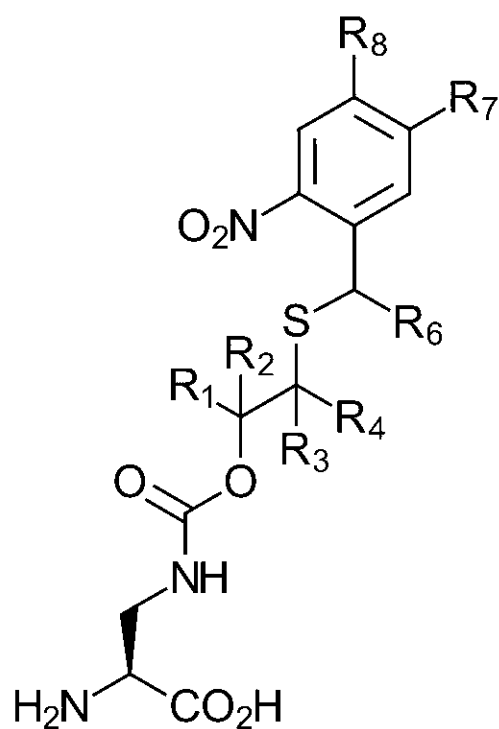
20

【0104】

好適には、式 (I) の非天然アミノ酸は、下記式

【0105】

【化 18】



30

40

【0106】

50

を有する又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【0107】

好適には、 X は、 X_1-Y 、 $S-S-R_5$ 、 $O-NH-R_5$ 、 $S-NH-R_5$ 、 X_2-Y_1 、 X_3-Y_2 、 N_3 又は $NH-S(O)_2-Y_3$ である。好適には、 X は、 X_1-Y 、 X_2-Y_1 、 X_3-Y_2 、 N_3 又は $NH-S(O)_2-Y_3$ である。より好適には、 X は X_1-Y である。

【0108】

好適には、 X_1 は、 S 、 Se 、 O 、 NH 、 $N(CH_3)$ 又は $N(CH_2CH_3)$ である。より好適には、 X_1 は、 S 又は O である。より好適には、 X_1 は S である。

【0109】

好適には、 X_2 は、 S 又は O である。好適には、 X_2 は S である。

【0110】

好適には、 X_4 は、 $NH-C(O)-O$ 、 O 、 S 又は NH である。好適には、 X_4 は $NH-C(O)-O$ である。

【0111】

好適には、 X_5 は、 S 、 O 、 NH 、 $N-C(O)-O-CH_3$ 、 $N-C(O)-O-CH_2CH_3$ 、 $N-C(O)-O-Ph$ 、 $N-S(O)_2CH_3$ 、 $N-S(O)_2CH_2CH_3$ 、 $N-CH_3$ 、 $N-CH_2CH_3$ 又は $N-Ph$ である。より好適には、 X_5 は、 S 、 O 、 NH 又は $N-CH_3$ である。

【0112】

R_1 は、 H 、アミノ酸残基又はペプチドである。好適には、 R_1 は、 H 、又はタンパク質構成アミノ酸残基である。最も好適には、 R_1 は H である。

【0113】

好適には、 R_2 は、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル又はフェニルである。より好適には、 R_2 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 又はフェニルである。より好適には、 R_2 は H である。

【0114】

好適には、 q は、1又は2である。より好適には、 q は1である。

【0115】

好適には、 R_3 及び R_4 はそれぞれ、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 Ph 、ピリジル、ピロリル、イミダゾリル、 OCH_3 、 OCH_2CH_3 、 SCH_3 、 SCH_2CH_3 、 $NH(CH_3)$ 、 $NH(CH_2CH_3)$ 、 $N(CH_3)_2$ 及び $N(CH_2CH_3)_2$ から独立して選択される。

【0116】

好適には、各 R_3 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 Ph 、 OCH_3 又は OCH_2CH_3 である。より好適には、各 R_3 は H である。

【0117】

好適には、各 R_4 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 Ph 、 OCH_3 又は OCH_2CH_3 である。より好適には、各 R_4 は H である。

【0118】

好適には、 R_5 は、 H 、ハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{5-20} アリール、 C_{3-20} ヘテロアリール、 OC_{1-6} アルキル、 $NH(C_{1-6}$ アルキル)及び $N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ から選択される。

【0119】

より好適には、 R_5 は、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 Ph 、ピリジル、ピロリル、イミダゾリル、 OCH_3 、 OCH_2CH_3 、 SCH_3 、 SCH_2CH_3 、 $NH(CH_3)$ 、 $NH(CH_2CH_3)$ 、 $N(CH_3)_2$ 又は $N(CH_2CH_3)_2$ である。

【0120】

R_6 又は R_9 が H 以外の置換基である場合、保護基 Y は、 R_6 又は R_9 が結合している炭

10

20

30

40

50

素に立体中心を含む。好適には、Y は、ラセミ混合物であり、又は R₆ 若しくは R₉ が結合している炭素における立体中心に関して (R) 配置又は (S) 配置を有する。

【0121】

一部の態様において、より好適には、Y は、R₆ 又は R₉ が結合している炭素における立体中心に関して (R) 配置を有する。

【0122】

一部の態様において、より好適には、Y は、R₆ 又は R₉ が結合している炭素における立体中心に関して (S) 配置を有する。

【0123】

好適には、式 (I) 若しくは (II) の化合物又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物は、Y 基を含む。

10

【0124】

好適には、Y は、

【0125】

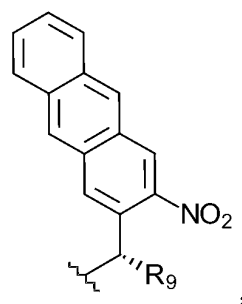
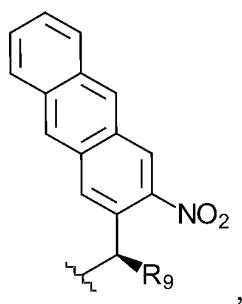
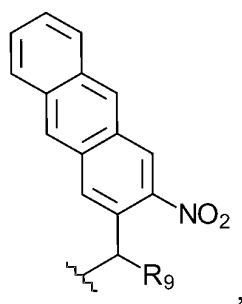
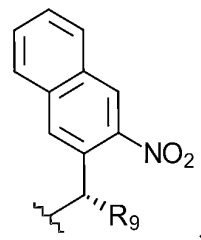
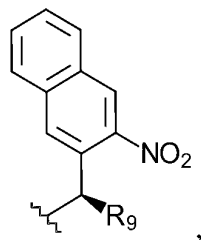
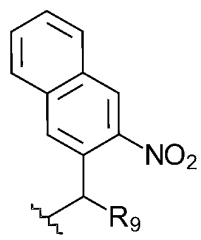
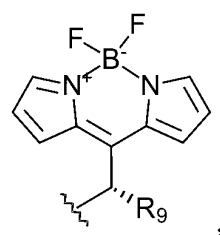
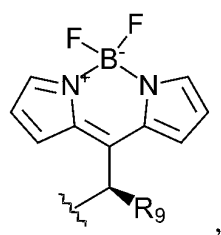
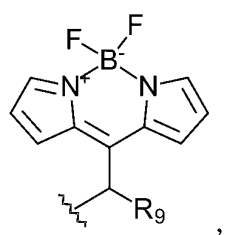
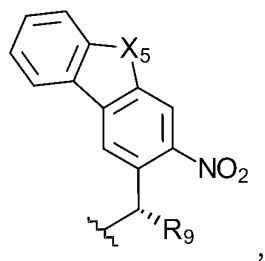
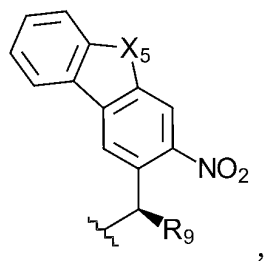
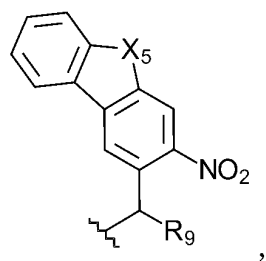
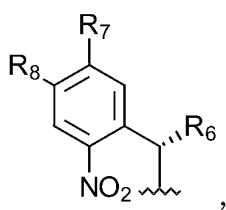
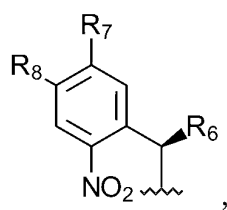
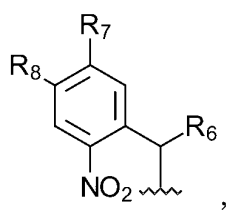
20

30

40

50

【化 19】



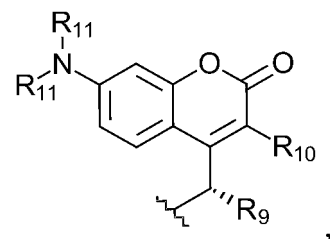
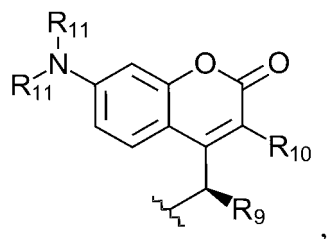
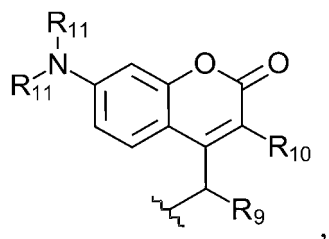
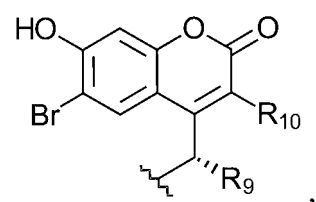
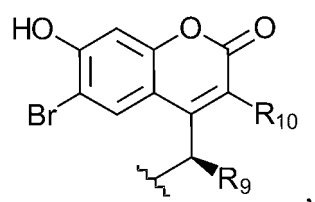
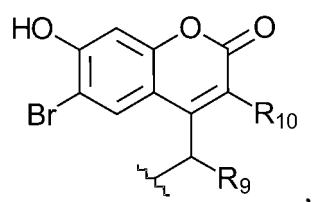
10

20

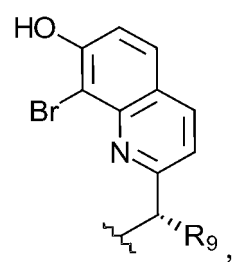
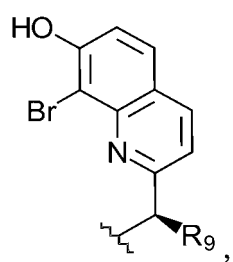
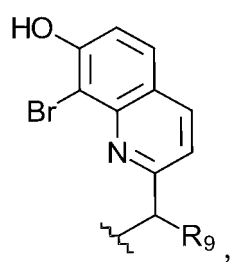
30

40

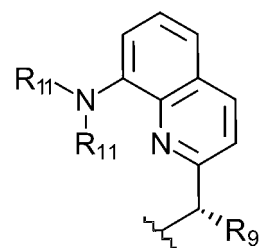
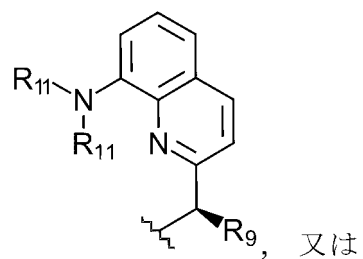
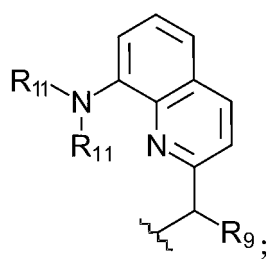
50



10



20



30

【 0 1 2 6 】

である。

【 0 1 2 7 】

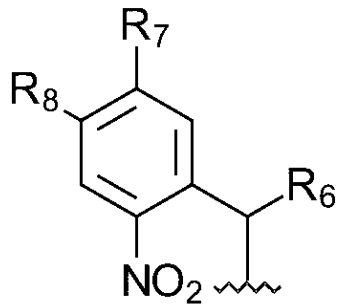
より好適には、非天然アミノ酸は、

【 0 1 2 8 】

40

50

【化 2 0】



10

【0 1 2 9】

である Y 基を含む。

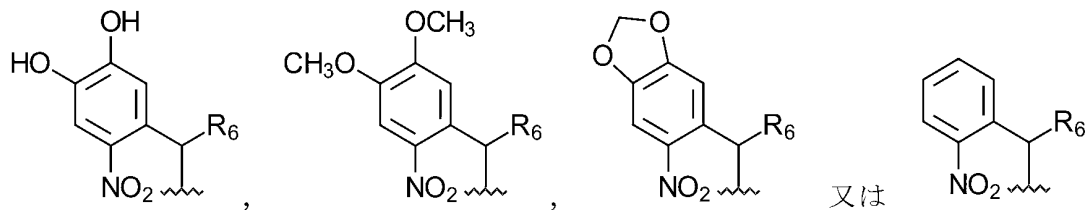
【0 1 3 0】

より好適には、非天然アミノ酸は、

【0 1 3 1】

【化 2 1】

20



又は

30

【0 1 3 2】

である Y 基を含む。

【0 1 3 3】

好適には、 R_6 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 CO_2H 、 CO_2CH_3 、 $CO_2CH_2CH_3$ 及び Ph から選択される。

【0 1 3 4】

より好適には、 R_6 は CH_3 である。

【0 1 3 5】

好適には、 R_7 及び R_8 は、 H 、 OH 、 OCH_3 、 OCH_2CH_3 及び $O-Ph$ から独立して選択されるか、又は R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成する。

【0 1 3 6】

一部の態様において、より好適には、 R_7 及び R_8 は同じである。好適には、 R_7 及び R_8 は、 H 、 OH 、 OCH_3 若しくは OCH_2CH_3 であるか、又は R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成する。

【0 1 3 7】

より好適には、 R_7 及び R_8 は一緒に連結されて、 $O-CH_2-O$ 基を形成する。

【0 1 3 8】

好適には、各 R' は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 及び Ph から独立して選択される。

【0 1 3 9】

50

好適には、 R_9 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CF_3 、 CO_2H 、 CO_2CH_3 、 $CO_2CH_2CH_3$ 及び Ph から選択される。好適には、 R_9 は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 及び CF_3 から選択される。

【0140】

好適には、 R_{10} は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 及び CF_3 から選択される。

【0141】

好適には、 R_{11} は、 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 及び CF_3 から選択される。

【0142】

好適には、一態様において、 M^+ は、 Li^+ 、 Na^+ 又は K^+ である。

【0143】

一態様において、 M^+ は Li^+ である。代替的な一態様において、 M^+ は Na^+ である。代替的な一態様において、 M^+ は $N(R_{13})_4^+$ である。より好適な一態様において、 M^+ は K^+ である。

【0144】

一態様において、 Z は Si である。

代替的な一態様において、 Z は Ge である。

【0145】

好適には、 R_{12} は、 CH_3 、 CH_2CH_3 又は $C(O)-(Ph)$ である。

【0146】

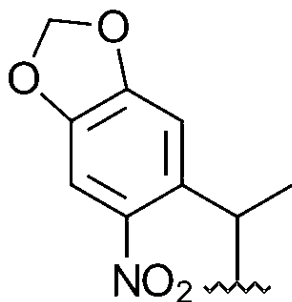
一態様において、好適には、 R_{13} は、 C_{1-6} アルキル、アリル又は C_{5-20} アリールである。代替的な一態様において、好適には、 R_{13} は、 H 、 CH_3 若しくは CH_2CH_3 又はアリルである。好適には、 R_{13} は、 CH_3 又は CH_2CH_3 である。

【0147】

より好適には、 Y は、

【0148】

【化22】



【0149】

である。

【0150】

一部の態様において、 Y は、

【0151】

10

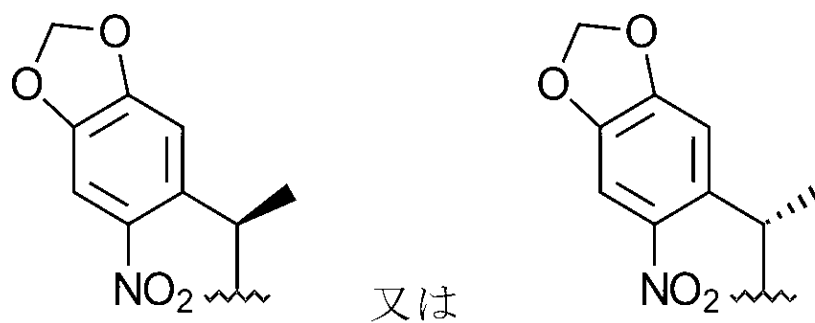
20

30

40

50

【化 2 3】



10

【 0 1 5 2】

である。

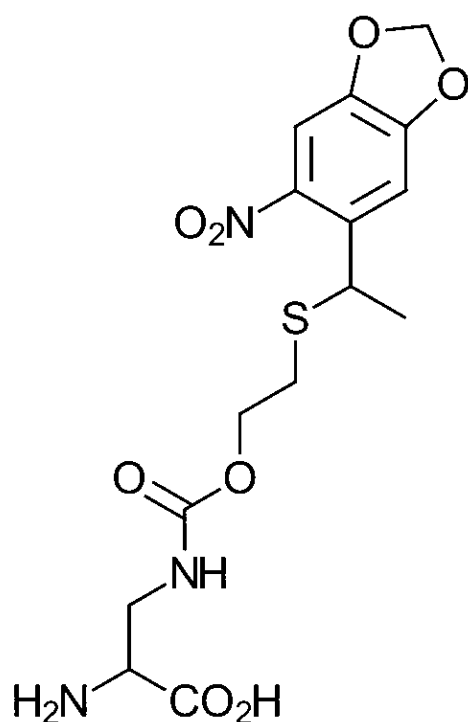
【 0 1 5 3】

一実施形態において、式 (I) 又は (II) の化合物は、

【 0 1 5 4】

【化 2 4】

20



30

40

【 0 1 5 5】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

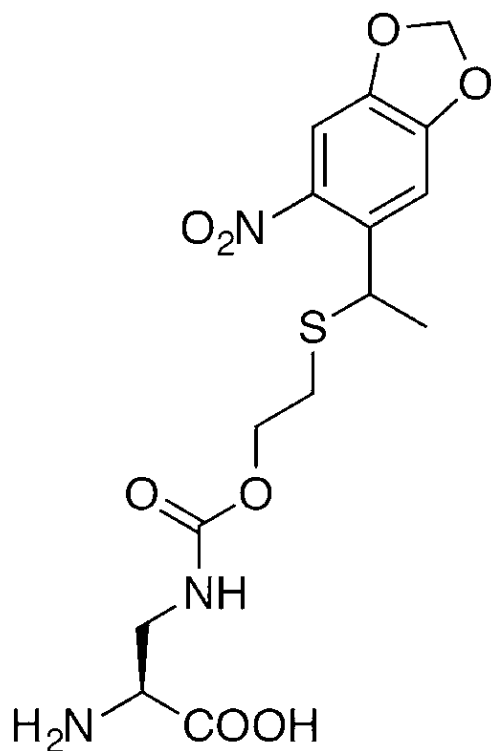
【 0 1 5 6】

非常に好適な実施形態は、

【 0 1 5 7】

50

【化 2 5】



10

20

【0158】

として表されるか、又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【0159】

この実施形態は、本明細書中において、「6」若しくは「化合物6」又は「DAP5」と称することがあり、これらの名称はそれぞれ、前記で示した同じ化学構造を指す。

30

【0160】

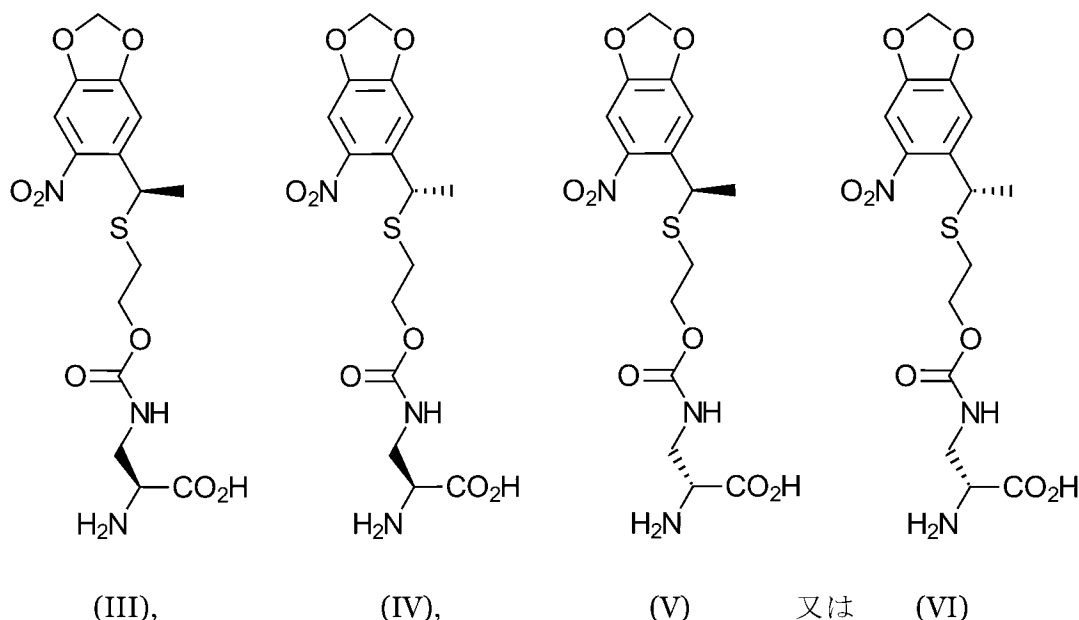
一態様において、より好適には、非天然アミノ酸は、

【0161】

40

50

【化 2 6】



10

20

【0162】

又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【0163】

より好適には、非天然アミノ酸は、式 (III) 若しくは (IV) の化合物又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。一態様において、非天然アミノ酸は、式 (III) の化合物又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。別の態様において、非天然アミノ酸は、式 (IV) の化合物又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物である。

【0164】

一態様において、図3の化合物2、3、4又は5のうちの1種若しくは2種以上を、前述のシンテターゼ、又は例えば、(Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. Journal of the American Chemical Society 136, 2240-2243 (2014)) に記載されているシンテターゼ、すなわち、変異 N311M、C313Q、V366G、W382N、R85H を有する MbPyLRS であるシンテターゼ「PCC1RS」を使用して、インビトロ翻訳系において使用できる。この PCC1RS シンテターゼは、非常に類似した非天然アミノ酸 (光ケージ化 (photocaged) システイン) を組み込んでおり、本発明者らは、それが、1 原子 (又は水素原子と共に 2 原子) のみ異なる保護バージョンの DAP を受け入れるであろうと主張する。別の技術は、tRNA に任意のアミノ酸を実質的にロードすることができる、いわゆる「フレキシザイム」を tRNA にロードすることにあるであろう (例えば、Morimoto et al., 2011, Acc. Chem Res. 44 を参照)。その場合、これらはインビトロ系で使用できるであろう。理論によって拘束されることを望まないが、本発明者らは、図3の類似化合物2、3、4又は5は、細胞に入ることができないため、細胞内で機能しないと考える。

30

40

【0165】

他の形態

特に明記しない限り、これらの置換基の周知のイオン、塩又は溶媒和物形態は、前記に含まれる。例えば、カルボン酸 ($-COOH$) への言及はまた、そのアニオン (カルボキシレート) 形態 ($-COO^-$)、塩又は溶媒和物を含む。同様に、アミノ酸への言及は、アミノ基のプロトン化形態 ($-NH^+HR^1R^2$)、塩又は溶媒和物、例えば、塩酸塩を含む

50

。同様に、ヒドロキシル基の言及はまた、そのアニオン形態 (O^-)、塩又は溶媒和物を含む。

【0166】

異性体、塩及び溶媒和物

ある特定の化合物は、1つ又は2つ以上の幾何学的形態、光学的形態、エナンチオマー形態、ジアステレオマー形態、エピマー形態、アトロプ形態、立体異性体形態、互変異性体形態、立体配座形態又はアノマー形態で存在し得、その例としては、これらに限定されないが、*c i s*型及び*t r a n s*型；*E*型及び*Z*型；*c*型、*t*型及び*r*型；エンド型及びエキソ型；*R*型、*S*型及びメソ型；*D*型及び*L*型；*d*型及び*l*型； $(+)$ 型及び $(-)$ 型；ケト型、エノール型及びエノレート型；*s y n*型及び*a n t i*型；シンクリナル型及びアンチクリナル型；アルファ型及びベータ型；アキシアル型及びエクアトリアル型；舟型、いす型、ねじれ型、エンベロープ型及び半いす型；並びにこれらの組合せが挙げられ、これらを「異性体」（又は「異性体形態」）と総称する。

10

【0167】

互変異性体形態に関して以下で論じるように、本明細書中に記載する用語「異性体」からは、構造異性体 (structural isomer) (構造異性体 (constitutional isomer)) (すなわち、単に原子の空間的位置ではなく原子間の接続が異なる異性体) は除外することに留意されたい。例えば、メトキシ基、 OCH_3 への言及は、その構造異性体、ヒドロキシメチル基、 CH_2OH への言及と解釈してはならない。

【0168】

構造の種類への言及は、その種類の範囲に入る構造的な異性体の形態を含むとってよい (例えば、 C_{1-7} アルキルは*n*-プロピル及びイソプロピルを含み、ブチルは*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル及び*tert*-ブチルを含み、メトキシフェニルはオルト-メトキシフェニル、メタ-メトキシフェニル及びパラ-メトキシフェニルを含む)。

20

【0169】

上記の除外は、互変異性体形態、例えば、アミド／イミノアルコール $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}=\text{C}(\text{OH})-$ ；又はケト型、エノール型及びエノレート型、例えば、以下の互変異性体対：ケト／エノール、イミン／エナミン、アミド／イミノアルコール、アミジン／アミジン、ニトロソ／オキシム、チオケトン／エンチオール、*N*-ニトロソ／ヒドロキシアゾ及びニトロ／*aci*-ニトロにおけるようなものには適用されない。

30

【0170】

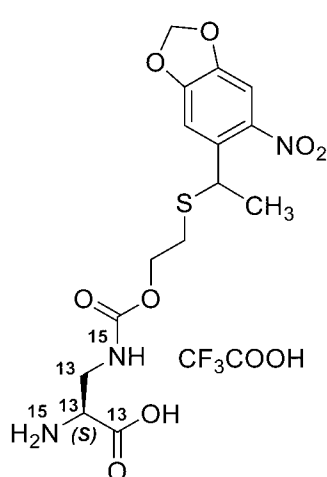
用語「異性体」には、特に、1つ又は2つ以上の同位体置換を有する化合物が含まれることに留意されたい。例えば、*H*は、 ^1H 、 ^2H (*D*) 及び ^3H (*T*) を含む任意の同位体形態であり得；*C*は、 ^{11}C 、 ^{12}C 、 ^{13}C 及び ^{14}C を含む任意の同位体形態であり得；*O*は、 ^{16}O 及び ^{18}O を含む任意の同位体形態であり得る、などである。例えば、化合物6は、以下：

【0171】

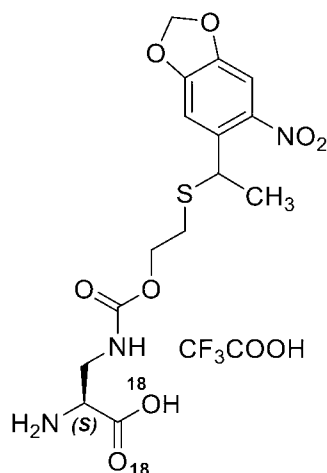
40

50

【化 2 7】



又は



10

【0 1 7 2】

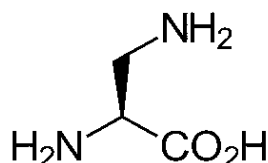
に示される、 ^{13}C 及び ^{15}N 同位体標識化合物又は ^{18}O 同位体標識化合物であり得る。

【0 1 7 3】

特に明記しない限り、特定の化合物への言及は、その（全又は部分）ラセミ混合物及びあらゆる他の混合物を含む、このような異性体形態の全てを含む。他の方法で指定される結合の一例は、以下：

【0 1 7 4】

【化 2 8】



20

30

【0 1 7 5】

に示す指定された立体化学構造を有する DAP 中の CH 基である。

【0 1 7 6】

このような異性体形態の調製の方法（例えば、不斉合成）及び分離の方法（例えば、分別結晶及びクロマトグラフィー手段）は、当技術分野において公知であり、又は本明細書中に教示した方法若しくは公知の方法を公知のやり方で適合させることによって、容易に得ることができる。

40

【0 1 7 7】

特に明記しない限り、特定の化合物への言及は、例えば以下に論じる、そのイオン、塩、溶媒和物及び保護形態も含む。

【0 1 7 8】

一部の実施形態において、式 (I) 又は (II) の化合物又はその塩、溶媒和物、互変異性体、異性体若しくは混合物は、式 (I) 又は (II) の化合物の薬学的に許容される塩を含む。

【0 1 7 9】

前記で具体的に名前を挙げた化合物を含む、式 (I) 又は (II) の化合物は、薬学的に許容される複合体、塩、溶媒和物及び水和物を含み得る。これらの塩は、無毒性の酸付加塩

50

(二酸を含む) 及び塩基塩 (base salt) を含む。

【0180】

化合物がカチオン性である又はカチオン性であり得る官能基 (例えば、 $-NH_2$ は $-NH_3^+$ であり得る) を有する場合、好適なアニオンと共に酸付加塩が形成され得る。好適な無機アニオンの例としては、これらに限定されないが、以下の無機酸：塩酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、硫酸、亜硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、フッ化水素酸、リン酸及び亜リン酸に由来するものが挙げられる。好適な有機アニオンの例としては、これらに限定されないが、以下の有機酸：2-アセチオキシ安息香酸 (2-acetyoxybenzoic acid)、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、桂皮酸、クエン酸、エデト酸、エタンジスルホン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン (gluchep tonic) 酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフタレンカルボン酸、イセチオン酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、オレイン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、フェニルスルホン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、酒石酸、トルエンスルホン酸及び吉草酸に由来するものが挙げられる。好適なポリマー有機アニオンの例としては、これらに限定されないが、以下のポリマー酸：タンニン酸、カルボキシメチルセルロースに由来するものが挙げられる。このような塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、重炭酸塩、炭酸塩、重硫酸塩、硫酸塩、ホウ酸塩、カンシル酸塩、クエン酸塩、シクラミン酸塩、エジシル酸塩、エシル酸塩 (esylate)、ギ酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヒベンズ酸塩、塩酸塩／塩化物、臭化水素酸塩／臭化物、ヨウ化水素酸塩／ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メシル酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフチル酸塩 (naphthylate)、2-ナフシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オロチン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩、ピログルタミン酸塩、サッカリン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩及びキシノホエート (xinofoate) 塩が含まれる。

【0181】

例えば、化合物がアニオン性である又はアニオン性であり得る官能基 (例えば、 $-COOH$ は $-COO^-$ であり得る) を有する場合、好適なカチオンと共に塩基塩が形成され得る。好適な無機カチオンの例としては、これらに限定されないが、アルカリ金属又はアルカリ土類金属カチオン等の金属カチオン、アンモニウム及び置換アンモニウムカチオン並びにアミンが挙げられる。好適な金属カチオンの例としては、ナトリウム (Na^+)、カリウム (K^+)、マグネシウム (Mg^{2+})、カルシウム (Ca^{2+})、亜鉛 (Zn^{2+}) 及びアルミニウム (Al^{3+}) が挙げられる。好適な有機カチオンの例としては、これらに限定されないが、アンモニウムイオン (すなわち、 NH_4^+) 及び置換アンモニウムイオン (例えば、 NH_3R^+ 、 $NH_2R_2^+$ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+) が挙げられる。幾つかの好適な置換アンモニウムイオンの例は、エチルアミン、ジエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミン及びトロメタミン、並びにアミノ酸、例えば、リジン及びアルギニンに由来するものである。通常の第四級アンモニウムイオンの一例は、 $N(CH_3)_4^+$ である。好適なアミンの例としては、アルギニン、 N 、 N' -ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、グリシン、リジン、 N -メチルグルカミン、オラミン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1, 3-ジオール及びプロカインが挙げられる。有用な酸付加塩及び塩基塩についての論考については、S. M. Berge et al., J. Pharm. Sci. (1977) 66:1-19を参照；また、Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (2011)を参照。

【0182】

薬学的に許容される塩は、種々の方法を使用して調製し得る。例えば、式(I)又は(II)の化合物を適切な酸又は塩基を反応させて、所望の塩を生じてよい。また、式(I)又は(II)の化合物の前駆体を酸又は塩基を反応させて、酸不安定基若しくは塩基不安定基を除去してもよく、又は前駆体のラクトン若しくはラクタム基を開環させてもよい。加えて、式(I)又は(II)の化合物の塩を、適切な酸若しくは塩基で処理することによって又はイオン交換樹脂を接触させることによって、別の塩に変換してもよい。反応に続いて、次に、塩が溶液から沈殿する場合は濾過して又は蒸発させて塩を回収することによって、塩を単離することができる。塩の電離度は、完全電離からほとんど非電離まで様々であり得る。

10

【0183】

活性化合物の対応する溶媒和物を調製、精製及び／又は取り扱うのが簡便である又は望ましい場合がある。用語「溶媒和物」は、化合物と1つ又は2つ以上の薬学的に許容される溶媒分子(例えば、 EtOH)とを含む分子複合体を表す。用語「水和物」は、溶媒が水である溶媒和物である。薬学的に許容される溶媒和物は、溶媒が同位体置換されている(例えば、 D_2O 、アセトン- d_6 、 DMSO-d_6)可能性があるものを含む。

【0184】

有機化合物の溶媒和物及び水和物に関する、現在認められている分類系は、孤立部位溶媒和物(isolated site solvate)、チャンネル溶媒和物(channel solvate)及び金属イオン配位溶媒和物及び水和物を区別するものである。例えば、K. R. Morris (H. G. Brittain ed.) Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1995)を参照。孤立部位溶媒和物及び水和物は、溶媒(例えば、水)分子が、有機化合物の介在分子によって互いの直接接触から孤立しているものである。チャンネル溶媒和物においては、溶媒分子は格子チャンネル中にあり、格子チャンネル中で、溶媒分子は他の溶媒分子に隣接している。金属イオン配位溶媒和物においては、溶媒分子は金属イオンに結合している。

20

【0185】

溶媒又は水が強固に結合している場合には、複合体は、湿度とは無関係の、明確に定義された化学量論を有することになる。しかし、チャンネル溶媒和物及び吸湿性化合物におけるように、溶媒又は水が弱く結合している場合には、水又は溶媒の含有率は、湿度及び乾燥条件によって異なることになる。このような場合、典型的には、非化学量論が観察されることになる。

30

【0186】

遺伝的組込み

遺伝的組込みによる本発明によるポリペプチドの生産に関しては、前記遺伝的組込みは好ましくは、直交性又は拡張遺伝暗号を使用する。この遺伝暗号においては、直交性tRNAシンテターゼ／tRNA対を使用することによって目的の非天然アミノ酸を遺伝的に組み込むことができるように、1つ又は2つ以上の特定の直交性コドンがその非天然アミノ酸をコードするように割り当てられている。直交性tRNAシンテターゼ／tRNA対は、原則として、tRNAに非天然アミノ酸をチャージできる及び直交性コドンに応答して目的の非天然アミノ酸をポリペプチド鎖に組み込むことができる、任意のこのような対であることができる。

40

【0187】

直交性コドンは、直交性コドンのアンバー、オーカー、オパール又は四つ組コドン(quadruplet codon)であり得る。コドンは単に、目的の非天然アミノ酸を運搬するのに使用されることになる直交性tRNAに対応しなければならないだけである。最も好適には、直交性コドンはアンバーである。

【0188】

本明細書中に示した具体例の多くは、アンバーコドン及び対応するtRNA／tRNAシンテターゼを使用したこと留意すべきである。前述の通り、これらは多様であり得る。あるいは、目的の非天然アミノ酸に働きかけることができる代替tRNA／tRNAシン

50

テターゼ対をわざわざ使用又は選択することなく他のコドンを使用するために、tRNAのアンチコドン領域を単に、最適のコドンに望ましいアンチコドン領域とスワップしてもよい。アンチコドン領域は、tRNAのチャージ又は組込み機能にもtRNAシンテターゼによる認識にも関与しないので、このようなスワップは完全に熟練作業者の領域内である。したがって、一部の実施形態において、本発明において使用するtRNAのアンチコドン領域、例えば、Mb tRNA_{CUA}又はMm tRNA_{CUA}は交換可能である、すなわち、アンチコドンをスワップして代わりのコドンを認識させるようにキメラtRNA_{CUA}を使用でき、その結果、オーカー、オパール又は四つ組コドンを含む、本明細書中で論じた異なる直交性コドンに回答して目的の非天然アミノ酸を組み込むことができ、それに対応して、目的の非天然アミノ酸を組み込もうとするポリペプチドをコードする核酸を変異させて、目的の非天然アミノ酸の組込み点に同族のコドンを導入する。最も好適には、直交性コドンはアンバーである。

【0189】

したがって、所望のチャージ活性が保持されるならば、必要に応じて、代替直交性tRNAシンテターゼ／tRNA対を使用してもよい。

【0190】

メタノサルシナ・バーケリ (Methanosarcina barkeri) PyLT遺伝子は、Mb tRNA_{CUA} tRNA (すなわち、Mb tRNA^{PyL}_{CUA}) をコードする。好適には、tRNA_{CUA}配列は、以下の通りである：

tRNA_{CUA}

Mb PyLT (MS株, Genbank受入番号AY064401から)

gggaacctgatcatgtagatcgaatggactctaaatccgttcagccgggt

tagattccccggggtttccgcca

【0191】

このtRNAには使用できる2つのバリエーションがある。一方は、gggから開始し(前述)、他方は、ggaから開始する(下記)：

tRNA_{CUA}「gga」バリエーション

Mb PyLT (MS株, Genbank受入番号AY064401から)

ggaaacctgatcatgtagatcgaatggactctaaatccgttcagccgggt

tagattccccggggtttccgcca

【0192】

これら2つのバリエーション間に実質的な差異はない。

【0193】

メタノサルシナ・バーケリPyLS遺伝子は、Mb PyLRS tRNAシンテターゼタンパク質をコードする。

【0194】

tRNAシンテターゼ

必要な場合には、当業者は、Mb PyLRS tRNAシンテターゼタンパク質を、使用される特定の非天然アミノ酸に対して最適化するように変異させることにより適合させることができる。変異の必要性(もしあれば)は、使用される特定の非天然アミノ酸によって異なる。Mb PyLRS tRNAシンテターゼを変異させる必要がある可能性のある一例は、使用される特定の非天然アミノ酸がMb PyLRS tRNAシンテターゼタンパク質によってプロセッシングされない場合である。

【0195】

本発明において、本発明者らは、新規シンテターゼDAPRSの作製に著しい知的努力を注いだ。特に、実施例3を参照されたい。好適には、本発明のシンテターゼは、271位にC、311位にQ、349位にF及び366位にC(すなわち、Mb PyLRSに関して、Y271C、N311Q、Y349F及びV366C)、又は別の種からの異なる開始シンテターゼ配列／主鎖シンテターゼ配列を使用する場合には、同等の位置を含む。

【0196】

新規シンテターゼ D A P R S の例示的な配列：

D A P R S (変異残基には下線を引いてある)：

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARA
FRHHKYRKTCRKRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NSVSAKASTNTSRSPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQ LDRVEALLSPEDKISLNMAKP
FRELEPELVTRRKND FQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPA EYVERM
GINNDELTSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLC NYLRK LDRILPGPIKIFEVGPCYRKESDGKE
HLEEF TMV QFCQM GSGCTRENLEALIKEFLDY LEIDFEIVGDSCMV EGD TLDIMHGDLEL
SSACVGPVSLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

【0197】

好ましくは、直交性シンテターゼ／tRNA 対は、メタノサルシナ・バーケリMSピロールリジン (pyrrolysine) tRNA シンテターゼ (MbPylRS) 及びその同族のアンバーサプレッサー tRNA (Mb tRNA_{CUA}) (すなわち、Mb tRNA^{Pyl}_{CUA}) であり、前記 MbPylRS は、その活性に重要な、ここに説明する変異を含む、すなわち、MbPylRS は、271 位に C、311 位に Q、349 位に F 及び 366 位に C (すなわち、Y271C、N311Q、Y349F 及び V366C) を含む。

【0198】

本発明の tRNA シンテターゼは様々であり得る。実施例においては、特定の tRNA シンテターゼ配列を使用した場合があるが、本発明を、それらの実施例のみに限局することを意図しない。

【0199】

原則として、本発明では、同じ tRNA チャージ (アミノアシル化) 機能を提供する任意の tRNA シンテターゼを用いることができる。

【0200】

例えば、tRNA シンテターゼは、任意の好適な種、例えば、古細菌、例えば、メタノサルシナ・バーケリ MS；メタノサルシナ・バーケリ菌株 Fusaro；メタノサルシナ・マゼイ (Methanosarcina mazei) Go1；メタノサルシナ・アセチボランス (Methanosarcina acetivorans) C2A；メタノサルシナ・サーモフィラ (Methanosarcina thermophila)；又はメタノコッコイデス・ブルトニイ (Methanococcoides burtonii) に由来し得る。あるいは、tRNA シンテターゼは、細菌、例えば、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense) DCB-2；デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス Y51；デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス PCP1；デスルホトマキュラム・アセトキシダンス (Desulfotomaculum acetoxidans) DSM 771 に由来し得る。

【0201】

これらの生物に由来する例示的な配列は、公開されている配列である。ピロールリジン tRNA シンテターゼの例示的な配列として、以下の例を示す：

>M. バークリMS / 1~419 /

メタノサルシナ・バーケリ MS

バージョン Q6WRH6.1 GI: 74501411

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARA
FRHHKYRKTCRKRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NSVSAKASTNTSRSPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQ LDRVEALLSPEDKISLNMAKP
FRELEPELVTRRKND FQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPA EYVERM
GINNDELTSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLY NYLRK LDRILPGPIKIFEVGPCYRKESDGKE
HLEEF TMV NFCQM GSGCTRENLEALIKEFLDY LEIDFEIVGDSCMV YGD TLDIMHGDLEL
SSAVVGPVSLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

>M. バークリF / 1~419 /

メタノサルシナ・バーケリ菌株 Fusaro

バージョン YP_304395.1 GI: 73668380

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHYEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARAF
RHHKYRKTCRCRVSEDEDINNFLTRSTEGKTSVKVKVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NPVSAKASTDTSRSPSPAKSTPNPVPPTSAPAPSLTRSQLDREALLSPEDKISLNIKPF
RELESELVTRRKNDQFRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRDFLEIKSPILIPA EYVERMGI
NNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLYNYLRKLDRIPLDPIKIFEVGPCYRKESDGKEHL
EFTMVNFQCMGSGCTRENLESLIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD TLDIMHGDLELSSA
VVGVPVPLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

>M. マゼイ / 1 ~ 4 5 4

メタノサルシナ・マゼイ G o 1

バージョンNP__6 3 3 4 6 9 . 1 GI : 2 1 2 2 7 5 4 7

10

MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSTARAL
RHHKYRKTCRCRVSEDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARAPKPL
ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPITMSA
PVQASAPALTKSQTDRLLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIYAEERENY
LGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMIGIDNDELSKQIFRVDKNFCLRPMLAPN
LYNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEFTMLNFCQMGSGCTRENLESIITDF
LNHLGIDFKIVGDSCMVYGD TLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDREW GIDKPWIGAGFGLER
LLKVKHDFKNIKRAARSESYNGISTNL

>M. アセチボランス / 1 ~ 4 4 3

メタノサルシナ・アセチボランス C 2 A

20

バージョンNP__6 1 5 1 2 8 . 2 GI : 1 6 1 4 8 4 9 4 4

MDKKPLDTLISATGLWMSRTGMIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGERLVVNNSRSTARAL
RHHKYRKTCRHC RVSEDEDINNFLTKTSEEKTTVKVKVVSAPRVRKAMPKSVARAPKPLE
ATAQVPLSGSKPAPATPVSAQAQAPAPSTGSASATSASAQRMANSAAAPAPVPTSAPAL
TKGQLDRLEGLLSPKDEISLDSEKPFRELESELLSRRKKDLKRIYAEERENYLGKLEREITK
FFVDRGFLEIKSPILIPA EYVERMGINSDELSKQVFRIDKNFCLRPMLAPNLYNYLRKLD
RALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEFTMLNFCQMGSGCTRENLEAIITEFLNHLGIDFE
IIGDSCMVYGNTLDVMHDDLELSSAVVGVPVPLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGF
KNIKRAARSESYNGISTNL

>M. サーモフィラ / 1 ~ 4 7 8

30

メタノサルシナ・サーモフィラ、バージョンD Q 0 1 7 2 5 0 . 1 GI : 6 7 7 7 3 3
0 8

MDKKPLNTLISATGLWMSRTGKLHKIRHHEVSKRKIYIEMECGERLVVNNSRSCRAARAL
RHHKYRKICKHCRVSEDEDLNKFLTRTNEDKSNKVTVVSAPKIRKVMPSKSVARTPKPLE
NTAPVQTLPSSEQPAPTTPIASTTAPASTSTTAPAPASTTAPAPASTTAPASASTTISTSA
MPASTSAQGTTKFNYISGGFPRPIPVQASAPALTKSQIDRLQGLLSPKDEISLD SGTPFRKL
ESELLSRRRKDLKQIYAEEREHYLGKLEREITKFFVDRGFLEIKSPILIPMEYIERMIGIDND
KELSKQIFRVDN NFCLRPMLAPNLYNYLRKLN RALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEF
TMLNFCQMGSGCTRENLEAIKDFLDYLGIDFEIVGDSCMVYGD TLDVMHGDLELSSAVV
GPVPMDRDWGINKPWIGAGFGLERLLKVMHNFKNIKRASRSSESYNGISTNL

40

>M. ブルトニイ / 1 ~ 4 1 6

メタノコッコイデス・ブルトニイ D S M 6 2 4 2、バージョンY P__5 6 6 7 1 0 . 1
GI : 9 1 7 7 4 0 1 8

MEKQLLDVLVELNGVWLSRSGLLHGIRNFEITTKHIHIETDCGARFTVRNSRSSRSARSLR
HNKYRKPCRCRPADEQIDRFVKKTFKEKRQTVSVFSSPKKHVPKPKVAVIKSFSISTPS
PKEASVSNSIPTPSISVVKDEVKVPEVKYTPSQIERLKTLMSPDDKIPIQDELPEFKVLEKE
LIQRRRDDLLKKMYEEDREDRLGKLERDITEFFVDRGFLEIKSPIMIPFEYIERMIGIDKDDHL
NKQIFRVDES MCLRPMLAPCLYNYLRKLDKVLDPDIRIFEIGPCYRKESDGSSHLEFTMV
NFCQMGSGCTRENMEALIDEFLEHLGIEYEIEADNCMVYGD TIDIMHGDLELSSAVVGPI
PLDREWG VNKPWMGAGFGLERLLKVRHNYTNIRRASRSELYYNGINTNL

50

> D. ハフニエンス__DCB-2/1~279

デスルフイトバクテリウム・ハフニエンス DCB-2

バージョンYP__002461289.1 GI:219670854

MSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLEMGFSDALSRDRAFQGGIEHQLMSQGKRHLEQLRTVK
HRPALLELEEEGLAKALHQQGFVQVVTPTIITKSALAKMTIGEDHPLFSQVFWLDGKKCLR
PMLAPNLYTLWRELERLWDKPIRIFEIGTCYRKESQGAQHLNEFTMLNLTELGTPLERH
QRLEDMARWVLEAAGIREFELVTESSVVYGD TVDVMKGDLELASGAMGPHFLDEKWEIV
DPWVGLGFGLERLLMIREGTQHVQSMARSLSYLDGVRLNIN

> D. ハフニエンス__Y51/1~312

デスルフイトバクテリウム・ハフニエンス Y51

バージョンYP__521192.1 GI:89897705

MDRIDHTDSKFVQAGETPVLPATFMFLTRRDPPLSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLEM
G FSDALSRDRAFQGGIEHQLMSQGKRHLEQLRTVKHRPALLELEEEGLAKALHQQGFVQVVT
PTIITKSALAKMTIGEDHPLFSQVFWLDGKKCLRPMMLAPNLYTLWRELERLWDKPIRIFEI
GTCYRKESQGAQHLNEFTMLNLTELGTPLERHQRLEDMARWVLEAAGIREFELVTESS
VVYGD TVDVMKGDLELASGAMGPHFLDEKWEIVDPWVGLGFGLERLLMIREGTQHVQS
MARSLSYLDGVRLNIN

> D. ハフニエンスPCP1/1~288

デスルフイトバクテリウム・ハフニエンス

バージョンAY692340.1 GI:53771772

MFLTRRDPPLSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLEMGFSDALSRDRAFQGGIEHQLMSQGR
HLEQLRTVKHRPALLELEEKALAKALHQQGFVQVVTPTIITKSALAKMTIGEDHPLFSQV
WLDGKKCLRPMMLAPNLYTLWRELERLWDKPIRIFEIGTCYRKESQGAQHLNEFTMLNL
TELGTPLERHQRLEDMARWVLEAAGIREFELVTESSVVYGD TVDVMKGDLELASGAMG
PHFLDEKWEIVDPWVGLGFGLERLLMIREGTQHVQSMARSLSYLDGVRLNIN

> D. アセトキシダンス/1~277

デスルホトマキュラム・アセトキシダンスDSM 771

バージョンYP__003189614.1 GI:258513392

MSFLWTVSQQKRLSELNASEEEKNMSFSSTSDREAAAYKRVEMRLINESKQRLNKL RHETR
PAICALENRLAAALRGAGFVQVATPVILSKKLLGKMTITDEHALFSQVFWIEENKCLRPM
LAPNLYYILKDLLRLWEKPVRIFEIGSCFRKESQGSNHLNEFTMLNLVEWGLPEEQQRKR
ISELAKLVMDETGIDEYHLEHAESVVYGETVDVMHRDIELGSGALGPHFLDGRWGVVGP
WVGIGFGLERLLMVEQGGQNVRSMGKSLTYLDGVRLNI

【0202】

特定のtRNAチャージ（アミノアシル化）機能が、tRNAシンテターゼを変異させることによって提供された場合には、別の野生型tRNAシンテターゼ配列、例えば、前記から選択されるものを使用するだけでは適切でない場合がある。このシナリオにおいては、同じRNAチャージ（アミノアシル化）機能を保存することが重要となる。これは、例示的なtRNAシンテターゼを代替りのtRNAシンテターゼ主鎖、例えば、前記から選択されるものに移動させることによって、達成される。

【0203】

このように、選択された変異を、対応するtRNAシンテターゼ配列、例えば、例示的なM. barkeri及び／又はM. mazei配列を超えて他の生物からの対応するpylS配列に移動させることが可能であるはずである。

【0204】

標的tRNAシンテターゼタンパク質／主鎖は、既知のtRNAシンテターゼ、例えば、例示的なM. barkeri及び／又はM. mazei配列へのアラインメントによって選択し得る。

【0205】

次に、この主題についてpylS（ピロールリジンtRNAシンテターゼ）配列に言及

10

20

30

40

50

することによって説明するが、その原則は、目的の特定の tRNA シンテターゼに等しく適用される。

【0206】

例えば、全ての P y l S 配列のアラインメントを調製することができる。これらは、全体的な配列同一性%が低い可能性がある。したがって、配列を既知の tRNA シンテターゼにアラインして（単に低い配列同一性スコアを使用するのではなく）、使用されている配列が実際に tRNA シンテターゼであることを確実にするなどして、配列を研究することが重要である。

【0207】

したがって、好適には、配列同一性が考慮されている場合、前記の tRNA シンテターゼの例の配列全体にわたって好適に考慮される。好適には、同一性%は、前記配列のアラインメントから定義されるものであり得る。

10

【0208】

触媒領域に焦点を合わせることが有用であり得る。このねらいは、高い同一性%を定義できる tRNA 触媒領域を提供して、同じ tRNA チャージ（アミノアシル化）機能、例えば、新しい又は非天然アミノ酸認識をもたらすように翻訳された変異を受け入れるのに好適な主鎖スキャフォールドを捕捉／同定することである。

【0209】

したがって、好適には、配列同一性が考慮されている場合、触媒領域全体にわたって好適に考慮される。好適には、同一性%は、触媒領域から定義されるものであり得る。

20

【0210】

代替りの tRNA シンテターゼ主鎖への変異の「移動」又は「移植」は、tRNA シンテターゼ主鎖をコードするヌクレオチド配列の部位特異的変異誘発によって達成できる。この技術は、当技術分野において周知である。本質的には、主鎖 p y l S 配列を選択し（例えば、前記で論じた活性部位アラインメントを使用して）、選択した変異を、対応する／相同的な位置に移動させる（すなわち、対応する／相同的な位置において作る）。

【0211】

数値アドレスを使用して特定のアミノ酸残基に言及する場合、特に明らかでない限り、番号付けは、参照配列として M b P y l R S（メタノサルシナ・バーケリのピロールリジル（pyrrolysyl）- tRNA シンテターゼ）アミノ酸配列（すなわち、公開されている野生型メタノサルシナ・バーケリ P y l S 遺伝子 受入番号 Q 4 6 E 7 7）によってコードされている）：

30

MDKKPLDVL I SATGLWMSRT GTLHKIKHYE VSRSKIYIEM ACGDHLVVNN SRSCRTA
RAF RHHKYRKTC RCRVSDDEDIN NFLTRSTEGK TSVKVKVVS A PKVKKAMPKS VSR
APKPLEN PVSASTDT SRSVPSPAKS TPNSPVPTSA PAPSLTRS QL DRVEALLSPE
DKISLNI AKP FRELESELVT RRKNDFQRLY TNDREDYLGK LERDITKFFV DRDFLEIKS
P ILIPAEYVER MGINNDTELS KQIFRVDKNL CLRPMLAPTL YNYLRKLDRI LPDPIKI
FEV GPCYRKESDG KEHLEEF TMV NFCQMGSGCT RENLESLIKE FLDYLEIDFE IVGDS
CMVYG DTLDIMHGDL ELSSAVVGPV PLDREW GIDK PWIGAGFGLE RLLKVMHGFK
NIKRASRES YYNGISTNL

40

を使用して、行う。

【0212】

これは、目的の残基を位置付けるために当技術分野においてよく理解されているようにして使用されるべきである。これは、必ずしも厳密な計数作業ではない—状況又はアラインメントに注意を払わなければならない。例えば、目的のタンパク質が、長さがわずかに異なるものである場合、（例えば）L 2 6 6 に対応する、その配列中の正しい残基の位置付けには、アラインされる配列と、厳選した同等の又は対応する残基とを必要とし得、目的の配列の 2 6 6 番目の残基を単に採用するのではない。これは、十分に、熟練した読み手の領域内である。

【0213】

50

本明細書中で使用する変異の表記法は、当技術分野における標準である。例えば、L 2 6 6 Mは、野生型配列の2 6 6位のLに対応するアミノ酸がMで置き換えられていることを意味する。

【0214】

この表記法において、導入されるアミノ酸が最も重要な情報である。例えば、「L 2 6 6 M」変異が別のシンテターゼ出発配列（主鎖配列）に移植される場合、この代わりの出発配列は2 6 6位に（又は、前記で説明した参照配列のL 2 6 6に対応する位置に）「L」を有していない可能性もおそらくある。しかし、この場合、参照配列のL 2 6 6に対応する正しいアミノ酸を、目的のシンテターゼ出発配列（主鎖配列）において同定すること、及びこの残基（それが何であれ）をMに変化させることが、重要である。したがって、代わりの主鎖／出発配列に移植する場合、「L 2 6 6 M」は「X 2 6 6 M」と理解され得る。

10

【0215】

本明細書中に記載した例示的なDAPRSシンテターゼに関して、変異は、M. b. 参照配列（前記を参照）と比較してY 2 7 1 C、N 3 1 1 Q、Y 3 4 9 F及びV 3 6 6 Cと表記され、又は出発配列中のそれらの位置に異なるアミノ酸を有する主鎖に移植する場合には、X 2 7 1 C、X 3 1 1 Q、X 3 4 9 F及びX 3 6 6 Cと理解できるであろう。

【0216】

次に、代わりのtRNA主鎖間の変異の移植を、例示的なM. barkeri及びM. mazei配列に関して説明するが、同じ原則が、他の主鎖への又は他の主鎖からの移植に等しく適用される。

20

【0217】

例えば、Mb AcKRSは、AcKの組込みのために設計されたシンテターゼである。

親タンパク質／主鎖：M. パーケリ PyLS

変異：L 2 6 6 V、L 2 7 0 I、Y 2 7 1 F、L 2 7 4 A、C 3 1 7 F

【0218】

Mb PCKRS：PCKの組込みのために設計されたシンテターゼ

親タンパク質／主鎖：M. パーケリ PyLS

変異：M 2 4 1 F、A 2 6 7 S、Y 2 7 1 C、L 2 7 4 M

【0219】

同じ基質特性を有するシンテターゼを、これらの変異をM. マゼイ PyLSに移植することによって得ることができる。したがって、Mb主鎖からMm tRNA主鎖に変異を移植することによって、以下のシンテターゼ：

変異L 3 0 1 V、L 3 0 5 I、Y 3 0 6 F、L 3 0 9 A、C 3 4 8 FをM. マゼイ PyLSに導入するMm AcKRS、及び

変異M 2 7 6 F、A 3 0 2 S、Y 3 0 6 C、L 3 0 9 MをM. マゼイ PyLSに導入するMm PCKRS

を生成し得る。

【0220】

これらの例示的な移植変異シンテターゼの完全長配列を、以下に示す。

30

〉 Mb_PyLS/1-419

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARA
FRHHKYRKTCRKRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NSVSAKASTNTRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQQLDRVEALLSPEDKISLNMAKP
FRELEPELVTRRKNDFFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPA EYVERM
GINNDELTSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLYNYLRKLDRLPGPIKIFEVGP CYRKESDGKE
HLEEF TMVNFCQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD TLDIMHGDL EL
SSAVVGPVSLDREW GIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

〉 Mb_AcKRS/1-419

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARA

40

50

FRHHKYRKTCKRCRVSGEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NSVSAKASTNTSRVSPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQDRVEALLSPEDKISLNMAKP
FRELEPELVTRRKNDQFRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPAHEYVERM
GINNDELTSKQIFRVDKNLCLRPMVAPTIFNYARKLDRILPGPIKIFEVGPCYRKESDGKE
HLEEFMTMVNFFQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGDITLDMHGDLEL
SSAVVGPVSLDREWGDIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

> Mb_PCKRS/1-419

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTARA
FRHHKYRKTCKRCRVSDDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAPKPLE
NSVSAKASTNTSRVSPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQDRVEALLSPEDKISLNMAKP
FRELEPELVTRRKNDQFRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIPAHEYVERFG
INNDELTSKQIFRVDKNLCLRPMLSPTLCNYMRKLDRLPGPIKIFEVGPCYRKESDGKEH
LEEFMTMVNFCQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGDITLDMHGDLELS
SAVVGPVSLDREWGDIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSSESYNGISTNL

10

> Mm_PylS/1-454

MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTARAL
RHHKYRKTCKRCRVSDDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKAMPKSVARAPKPL
ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPITMSA
PVQASAPALTKSQTDRLLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIYAEERENY
LGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDELTSKQIFRVDKNFCLRPM LAPN
LYNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFMTMLNFCQMGSGCTRENLESIITDF
LNHLGIDFKIVGDSCMVYGDITLDMHGDLELSSAVVGPIPLDREWGDIDKPWIGAGFGLER
LLKVKHDFKNIKRAARSESYNGISTNL

20

> Mm_AcKRS/1-454

MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTARAL
RHHKYRKTCKRCRVSDDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKAMPKSVARAPKPL
ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPITMSA
PVQASAPALTKSQTDRLLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIYAEERENY
LGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDELTSKQIFRVDKNFCLRPMVAPNI
FNYARKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFMTMLNFFQMGSGCTRENLESIITDFL
NHLGIDFKIVGDSCMVYGDITLDMHGDLELSSAVVGPIPLDREWGDIDKPWIGAGFGLERL
LKVKHDFKNIKRAARSESYNGISTNL

30

> Mm_PCKRS/1-454

MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTARAL
RHHKYRKTCKRCRVSDDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKAMPKSVARAPKPL
ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPITMSA
PVQASAPALTKSQTDRLLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIYAEERENY
LGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERFGIDNDELTSKQIFRVDKNFCLRPM LSPNL
CNYMRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFMTMLNFCQMGSGCTRENLESIITDF
LNHLGIDFKIVGDSCMVYGDITLDMHGDLELSSAVVGPIPLDREWGDIDKPWIGAGFGLER
LLKVKHDFKNIKRAARSESYNGISTNL

40

【0 2 2 1】

同じ原則が、他の変異及び／又は他の主鎖に等しく適用される。

【0 2 2 2】

このようにして生産された移植ポリペプチドは有利には、所望の機能／基質特異性が保存されていることを保証するために試験するべきである。

【0 2 2 3】

一実施形態において、tRNAが1つの種、例えば、メタノサルシナ・バーケリに由来し、tRNAシンテターゼが別の種、例えば、メタノサルシナ・マゼイに由来し得る。別の実施形態において、tRNAが第1の種、例えば、メタノサルシナ・マゼイに由来し、

50

tRNAシンテターゼが第2の種、例えば、メタノサルシナ・バーケリに由来し得る。直交性対が、異なる種に由来するtRNA及びtRNAシンテターゼを含む場合には、直交性対が効果的に一緒に機能する、すなわち、tRNAシンテターゼが目的のアミノ酸のtRNAを効果的にアミノアシル化することになるという条件を必ず伴う。

最も好適には、直交性対は、同じ種からのtRNA及びtRNAシンテターゼを含む。

tRNAシンテターゼの性質及びその活性に役立つ特定の変異について、以下に別々に論じる。

【0224】

tRNAシンテターゼ分子のチャージ／アシル化部分がPyl tRNAシンテターゼに基づく又はそれに由来するならば、キメラtRNAシンテターゼを生産し得る。すなわち、tRNA分子のアンチコドン部分は、例えば、代わりのコドン、例えば、センスコドン、四つ組コドン、アンバーコドン又は別の「停止」コドンなどの代替コドンの認識においてtRNAを指示するための作業者の選択に応じて異なり得る。しかし、tRNA分子の機能的なアシル化／チャージ部分は、前述の非天然アミノ酸に関して有用なチャージ活性を保存する(preserve)ために、保存(conserved)されるべきである。

【0225】

メタノサルシナ・バーケリ及びメタノサルシナ・マゼイのtRNAはいずれも好適である。いずれにせよ、これらのtRNAは、1ヌクレオチドしか異ならない。この1ヌクレオチドの差異は、それらの活性に影響を及ぼさない。したがって、いずれのtRNAも本発明において等しく適用できる。

【0226】

使用するtRNAは様々であってもよく、例えば、変異していてもよい。いかなる場合でも、Pyl tRNAのこのようなバリエーション又は変異体はいずれも、tRNAに前述の非天然アミノ酸をチャージするのに使用されるtRNAシンテターゼと生産的に相互作用する能力を常に保持すべきである。

【0227】

tRNAシンテターゼ

メタノサルシナ・バーケリ及びメタノサルシナ・マゼイ種のピロールリジンtRNAシンテターゼは、tRNAに前述の非天然アミノ酸をチャージするのに役立つ、本明細書中に記載した変異を含むならば、好適である。

【0228】

ペプチド結合による非天然アミノ酸の組み込み

本明細書中に記載した非天然アミノ酸をポリペプチドに組み込んでいる直接生成物が、ペプチド結合によってポリペプチド主鎖に結合した前記非天然アミノ酸の残基を含むポリペプチドであることは、明らかであろう。これは、厳密な意味では、ポリペプチドは言及した非天然アミノ酸を正確には含まず、むしろ、縮合反応を受けたその残基を含むことを意味する。これは、言及した非天然アミノ酸のアミノ酸基が、ポリペプチド鎖中のその隣接アミノ酸残基と反応し、その結果、ペプチド結合に基づき、言及した非天然アミノ酸の1つの残基が組み込まれると共に1分子のH₂Oが遊離されるためである。「ポリペプチド鎖への非天然アミノ酸Xの組み込み」又は「非天然アミノ酸Xを含むポリペプチド」への言及は、それに応じて解釈すべきである。これは完全に当技術分野における従来の命名法であり、例えば、アミノ酸、例えば、バリンがポリペプチド鎖に組み込まれる場合には、ポリペプチド鎖はバリンを含むと記載されるが、実際には、ポリペプチド鎖は、前述の通り、そのアミノ酸基の反応並びにペプチド結合の形成及び1つのH₂O分子の遊離によってポリペプチド鎖に結合したバリンのアミノ酸残基を含む。

【0229】

一態様において、本発明は、前述の非天然アミノ酸を含むポリペプチドに関する。

【0230】

一態様において、本発明は、前述の非天然アミノ酸を含むポリペプチドであって、前記非天然アミノ酸がペプチド結合を介して前記ポリペプチドに結合している、ポリペプチド

に関する。

【0231】

一態様において、本発明は、前述の非天然アミノ酸を含むポリペプチドであって、前記非天然アミノ酸がペプチド結合を介して前記ポリペプチドに結合している、ポリペプチドに関する。

【0232】

一態様において、本発明は、ペプチド結合によって、又はペプチド結合を介して組み込まれた、前述の非天然アミノ酸を含むポリペプチドに関する。

【0233】

一態様において、本発明は、ペプチド結合によって、又はペプチド結合を介して組み込まれた、前述の非天然アミノ酸の残基を含むポリペプチドに関する。

10

【0234】

本明細書中において、「非天然アミノ酸」は、天然にはコードされていない又はいかなる生物の遺伝暗号にも見られないアミノ酸を指す。したがって、非天然アミノ酸は、アミン及びカルボン酸官能基並びに側鎖を含むが、タンパク質を組み立てるのに翻訳機構によって使用されるタンパク質構成アミノ酸のいずれでもない化合物である。

【0235】

同様に、本明細書中に開示する例示的な非天然アミノ酸は、「DAPを含む非天然アミノ酸」又は「DAPを含むアミノ酸」などと称することもある。明らかに、IUPAC命名規則の最も厳密な意味では、DAPは2つのNH₂基を有するが、論じられる非天然アミノ酸は単一のNH₂基を有し、他方のNH₂基はH原子を失い、代わりに対応するN原子を介してアミノ酸側鎖の残りの部分に結合している。これにもかかわらず、「DAPを含む非天然アミノ酸」又は「DAPを含むアミノ酸」への言及は、当技術分野においてよく見られるように本明細書中でも使用し、それぞれH₂N-C-(COOH)-C-N(H)-R部分を含む（すなわち、「DAP」を含む）化合物2、3、4、5及び6の1つ又はいずれかを指すことがある。

20

【0236】

宿主細胞、ベクター、タンパク質産生

前述した方法のための、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、組換え型の複製可能なベクターに組み込むことができる。このベクターを使用して、適合性宿主中で核酸を複製することができる。したがって、さらなる一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを作る方法であって、複製可能なベクターに本発明のポリヌクレオチドを導入するステップと、そのベクターを適合性宿主細胞（compatible host cell）に導入するステップと、ベクターの複製をもたらす条件下で宿主細胞を増殖させるステップとによる、方法を提供する。ベクターは、宿主細胞から回収し得る。好適な宿主細胞としては、細菌、例えば、大腸菌が挙げられる。

30

【0237】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコード配列の発現を可能にする制御配列に作動可能に連結される、すなわち、ベクターは発現ベクターである。用語「作動可能に連結される」は、記載された成分が、意図される方法で機能させることができる関係にあることを意味する。コード配列に「動作可能に連結される」調節配列は、コード配列の発現が制御配列と適合性の条件下で達成されるようにライゲートされる。

40

【0238】

本発明のベクターは、記載された好適な宿主細胞を形質転換又はそれにトランスフェクトして、本発明のタンパク質の発現を可能にすることができる。このプロセスは、前述の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、タンパク質をコードするコード配列のベクターによる発現を可能にする条件下で培養するステップと、発現されたタンパク質を回収する任意のステップとを含む。

【0239】

ベクターは、例えば、複製開始点、任意に前記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモ

50

ーター及び任意にプロモーターのレギュレーターを備えるプラスミド又はウイルスベクターであり得る。ベクターは、1つ又は2つ以上の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合にはアンピシリン耐性遺伝子を含み得る。ベクターは、例えば、宿主細胞にトランスフェクト又は宿主細胞を形質転換するのに使用できる。

【0240】

本発明のタンパク質をコードする配列に動作可能に連結された制御配列は、プロモーター／エンハンサー及び他の発現調節シグナルを含む。これらの制御配列は、発現ベクターが使用されるように設計された宿主細胞と適合性 (compatible) であるように選択し得る。プロモーターという用語は、当技術分野において周知であり、ミニマルプロモーターから、上流要素を含むプロモーター及びエンハンサーに及ぶ、サイズ及び複雑性が様々な核酸領域を包含する。

10

【0241】

本発明の別の態様は、DAPを含む非天然アミノ酸を、好適には細胞中で、選択されたタンパク質に遺伝的に及び部位特異的に組み込む方法、例えば、インビトロの方法である。前記方法によって遺伝的に組み込むことの1つの利点は、この実施形態では、DAPを含むタンパク質を標的細胞中で直接合成できるので、いったん形成されると、DAPを含むタンパク質を細胞に送達する必要性がなくなることである。この方法は、以下のステップ:

(i) タンパク質をコードするヌクレオチド配列の所望の部位において、直交性コドン、例えば、アンバーコドンを導入するか、又は特定のコドン直交性コドン、例えば、アンバーコドンで置き換えるステップと、

20

(ii) 直交性tRNAシンテターゼ／tRNA対、例えば、DAPRS tRNAシンテターゼ／tRNA対の発現系を細胞に導入するステップと、

本発明によるDAPを含む非天然アミノ酸を含む培地中で細胞を増殖させるステップとを含む。

【0242】

ステップ(i)は、タンパク質の遺伝子配列の所望の部位において特定のコドン直交性コドン、例えば、アンバーコドンで置き換えることを伴う。これは、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するコンストラクト、例えば、プラスミドを単に導入することによって達成でき、DAPを含む非天然アミノ酸の導入する又はそれでの置き換えが所望される部位が、直交性コドン、例えば、アンバーコドンを含むように変えられる。これは、十分に当業者の能力の範囲内であり、その例を本明細書中に示す。

30

【0243】

ステップ(ii)は、所望の場所にDAPを含む非天然アミノ酸を特異的に組み込む直交性発現系(例えば、アンバーコドン)を必要とする。したがって、前記tRNAにDAPを含む非天然アミノ酸と一緒にチャージできる、特異的な直交性tRNAシンテターゼ、例えば、DAPRS-tRNAシンテターゼと特異的な対応する直交性tRNA対が必要とされる。これらの例を、本明細書中に示す。

【0244】

タンパク質の発現及び精製

40

本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、本発明のタンパク質の発現に使用し得る。

好適な宿主細胞としては、細菌、例えば、大腸菌、又はある特定の真核生物細胞が挙げられる。

真核生物細胞に関しては、PyLS／PyLT系を使用する多くのUAAが真核生物細胞において機能することが示されている(最も近い例は、光ケージ化システインについての(Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. Journal of the American Chemical Society 136, 2240-2243 (2014))であり;この文献を、真核生物細胞における操作の教示のために、参照することによって本明細書中に組み込む)。

【0245】

50

真核生物細胞は、任意の好適な真核生物細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、S f 9 昆虫細胞）、哺乳動物細胞、例えば、マウス細胞又はヒト細胞であり得る。

【0246】

好適には、真核細胞は哺乳動物細胞である。好適には、哺乳動物細胞は、HEK 293 細胞、例えば、HEK 293 T 細胞である。

一実施形態において、好適には、真核生物細胞、哺乳動物細胞、HEK 293 細胞又は HEK 293 T 細胞はインビトロである。この実施形態において、細胞はインビボ細胞ではない。

【0247】

好適には、宿主細胞は細菌細胞である、好適には、宿主細胞は大腸菌である。好適には、宿主細胞は、大腸菌細胞である。好適には、大腸菌細胞は、BL 21 DE 3 大腸菌細胞である。

10

【0248】

一態様において、本発明は、前述の2, 3-ジアミノプロピオン酸(DAP)を含むポリペプチドを生産する方法であって、生細胞の内部で実施される、方法に関する。

好適には、前記方法は、前述の非天然アミノ酸をポリペプチドに遺伝的に組み込むステップと、前記非天然アミノ酸を脱保護して2, 3-ジアミノプロピオン酸(DAP)にする任意のステップとを含む。

好適には、前記生細胞は、大腸菌細胞、例えば、BL 21 DE 3 大腸菌細胞を含む。

好適には、前記生細胞は、哺乳動物細胞、例えば、HEK 293 T 細胞を含む。

20

【0249】

宿主細胞は、本発明のタンパク質の発現を可能にする好適な条件下で培養をすればよい。本発明のタンパク質の発現は、それらが継続的に産生されるように構成的であってもよいし、又は、発現の開始に刺激を必要とするように誘導的であってもよい。誘導性発現の場合には、タンパク質産生は、必要とされる場合には、例えば、培地へのインデューサー物質、例えば、デキサメタゾン又はIPTGの添加によって開始できる。

【0250】

ヒト胎児由来腎臓ラージT抗原(HEK 293 T、Human Embryonic Kidney with large T antigen)細胞は、広く入手可能であり、例えば、ATCC(登録商標)CRL-3216がLGC Standards社、Queens Road、Teddington、Middlesex、TW11 0LY、UKから入手可能である。HEK 293 T細胞は、当技術分野において公知であるように、例えば、必要に応じて適切な補充を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、Dulbecco's modified eagle medium)中で培養し得る。

30

【0251】

BL 21 DE 3 大腸菌細胞は、広く入手可能であり、例えば、C2527I又はC2527HがNew England Biolabs New England Biolabs社、240 County Road、Ipswich、MA 01938-2732、USAから入手可能である。これらは、当技術分野において周知であるように、供給業者からの指示に従って培養できる。

【0252】

本発明のタンパク質は、酵素的、化学的及び／又は浸透圧溶解並びに物理的破壊を含む、当技術分野において公知の種々の技術によって、宿主細胞から抽出できる。

40

【0253】

本発明のタンパク質は、当技術分野において公知の標準的な技術、例えば、分取クロマトグラフィー、アフィニティー精製又は任意の他の好適な技術によって精製できる。

【0254】

組込みの標的部位

好適には、前述のDAP及び／又は非天然アミノ酸は、野生型ポリペプチドのシステイン、セリン又はトレオニン残基に対応する位置に組み込まれ、野生型ポリペプチドのシステイン又はセリン残基に対応する位置に組み込まれていてもよく、最も好適には野生型ポリペプチドのシステイン残基に対応する位置に組み込まれる。

50

より好適には、前述のDAP及び／又は非天然アミノ酸は、野生型ポリペプチドの触媒システイン、触媒セリン又は触媒トレオニン残基に対応する位置に組み込まれ、野生型ポリペプチドの触媒システイン又は触媒セリン残基に対応する位置に組み込まれていてもよく、最も好適には野生型ポリペプチドの触媒システイン残基に対応する位置に組み込まれる。

【0255】

酵素

本発明は、DAPの組み込みによる、酵素の活性部位の修飾に特定の用途を見出す。好適には、本明細書中に記載したDAP又は非天然アミノ酸は、野生型酵素の活性部位内のアミノ酸に対応する位置に組み込まれる。好適には、本明細書中に記載したDAP又は非天然アミノ酸は、野生型酵素の活性部位内の触媒アミノ酸に対応する位置に組み込まれる。

10

【0256】

好適には、ポリペプチドは酵素である。好適には、エステル又はチオエステル中間体を生成する酵素。好適には、本発明のポリペプチドは、この一般的なメカニズムに従う酵素であり；より好適には、ポリペプチドは、セリンヒドロラーゼ（ヒトゲノム中の遺伝子の1%によってコードされる）であり得；好適には、酵素は、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、アミダーゼ、デユビキチナーゼ、リパーゼ、コリンエステラーゼ、チオエステラーゼ、ホスホリパーゼ、グリカンヒドロラーゼ（Di Cera, E. Serine proteases. IUBMB Life 61, 510-515 (2009)、Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. Chem Rev 102, 4501-4523 (2002)、Long, J.Z. & Cravatt, B.F. The Metabolic S erine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. Chem Rev 111, 6022-6063 (2011))、システインプロテアーゼ（例えば、カスパーゼ）、又はユビキチン化及び／若しくはSUMO化に関与する酵素（例えば、E1、E2又はある特定の、E3のファミリー）（Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. Front Pharmacol 7 (2016)、Otto, H.H. & Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. Chem Rev 97, 133-171 (1997)、Swatek, K.N. & Komander, D. Ubiquitin modifications. Cell Res 26, 399-422 (2016))であり得る。

20

【0257】

より好適には、本明細書中に記載したDAP又は非天然アミノ酸は、酵素、例えば、プロテアーゼによって組み込まれる。

30

【0258】

International Nomenclature and Classification of Enzymesシステム(国際生化学・分子生物学連合命名法委員会(NC-IUBMB、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)によって、IUPAC-IUBMB生物化学命名法合同委員会(JCBN、Joint Commission on Biochemical Nomenclature)との協議によって作成及び改定)(例えば、<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>を参照)を参照して、好適には、本明細書中に記載したDAP又は非天然アミノ酸は、分類群：

【0259】

40

【表 1】

酵素サブクラス	名称	特に好適なサブクラス(es)	名称	注釈/好ましい種又は供給源
EC 3.4	ペプチダーゼ(ペプチド結合に作用)	EC 3.4.22.44	核封入-a エンドペプチダーゼ; ポティウイルス(Potyvirus)NIa プロテアーゼ	タバコエッチウイルス(TEV) 活性部位は Cys-151 を含む
EC 2.3.2	アミノアシルトランスフェラーゼ(例えば、ユビキチン結合酵素 s)	EC 2.3.2.23	E2 ユビキチン結合酵素	触媒中心は Cys-87 に位置する。 UBE2L3。 Uniprot P68036
EC 3 (DAP の使用があまり有利でない、3.8[ハロゲン化物結合に作用]及び 3.9[リン-窒素結合に作用]を除く)	ヒドロラーゼ	EC 3.4.21.-	セリンプロテアーゼ SplD	SplD 活性部位は Ser-156 を含む
EC 6.2	炭素-硫黄結合を形成	EC 6.2.1.45	ユビキチン様モディファイヤー活性化酵素 1	UBA1 活性部位は Cys 517 を含む

【0260】

からの1つ又は2つ以上の酵素からの酵素に組み込まれる。

【0261】

産業用途

本発明はとりわけ、2,3-ジアミノプロピオン酸(DAP)を含むポリペプチドを生産する新しい方法を提供する。これには、例えば、目的の分子、例えば、研究されている酵素の基質を共有結合によって捕捉するその反応性を利用する、様々な産業用途がある。これはまた、酵素活性部位の中心部にDAPを組み込むことによって可能になる、類似したアプローチを介して、代謝経路の精査を可能にする。小分子薬物が酵素によってどのよ

うに修飾／代謝されるかを特定するための及び／又はそれらのタンパク質標的を特定するための、小分子薬物の研究／捕捉も、用途に含まれる。

【0262】

タンパク質の構造の特徴付けは、多くの創薬プロジェクトの出発点となることが多い。DAPは、酵素活性部位のセリン又はシステイン側鎖に結合した共有結合中間体を介して進行するあらゆるタンパク質触媒反応に使用できるので、広範な応用可能性を有する。DAPは、これらの共有結合中間体を構造的に特徴付けるのに使用できる。それに加えて、DAPはまた、これらの酵素の新しい基質の同定も可能にし、これもまた、新薬開発戦略の出発点となり得る。

【0263】

さらなる用途

本発明者らの技術は、DAPを組換えタンパク質に部位特異的に組み込むことを可能にする。DAPは、酵素活性部位のセリン又はシステイン側鎖に結合した共有結合中間体を介して進行するあらゆるタンパク質触媒反応に使用できる。DAPは、これらの共有結合中間体を構造的に特徴付けるのに使用できるが、これらの酵素の新しい基質の同定も可能にする。

【0264】

本発明者らは、温和な条件下でDAPに翻訳後変換され得るアミノ酸（DAP5）を組み込むアミノアシルー tRNA シンテターゼ／tRNA_{CUA}対を進化させた。これにより、本発明者らは、大腸菌において産生される組換えタンパク質にDAPを部位特異的に組み込むことができる。これにより、本発明者らは、アシルー酵素中間体を効率的に捕捉することができる。

【0265】

一実施形態において、本発明は、同族 tRNA (cognate tRNA) にDAP5をロード (load) するために進化させた、ピロールリジン tRNA シンテターゼの変異体 (DAPRS) を使用してタンパク質に組み込まれる、アミノ酸 (DAP5) を提供する。これにより、温和な条件下で脱保護されてDAPになり得る、部位特異的に組み込まれたDAP5を有する組み込みタンパク質の合成が可能になる。

【0266】

好適には、脱保護のための照射は、1分未満、好適には約1分間、好適には1分間、好適には少なくとも1分間である。好適には、脱保護のための照射は、1ミリ秒～120秒間、より好適には1ミリ秒～60秒間である。最も好適には、脱保護のための照射は、1分間である。

好適には、続いて照射後に、凍結温度より高い任意の温度でタンパク質をインキュベートする。インキュベーションは、脱保護の第2の段階である。完了までに要する時間は、DAPを組み込むタンパク質によって異なる。実施例においては、試料は照射後に1～2hインキュベートした。

【0267】

一態様において、本発明は、酵素の基質を捕捉する方法に関する。

【0268】

好適な基質は、チオエステル又はエステル中間体結合が前記基質に対する酵素の作用によって作製されるものである（注記：基質はエステル又はチオエステルを含まない—好適には、基質は、これらの部分が触媒作用中に作製されるような化学構造を有する）。好適には、これらの結合は、酵素の、その基質に対する求核攻撃後に又はその結果として作製される。本発明によるDAPによる活性部位残基の置換の場合には、作製される結合はアミド結合である（以下でより詳細に論じる）。

好適には、前記基質は、安定なアミド類似体として捕捉される。

好適には、前記基質は、天然に存在する基質の類似体であり得る。

好適には、前記酵素は、システインプロテアーゼ又はチオエステラーゼである。

好適には、前記酵素は、1つ又は2つ以上のアシルー酵素中間体を介して、より好適に

10

20

30

40

50

は、1つ又は2つ以上のシステインー又はセリンー結合アシルー酵素中間体を介して作用する。

【0269】

一実施形態において、本発明は、小分子（薬物）を添加して形成される中間体酵素－基質複合体を調べるのに使用できる。これにより、薬物が、種々の複合体形成の間にこの酵素－基質相互作用をどのように破壊するかを解明できる。したがって、小分子が酵素の基質である場合、これは本発明の有用な用途である。DAPは、求核性（触媒）残基、好適にはシステイン及び／又はセリンと置き換わるならば、あらゆる基質を捕捉する。

【0270】

本発明は、コードされた2, 3－ジアミノプロピオン酸を介する生合成アシルー酵素中間体についての洞察の探求に用途を見出す。

【0271】

さらなる特定の及び好ましい態様は、添付した独立請求項及び従属請求項に記載する。従属請求項の特徴は、独立請求項の特徴をと適宜組み合わせてもよく、特許請求の範囲に明示的に記載したもの以外の組合せであってもよい。

【0272】

装置の構成が、機能を提供するように操作可能であると記載されている場合、これは、その機能を提供するか又はその機能を提供するように適合若しくは構成された、装置の構成を含むことが理解されるであろう。

【実施例】

【0273】

組換えタンパク質におけるDAP誘導体の遺伝的コード化

【実施例1】

【0274】

本発明者らは、細胞内に構成的に存在するシステイン及びセリンとのDAPの構造的類似性は、DAPを選択的に組み込むアミノアシルーtRNAシンテターゼを発見することが困難であり得ることを示唆していると推論した。したがって、本発明者らは、DAPの4つの保護バージョン（化合物2～5）を設計及び合成した（図3a、補足図2）。本発明者らは、これらのアミノ酸に関するアミノアシルーtRNAシンテターゼ－tRNACUA対の発見により、タンパク質への部位特異的組込みが可能になる、及び遷移金属触媒作用（Li, J. et al. Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. Nat Chem 6, 352-361 (2014)）（2）又は光（Baker, A.S. & Deiters, A. Optical Control of Protein Function through Unnatural Amino Acid Mutagenesis and Other Optogenetic Approaches. Acs Chemical Biology 9, 1398-1407 (2014)）（3～5）を介した、コードされたアミノ酸の翻訳後脱保護によりDAPが露出されると予想した。

【0275】

化合物3及び4はそれぞれ、本発明者らがPCC1RS／tRNACUA及びPCC2RS／tRNACUA対を使用してタンパク質に予め組み込んだ光ケージ化（photocaged）システイン誘導体に対する保存的SH－NH₂置換を含む（Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. Journal of the American Chemical Society 136, 2240-2243 (2014)）。（これらの対は、ピロールリジルーtRNAシンテターゼ／tRNACUA対に由来した）。この類似性は、これらの対がアンバーコドンに応答して、3又は4の組込みを指示する可能性があることを示唆した。しかし、本発明者らは、細胞に3又は4及びその関連した対が提供された場合には、これらの対はレポーター遺伝子中のアンバーコドンを抑制するようには機能しないことを見出した。

【0276】

アミノ酸2～5を組み込む直交性アミノアシルーtRNAシンテターゼを発見する努力の一環として、本発明者らは、MbPYLRS／tRNACUA対の5つのバリエーション

10

20

30

40

50

ブラリー (Susan 1、Susan 2 (Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243 (2014))、Susan 4、PyLS f w d (Nguyen, D.P., Elliott, T., Holt, M., Muir, T.W. & Chin, J.W. Genetically Encoded 1,2-Aminothiols Facilitate Rapid and Site-Specific Protein Labeling via a Bio-orthogonal Cyanobenzothiazole Condensation. *Journal of the American Chemical Society* 133, 11418-11421 (2011)) 及び D 3 (補足表 1)) を調べた。これらのライブラリーは、シンテターゼの活性部位の残基をランダム化しており、ncAA の組込みを可能にするために以前に作製された。Susan 2 ライブラリーは、以前は、システインの光ケージ化誘導体のためのシンテターゼを発見するために使用されていた (Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243 (2014))。本発明者らは、各ライブラリーを、各 ncAA の存在下における 2 ラウンドの連続ポジティブ選択及び ncAA の非存在下における 1 ラウンドのネガティブ選択に供した (Neumann, H., Peak-Chew, S.Y. & Chin, J.W. Genetically encoding N-epsilon-acetyllysine in recombinant proteins. *Nature Chemical Biology* 4, 232-234 (2008)、Chin, J.W. Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals. *Annu Rev Biochem* 83, 379-408 (2014)、Liu, C.C. & Schultz, P.G. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79 79, 413-444 (2010))。しかし、本発明者らは、これらの選択からは化合物 2～5 のためのシンテターゼ／tRNA 対は発見しなかった。

【0277】

化合物 2～5 の log P 予測値を調べることで、それらが非常に親水性であることが明らかになり、そのことが、それらが細胞に入るかどうかを本発明者らが調べる動機となった。LC-MS に基づくアミノ酸取込みアッセイ (Zhang, M.S. et al. Biosynthesis and genetic encoding of phosphothreonine through parallel selection and deep sequencing. *Nat Methods* 14, 729-736 (2017)) を使用した場合、本発明者らは、細胞内で実質的な量のアミノ酸 2～5 を検出しなかった。本発明者らのデータは、化合物 2～5 の細胞内濃度は実質的に 10 μ M 未満であることを示唆している (図 3 b～e)。これらの観察は、化合物 2～5 が大腸菌によっては効率的に取り込まれないか又は代謝されることを示唆している。これは、これらのアミノ酸をインビボで組み込むためのシンテターゼを選択することが可能でなかった理由を説明し得る。

【実施例 2】

【0278】

DAP を含む好ましい非天然アミノ酸

DAP の保護バージョンをコードするという課題に取り組むために、本発明者らは、翻訳後に脱保護されて側鎖アミンを露出させることができると本発明者らが予想する、アミノ酸 6 を設計及び合成した (補足図 2)。このアミノ酸は、アミノ酸 1～5 よりも好都合な log P 予測値を有しており、本発明者らは、細胞培地に 1 mM の 6 を添加すると、細胞内濃度が約 2 mM となることを見出した (図 3 f)。したがって、アミノ酸 2～5 とは異なり、アミノ酸 6 はミリモル濃度で大腸菌内に蓄積することができる。

【実施例 3】

【0279】

DAP tRNA シンテターゼ (「DAPRS」) の作製

多くの以前のアプローチの失敗を考慮して、発明者らは、ランダム化される位置が PyLS の活性部位における 6 のモデルに基づいて注意深く選択された、完全に新しいライブラリー、DAPRS lib を考案及び作製した (補足図 3 及び補足表 1)。

このように知力を働かせた結果、5 つの位置 (Y 2 7 1 ; N 3 1 1 ; Y 3 4 9 ; V 3 6 6 ; W 3 8 2) が 20 種の正準アミノ酸 (canonical amino acids) 全てにランダム化さ

れ、 3.4×10^7 個の異なる配列の理論上のライブラリー多様性がもたらされると判断した。本発明者らは、DAPRS Lib を 6 の存在下及び非存在下で 3 ラウンドの連続ポジティブ及びネガティブ選択 (Neumann, H., Peak-Chew, S.Y. & Chin, J.W. Genetically encoding N-epsilon-acetyllysine in recombinant proteins. Nature Chemical Biology 4, 232-234 (2008)) に供した。この選択に続いて、本発明者らは、cat (112TAG) レポーターを含む細胞中で 96 種のクローンをスクリーニングした。

本発明者らは、6 の存在下で高レベルのクロラムフェニコール耐性を及び 6 の非存在下で最小のクロラムフェニコール耐性を付与する単一のクローンを得た (図 3 g)。

選択したシンテターゼは、MbPylRS に関して 4 つの活性部位変異 (Y271C、N311Q、Y349F、及び V366C) を含む。

(ライブラリーはランダム化された 5 つの位置を含んでいたが、DAPRS には 4 つの変異しか存在しない—DAPRS では 5 番目の位置が野生型 (すなわち、W382) であることに留意すべきである。)

【実施例 4】

【0280】

DAP を含む非天然アミノ酸の、ポリペプチドへの組込み

タンパク質への 6 の、遺伝的に指示された部位特異的組込みをさらに特徴付けるために、150 位にアンバー終止コドン (TAG) を含むスーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) (sfGFP (150TAG) His6) を DAPRS / tRNA^{Pyl}_{CUA} 及び 1mM の 6 の存在下で発現させ、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーによって精製した (図 3 h 及び補足図 4 a)。ベンチマークとして、同じ遺伝子を、PylRS / tRNA^{Pyl}_{CUA} 及び 1mM の、効率的なアンバー抑制をもたらすことが知られている (Virdee, S., Ye, Y., Nguyen, D.P., Komander, D. & Chin, J.W. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. Nature Chemical Biology 6, 750-757 (2010)) N^ε-tert-ブチルオキシカルボニル-リジン (BocK) の存在下で発現させた。

6 を組み込んだ GFP (GFP (6)) の収量は、BocK 組込みの収量と同程度であり、これは、DAPRS / tRNA^{Pyl}_{CUA} 対の効率性を示している。

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により、DAPRS / tRNA^{Pyl}_{CUA} 対がアンバーコドンに回答してタンパク質への 6 の組込みを指示することが確認される (図 3 i、j)。

【実施例 5】

【0281】

DAP を含むアミノ酸の脱保護

ここで、本発明者らは、DAP を含むアミノ酸の脱保護が、DAP 基をポリペプチド主鎖に残し、それによって DAP を含むポリペプチドを生じることを実証する。

【0282】

本発明者らは、アミノ酸 6 を組み込んだタンパク質に 365 nm の光を照射すると、スルフヒドリル基を含む中間体が現れ、これがさらなる反応を受けて DAP をもたらす (カルバメートのカルボニルへのスルフヒドリル基の 5exo-trig 環化及び得られた四面体中間体の崩壊によるアミノ基の放出、又はエピスルフィド及び二酸化炭素を形成してアミノ基を放出することのいずれかにより) 可能性があるとして予想した。実際に、GFP (6) の照射 (365 nm、35 mW cm⁻²、1 min) は、予想されるスルフヒドリルへの 6 の完全な脱保護をもたらした (図 3 i、j)。その後の 37 °C におけるタンパク質のインキュベーションにより、所望のアミノ基が完全に脱保護され、GFP 中のアミノ酸 1 が現れた (図 3 i、j)。

【実施例 6】

【0283】

システインプロテアーゼアシル-酵素中間体の安定的な捕捉

タバコエッチウイルス (TEV、tobacco etch virus) プロテアーゼのようなシステイ

10

20

30

40

50

ンプロテアーゼは通常、Cys-His-Asp触媒三残基を含み、それらの同族の基質で処理すると、チオエステル中間体を生成する (Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. Front Pharmacol 7 (2016)、Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. Journal of Biological Chemistry 277, 50564-50572 (2002))。したがって、本発明者らは、TEVプロテアーゼの活性部位システインをDAPで置き換えて、アシル-酵素中間体を捕捉することを目標とした。0.1mMの6が与えられ、His6-リポイル-TEV (151TAG)-Streptを発現している大腸菌及びDAPRS/tRNA^{Pyl}CUA対を使用して、活性部位の触媒システインを6で置き換える、TEV_{Cys1516}プロテアーゼを生成した。タンパク質を、タンデムアフィニティークロマトグラフィーによって培養物1リットル当たり約0.1mgの収量で精製し、ESI-MSにより、遺伝的にコードされた部位に6が組み込まれていることが確認された。光脱保護は、コードされた6をスルフヒドリル中間体に定量的に変換し、ESI-MSで判断した場合、タンパク質の約70%がその後完全に脱保護され、TEV (TEV_{DAP}) の151位にアミノ酸1が現れた (補足図5)。

【0284】

触媒システインをDAPで置き換えると共有結合プロテアーゼ-基質中間体の捕捉が可能になることを実証するために、本発明者らは、TEV_{DAP}をモデル基質、Ub-His6 (TEV切断部位 (tev) がユビキチン及びヘキサヒスチジンタグと隣接している) と共にインキュベートし、SDS-PAGEによりタンパク質種を分離した。本発明者らは、TEV_{DAP}よりもゆっくりと移動する新しいバンドの形成を観察し、tev部位の切断により生成されたとであろう遊離ユビキチンを観察しなかった (図4a及び補足図4)。ウエスタンブロットは、新しいバンドがTEVとユビキチンの両方を含むことを示している (図4a)。対照実験により、野生型TEVがUb-His6を切断して、より急速に移動するUbにすること、及びTEV (C151A) がUb-His6を切断しないことが確認される (図4a)。これらの実験は、Cys151DAP置換が、TEV及びUbを含む、移動度がより遅いバンドの形成に不可欠であること、並びにUbがTEV_{DAP}変異体から放出されないことを実証する。移動度がより遅いバンドのトリプシンMS/MSにより、DAPとUbの間のイソペプチド結合が同定され、これによりTEV_{DAP}-Ubの形成が確認される (図4b)。したがって、TEVの触媒システインをDAPで置換すると、プロテアーゼサイクルの第1のステップ：基質カルボニルへの求核攻撃を経て、第1の四面体中間体を形成するプロテアーゼの作製が可能になる。この中間体は崩壊して、基質のC末端断片が放出され、加水分解を受けない安定なアミド結合によって、プロテアーゼに共有結合した基質のN末端断片が残される。

【実施例7】

【0285】

Vlm TEの活性及び合成経路

TEドメイン機能についての洞察を得るため及びDAP組込み系で使用するためにそれを調製するために、本発明者らは、Vlm TEをクローン化及び発現させ、得られたVlm TE (TE_{wt}、野生型) タンパク質を、生化学的及び構造的の研究のために精製した。TEドメインのネイティブ基質は、チオエステルによってホスホパンテテイン-PCPに連結されたペプチド中間体 (ペプチジル-PCP) である。グラミシジンS、サーファクチン及びフェンギシンシンテターゼ (Hoyer, K.M., Mahlert, C. & Marahiel, M.A. The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. Chemistry & biology 14, 13-22 (2007)、Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. Journal of molecular biology 359, 876-889 (2006)、Tseng, C.C. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyc

lic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41, 13350-13359 (2002)) に由来するものを含む NRP S T E ドメインにおいて、P C P 連結基質は、ペプチド中間体がチオエステルによって N-アセチルシステインに連結している小分子 (ペプチジル-SNA C) によって模倣できる。本発明者らは、ネイティブペプチドの SNA C 誘導体、D-h i v-D-v a l-L-l a c-L-v a l-SNA C (テトラデブシペプチジル-SNA C 7、補足図 6 及び補足図 7) を合成し、V l m T E_wt とのそのインキュベーションがバリノマイシンの産生をもたらすことを見出した (図 5、補足図 8、9 及び補足表 2) 。これは、V l m T E_wt がテトラデブシペプチジル-SNA C 7 を使用して、その触媒サイクルの全段階: テトラデブシペプチド中間体のオクタデブシペプチドへのオリゴマー化、オクタデブシペプチドのドデカデブシペプチドへのオリゴマー化、及びドデカデブシペプチドの環化によるバリノマイシンの放出を完了できることを実証している。

【0286】

バリノマイシン合成において検出される合成中間体から、2つの可能な経路を差別化する V l m T E_wt によって触媒されるオリゴマー化経路が明らかになる (補足図 10) (Hoyer, K.M., Mahlert, C. & Marahiel, M.A. The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chemistry & biology* 14, 13-22 (2007)、Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000))。V l m T E_wt は、テトラデブシペプチジル-O-T E 中の D-h i v の遠位ヒドロキシルとテトラデブシペプチジル-S-P C P からの L-v a l のカルボニルとの間のエステル結合形成によって (「順方向移動」)、又はテトラデブシペプチジル-S-P C P 中の D-h i v の遠位ヒドロキシルとテトラデブシペプチジル-O-T E からの L-v a l のカルボニルとの間のエステル結合形成 (「逆方向移動」、そのように称されるのは、オクタデブシペプチドが後で再び T E ドメインに移されることになるためである) によって、D-h i v-D-v a l-L-l a c-L-v a l 部分を潜在的にオリゴマー化する可能性がある。テトラデブシペプチジル-SNA C 7 からのバリノマイシン合成の反応の L C-M S は、「逆方向移動」オリゴマー化経路でのみ産生される中間体である、オクタデブシペプチジル-SNA C 11 及びドデカデブシペプチジル-SNA C 15 に相当する質量のシグナルを示した (補足図 7 及び補足図 10) 。一貫して、テトラデブシペプチジル-SNA C 7 と末端ヒドロキシルを欠いているテトラデブシペプチジル-SNA C (デオキシ-テトラデブシペプチジル-SNA C 8) との混合物を使用した実験は、デオキシ-オクタデブシペプチジル-SNA C 12 及びデオキシドデカデブシペプチジル-SNA C 16 のピークを示した (補足図 9) 。オリゴマー化-環化デブシペプチドシンテターゼがより正準な (canonical) グラミシジン S シンテターゼ (Hoyer, K.M., Mahlert, C. & Marahiel, M.A. The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chemistry & biology* 14, 13-22 (2007)、Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000)) と類似した経路を使用することは、全てのオリゴマー化-環化 NRP S (又は P K S (Zhou, Y., Prediger, P., Dias, L.C., Murphy, A.C. & Leadlay, P.F. Macrodilide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 5232-5235 (2015))) がこの合成スキームを使用することを示唆する。最後に、バリノマイシン合成アッセイはまた、16 量体デブシペプチジル-SNA C 19、20 量体デブシペプチジル-SNA C 23 及び環状 16 量体デブシペプチド 29 に相当する小さなピークを示し、これは、V l m T E ドメインが、最終生成物の柔軟性が以前考えられていたよりも若干高いことを示している (図 5 及び補足図 8) 。

【実施例 8】

【0287】

T E ドメインによって媒介されるバリノマイシン合成における重要な中間体の可視化

次に、本発明者らは、 TE_{wt} の強固な及び反復可能な成長のための結晶化条件を得て最適化し、その構造を決定した(図6、補足図11、及び補足表3)。 $Vlm TE$ は、タイプI TEドメインに典型的な α/β ヒドロラーゼの折り畳みの形を取り、Ser2463、His2625及びAsp2490のカノニカルなSer-His-Asp触媒三残基(Horsman, M.E., Hari, T.P.A. & Boddy, C.N. Polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase thioesterase selectivity: Logic gate or a victim of fate? Natural Products Reports (2015))がTEの「リッド」で覆われている。リッドは可動性であることが知られている構造要素であり、基質の位置付けから溶媒の排除まで様々な、TEドメイン機能における役割を果たすことが示唆されている(Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. Journal of molecular biology 359, 876-889 (2006)、Frueh, D.P. et al. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. Nature 454, 903-906 (2008)、Whicher, J.R. et al. Structure and function of the RedJ protein, a thioesterase from the prodiginine biosynthetic pathway in Streptomyces coelicolor. J Biol Chem 286, 22558-22569 (2011))。組成は実質的に異なる可能性があるが、典型的なリッドは約50個の残基及び約2~4個のヘリックスから構成されている。 $Vlm TE$ リッド領域は約88個の残基(約2494~2582)であり、拡張ループ、ここではバンドルとして見られる3つのヘリックス($L\alpha 1\sim 3$)、短い5残基のヘリックス($L\alpha 4$)、長いヘリックス($L\alpha 5$)及び別の短いヘリックス($L\alpha 6$)から構成されている(図6b)。本発明者らは、 TE_{wt} の2つの構造を得たが、これらはリッド領域のみが異なる。1つの構造において、リッドはほぼ完全に秩序化されているが、 $L\alpha 1\sim 4$ を含む領域ではBファクターが顕著に高く、そのため、ドメインの残りの部分とはほとんど接触しない(補足図11b)。第2の TE_{wt} 構造において、 $L\alpha 4\sim 5$ は第1の構造で観察されるものと類似した位置を有するが、 $L\alpha 3$ は活性部位に向かって 10° 回転しており、 $L\alpha 1\sim 2$ は無秩序すぎて、モデル化できない。

【0288】

$Vlm TE$ をデブシペプチジル-SNAC分子と共にインキュベートしても、安定なコンジュゲートは得られず(補足図12a~c及び補足表4)、 TE_{wt} 結晶をデブシペプチジル-SNAC分子と共に浸漬する幾つかの試みでは、活性部位の解釈可能なリガンド電子密度及び周辺部のンフォメーション変化を明らかにできなかった。他のグループは、SNAC分子からアシル-酵素複合体を可視化しようとした場合の同様な頓挫を報告している(補足表6)(Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. Journal of molecular biology 359, 876-889 (2006)、Bruner, S.D. et al. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. Structure 10, 301-310 (2002))。本発明者らは、バリノマイシンの $Vlm TE$ によって媒介される合成におけるアシル-中間体は急速に加水分解し、したがって、予想通り、野生型 $Vlm TE$ を使用して結晶学によって生合成中間体を可視化することは並外れて困難であると結論付ける。

【0289】

$Vlm TE$ のアシル-酵素複合体の可視化を可能にするために、本発明者らは、活性部位のセリン2463がDAP(TE_{DAP})によって置き換えられた $Vlm TE$ を生産した。DAPRS/tRNA_{CUA}対を含み、0.1mMの6が補充された大腸菌における $Vlm 2TE$ (2463TAG)の発現により、セリン2463が6によって置き換えられた $Vlm TE$ の精製が可能になり、収量は培養物1リットル当たり約0.1~0.5mgであった。6の脱保護により、 TE_{DAP} が定量的に生産された(図6c及び補足図13)。

【0290】

Vlm TEの触媒サイクルにおける第1のアシル-TE中間体についての洞察を提供するために、本発明者らは、テトラデプシペプチジル-N-TE_{DAP}コンジュゲートを捕捉した。TE_{DAP}をテトラデプシペプチジル-SNAC 7と共にインキュベートすると、安定なデプシペプチジル-TE_{DAP}中間体が60%を超える収率で生産され（補足図12d及び補足表4）、本発明者らは、バリノマイシン合成を観察しなかった。しかし、注目すべきことには、少量のオクタデプシペプチジル-SNAC 11が観察された（図5b及び補足図8b）。オクタデプシペプチジル-SNAC 11は、テトラデプシペプチジル-N-TE_{DAP}に対するテトラデプシペプチジル-SNAC 7のヒドロキシル基のTE_{DAP}触媒攻撃によって形成される可能性があり、これは、TE_{DAP}がアミドに対するヒドロキシルの攻撃を成功裏に触媒する力を有することを示している。少量のオクタデプシペプチジル-SNAC 11しか形成されなかったのも、この反応が、より等エネルギーのエステル対エステルの反応よりもはるかに遅いことは明白である。アミドに対するヒドロキシルの攻撃は、基質ペプチド主鎖がエステル連結アシル-酵素中間体から切断される、関連セリンプロテアーゼ（Ekici, O.D., Paetzel, M. & Dalbey, R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci* 17, 2023-2037 (2008)）によって用いられる第1の反応に類似している。しかし、この反応を行うようには進化しなかったこのTEドメインが、それを触媒することができたことは、驚くべきことである。

【0291】

本発明者らは、テトラデプシペプチジル-N-TE_{DAP}コンジュゲートに対するテトラデプシペプチジル-SNAC 7のヒドロキシル基のTE_{DAP}触媒攻撃が、コンジュゲートの観察された非定量的収率の一因である可能性があると仮定した。したがって、本発明者らは、デオキシ-テトラデプシペプチジル-SNAC 8をTE_{DAP}とコンジュゲートさせるための条件を最適化し、デオキシ-デプシペプチジル-TE_{DAP}コンジュゲート（約70%）を生産した（図6d及び補足表4）。

【0292】

デオキシ-テトラデプシペプチジル-N-TE_{DAP}コンジュゲートの構造を決定するために、本発明者らは、予め形成したTE_{DAP}結晶をデオキシ-テトラデプシペプチジル-SNAC 8基質類似体と共にインキュベートした。得られた電子密度は、デオキシ-テトラデプシペプチドの残基DAP2463とL-val4の間のアミド結合に関して、若干弱いのはっきりした密度を示す（図6f、h）。L-val4の位置のカルボニル酸素は、残基Ala2399及びLeu2464の主鎖アミド、推定上のオキシアニオンホールに近接している（Tseng, C.C. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41, 13350-13359 (2002)）。次の残基L-lac3に対する密度もあるが、デオキシ-テトラデプシペプチドはアーチ形にせり出しており、これは柔軟性を示しているため、隣接するD-val2及びD-hiv1を、信頼性をもってモデル化するには不十分である。デオキシ-テトラデプシペプチドは、第1のTE_{wt}構造とほぼ同一のコンフォメーションのリッドとは相互作用しない（補足図11b）。

【0293】

次に、本発明者らは、ドデカデプシペプチジル-N-TE_{DAP}コンジュゲートを捕捉することにより、Vlm TEの触媒サイクルにおける最後のアシル-TE中間体についての洞察を得ることに焦点を当てた。本発明者らは、バリノマイシン及びTE_{DAP}のインキュベーションは、環化の逆に類似した反応によってドデカデプシペプチジル-N-TE_{DAP}をもたらす可能性がある、並びにこのコンジュゲートはアミド結合のおかげで熱力学的に好都合なものとなる、と推論した。実際に、最適化された条件下で、本発明者らは、ドデカデプシペプチジル-N-TE_{DAP}コンジュゲートが約65~100%の収率で形成されることを観察した（図6e及び補足表4）。ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}を用いる結晶化試験では、TE_{wt}と類似した条件において結晶が生じたが、形態が異なり、

2つの異なる空間群（非対称ユニット当たり2分子及び6分子をそれぞれ有するH3及びP1）に属していた（補足表3）。

【0294】

ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}の8つの結晶学的に独立した分子は全て、ドデカデプシペプチドに対して若干の密度を示した。分子P1__A～F及びH3__A～Bはそれぞれ、4、3、2、2、2、2、3及び1個のドデカデプシペプチド残基に対して強い密度を示す（補足図14）。追加のより弱い密度が、最大全12残基を収容できるであろう一部の分子に存在し（補足図15）、他の分子においては、より弱い密度が、遠位残基の複数のコンフォメーションを示唆するが、この密度に明確にモデル化することはできなかった。モデル化されたデプシペプチドは全て、活性部位DAPから離れて類似した軌道をたどる。DAPに結合したL-*val*残基が届かないデプシペプチドとTEドメインの間に一貫した相互作用はない（図6g、i）。むしろ、各デプシペプチドはリッドと異なる接触をする。リッドは、ヘリックスL α 1、3、4及び5並びにL α 1のN末端側のストランドで構成される半球状のポケット／立体バリアを形成する。ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}の結晶学的に独立した各分子のリッドは、類似しているが同一ではない位置にあり、リッドヘリックス間のループは、ほとんどの分子において無秩序である（図6k）。これもまた、リッドの可動性を強調し、ドデカデプシペプチジルのコンフォメーション及び秩序の程度が分子間で異なる理由を説明している（図6k）。半球状のバリアは、Vlm TEのアポ及びテトラデプシペプチジル結合構造の両方に見られるリッドのコンフォメーションに関して、ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}構造におけるリッドの大幅な再配置のためにのみ生じる（図6l）。

【0295】

アポ／テトラデプシペプチド結合構造におけるVlm TEリッドの位置を、ドデカデプシペプチド結合構造におけるリッドの位置と比較すると、その極端な可動性が実証及び強調される。一方のリッドのコンフォメーションから他方のコンフォメーションに移移するために、ヘリックスL α 5～6はその位置を維持し、L α 3～4は約45°回転して約13 Å位置を変え（translocate）、L α 2は約25 Å位置を変え、L α 1は短くなり、約13 Å位置を変えて、L α 3～4と反対方向に90°超回転する（図6l、補足アニメーション1、2）。この劇的な再配置は、Vlm TEのリッドヘリックスが、アポ／テトラデプシペプチジル結合構造及びドデカデプシペプチジル結合コンフォメーションの点で顕著に異なるような方法で、一緒に納まることを意味する。

【0296】

はっきりと異なるリッドのコンフォメーションは、デプシペプチドの可能な場所に直接影響する。リッドのアポ／テトラデプシペプチド結合コンフォメーションにおいて、ヘリックスL α 1のC末端はSer/DAP2463の10 Å以内に入り、テトラデプシペプチドがTEコアヘリックス α Eに向かって伸長するように導く。リッドのドデカデプシペプチド結合コンフォメーションにおいて、L α 1に隣接するループがテトラデプシペプチド結合構造中のテトラデプシペプチドが占める場所をブロックする。さらに、ドデカデプシペプチド結合構造においては、L α 1のN末端が半球状のポケットの一部を形成し、これが、環化ステップ中にドデカデプシペプチドをSer/DAP2463に向かってカールバックするのに役立つ可能性がある。

【0297】

結晶構造のモデル及び構造因子は、受入番号6ECB、6ECC、6ECD、6ECE及び6ECFでProtein Data Bankに寄託されている。

【0298】

方法

一般的合成手順。

以下の例外を除いて、試薬は全てSigma-Aldrich社から購入した：L-乳酸はFisher Scientific社から購入し、EDCは、Oakwood Chemicals社（Estil, SC）から、入手可能な最も高純度で購入して、さらに精製せずに使用した。バリノマイシンは、Sig

ma-Aldrich社及びBioShop Canada社から購入した。溶媒は全て、Fisher Scientific社から購入した。反応は全て、特に断りのない限り、乾燥溶媒を使用してアルゴン雰囲気下で行った。NMR分光法は、 ^1H スペクトルの場合は400 MHz及び ^{13}C スペクトルの場合は100 MHzで動作するBruker AVANCE IIを用いて、 ^1H スペクトルの場合300 MHzで、 ^{13}C スペクトルの場合は75 MHzで動作するBruker AVANCE 300を用いて、行った。高分解能質量分析 (HRMS、high-resolution mass spectroscopy) は、ESI測定に対してMicromass Q-TOF I (John L. Holmes Mass Spectroscopy Facility社)で行った。

【0299】

略語：M=モル濃度；conc.=濃；mol=モル；mmol=ミリモル； $^{\circ}\text{C}$ =摂氏度；eq.=当量；h=時間；min=分；r.t.=室温；cat.=触媒、aq.=水性；Su=スクシンイミジル；DIPEA=ジイソプロピルエチルアミン；atm=雰囲気；Boc=tert-ブトキシカルボニル； $t\text{Bu}$ =tert-ブチル；Et=エチル；Ph=フェニル；TFA=トリフルオロ酢酸；THF=テトラヒドロフラン；LC-MS=液体クロマトグラフィー-質量分析；ELS=蒸発光散乱。

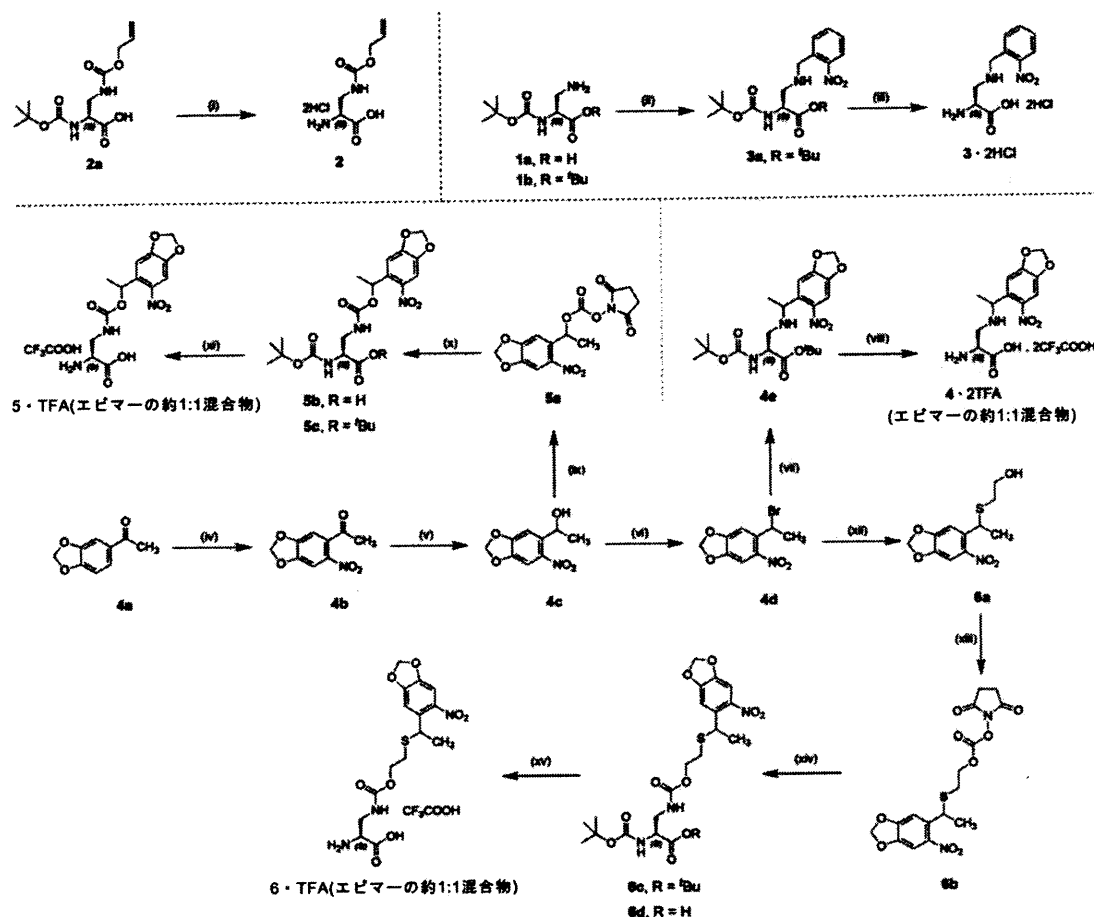
【0300】

アミノ酸の合成

アミノ酸の調製のための一般的な合成スキームを以下に示し、試薬及び条件は以下の通りである：

【0301】

【化29】



【0302】

試薬及び条件：(i) **2a** (10.0 mmol)、HCl (1, 4-ジオキサン中4 M) (8.0 eq.)、 Et_3SiH (2 eq.)、r.t.、1 h、90% (**2**)；(ii) **1b** (19.2 mmol)、2-ニトロベンジルブロミド (1.2 eq.)、DIPEA

A (2.0 eq.)、乾燥THF、r. t.、10 h、67% (3a) ; (iii) 3a (11.6 mmol)、HCl (1, 4-ジオキサン中4M) (8.62 eq.)、Et₃SiH (2.7 eq.)、r. t.、24 h、99% (3・2HCl) ; (iv) 氷CH₃COOH中4a (20.0 mmol) (1.563M)、conc. HNO₃ (70%) に滴下添加、0℃、1 hの滴下添加、次いで40℃、2.5 h、58% (4b) ; (v) 4b (209.0 mmol)、NaBH₄ (0.9 eq.)、少しずつ添加 (8×15 min)、r. t.、CH₃OH-C₂H₅OH-CH₂Cl₂ (44:29:27)、次いで4 h (合計時間=6 h)、r. t.、99% (4c) ; (vi) 4c (75.0 mmol)、PBr₃ (0.4 eq.)、滴下添加)、乾燥CH₂Cl₂、0℃、次いで乾燥ピリジン (cat.)、0℃、15 min、次いでr. t.、1.5 h、89% (4d) ; (vii) Boc-L-Dap-O^tBu 1b (15.0 mmol)、13 (1.2 eq.)、DIPEA (3.0 eq.)、乾燥THF、r. t.、64 h、82% (4e) ; (viii) 4e (9.49 mmol)、TFA (20.64 eq.)、Et₃SiH (6.60 eq.)、乾燥CH₂Cl₂、73% (4・2CF₃COOH) ; (ix) 4c (100.0 mmol)、Su₂O (1.5 eq.)、DIPEA (3.0 eq.)、乾燥CH₃CN、r. t.、16 h、92% (5a) ; (x) 方法1: Boc-L-Dap-O^tBu 1b (14.05 mmol)、5a (1.2 eq.)、DIPEA (3.0 eq.)、乾燥CH₂Cl₂/乾燥THF (2:1)、r. t. 20 h、94% (5c) ; 方法2: 5a (12.5 mmol)、Boc-L-Dap-OH 1a (1.25 eq.)、DIPEA (3.0 eq.)、乾燥THF/乾燥CH₃CN (9:1)、r. t.、24 h、99% (5b) ; (xi) 5b (9.2 mmol)、TFA (21.3 eq.)、乾燥CH₂Cl₂、r. t.、99% (5・CF₃COOH) ; (xii) 4d (21.0 mmol)、2-メルカプトエタノール (1.05 eq.)、1, 4-ジオキサン (脱気)、aq. NaOH (脱気H₂O中0.5M、1.0 eq.)、r. t.、12 h、暗所、アルゴンatm.、95% (6a) ; (xiii) 6a (61.0 mmol)、Su₂O (1.4 eq.)、乾燥DIPEA (4.0 eq.)、乾燥CH₃CN、r. t.、暗所、アルゴンatm.、14 h、定量的変換 (6b) ; (xiv) 方法1: 6b (18.0 mmol)、Boc-L-Dap-O^tBu・HCl 1b (1.6 eq.)、乾燥DIPEA (3.0 eq.)、乾燥CH₃CN、r. t.、10 h、暗所、アルゴンatm.、94% (6c) ; 方法2: 6b (60.0 mmol)、Boc-L-Dap-OH・HCl 1a (1.1 eq.)、乾燥DIPEA (4.0 eq.)、乾燥CH₃CN、r. t.、14 h、暗所、アルゴンatm.、96% (6d) ; (xv) 方法1: 6c (12.066 mmol)、TFA (21.647 eq.)、乾燥Et₃SiH (10.378 eq.)、乾燥CH₂Cl₂、r. t.、暗所、24 h、LC-MS機器 (逆相、移動相としてH₂O-CH₃CN) によりモニタリング、生成物を研和 (CH₃OH/Et₂O) によって精製、64% (6・TFA) ; 方法2: 6d (57.626 mmol)、TFA (9.065 eq.)、乾燥Et₃SiH (2.173 eq.)、乾燥CH₂Cl₂、r. t.、暗所、5 h、LC-MS機器 (逆相、移動相としてH₂O-CH₃CN) によりモニタリング、反応が不完全だった場合は追加のTFA (2 eq. まで) を加えてより長く攪拌させておいた、生成物を研和 (乾燥CH₃OH/Et₂O) によって精製、63% (6・TFA) 。

【0303】

(S)-3-{[(アリルオキシ)カルボニル]アミノ}-2-アミノプロパン酸(2)

【0304】

10

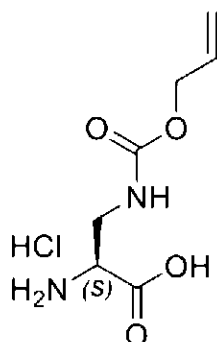
20

30

40

50

【化 3 0】

化学式: $C_7H_{12}N_2O_4 \cdot HCl$

精密質量: 188.07971 (HCl を含まない)

分子量: 224.64100 (HCl を含む)

2

10

【0305】

Boc-Dap (Alloc)-OH 2a (4.325 g、15.0 mmol、1.0 eq.、Bachem Ltd.社から購入) を乾燥 250 mL 一口丸底フラスコに入れ、HCl (1,4-ジオキサン中 4 M、60.0 mL、240.0 mmol、16.0 eq.) に溶解させた。この溶液に乾燥 Et_3SiH (10.0 mL、62.6075 mmol、4.174 eq.) を r. t. で添加すると、直ちにフェイントホワイト (faint white) 色の沈殿物が出現し、これは、窒素雰囲気下、r. t. で攪拌すると時間と共に強さが増大した。24 h 後、インテンスホワイト (intense white) 色の沈殿物が観察され、LC-MS 分析 (C18 逆相カラム、移動相として H_2O-CH_3CN 、勾配) により反応が完了していると判断した。次いで、混合物を減圧下で蒸発させ、生成物を乾燥 CH_3OH (100 mL) に溶解させ、続いて減圧下で蒸発乾固させた。これを 3 回繰り返して、共沸蒸発によって 1,4-ジオキサンの大部分を除去した。残留物を乾燥 CH_3OH (10 mL) に再溶解させ、乾燥 Et_2O (500 mL) で研和して、生成物を沈殿させた。これを濾過し、さらなる Et_2O (2 × 125 mL) で洗浄し、高真空 (< 0.1 mbar) で一晩乾燥させて、(S)-3-{[(アリルオキシ)カルボニル]アミノ}-2-アミノプロパン酸 HCl 塩 2 をブライトホワイト (bright white) 色粉末として得た (3.03 g、90%) ; ^1H NMR (400.13 MHz, $DMSO-d_6$) δ 3.42 ~ 3.56 (m, 2H)、4.48 (d, $J=5.3$ Hz, 2H)、5.15 ~ 5.36 (m, 2H)、5.80 ~ 5.98 (m, 1H)、7.44 ~ 7.60 (m, 1H)、8.24 ~ 8.70 (広幅な s, 3H) ; ^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 40.4 (CH_2)、52.4 (CH)、64.7 (CH_2)、117.2 (CH_2)、133.4 (CH)、156.2 (C)、169.1 (C) ; MS (ESI+) m/z (相対強度) 189 [(M+H)⁺, 100]、134 (4)、81 (9) ; HRMS (ESI+) m/z $C_7H_{13}O_4N_2$ [M+H]⁺ の計算値: 189.0870、実測値 189.0866 ($\Delta = -2.19$ ppm)

20

30

40

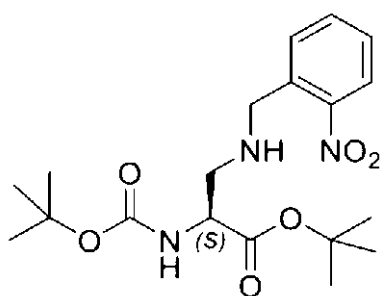
【0306】

tert-ブチル (S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-[(2-ニトロベンジル)アミノ]プロパノエート (3a)

【0307】

50

【化 3 1】

化学式: $C_{19}H_{29}N_3O_6$

精密質量: 395.20564

分子量: 395.45600

3a

10

【0308】

Boc-L-Dap-O^tBu・HCl 1b (5.0 g、19.206 mmol、1.0 eq.) を乾燥500 mL二口丸底フラスコに入れ、これに乾燥THF (75 mL)、続いて乾燥DIPEA (6.69 mL、38.412 mmol、2.0 eq.) を添加した。内容物をアルゴン雰囲気下、0℃において攪拌させておいた。2-ニトロベンジルブロミド (4.979 g、23.048 mmol、1.2 eq.) を別の乾燥250 mL一口丸底フラスコに入れ、乾燥THF (125 mL) に溶解させ、次いで、得られた溶液を、アルゴンの陽圧下、0℃において5 minかけてカニューレによって、Boc-L-Dap-O^tBuを含む主フラスコに移した。次いで、混合物をr. t. まで加温し、r. t. において10 hにわたって攪拌させておいた。次いで、反応混合物を減圧濃縮し、粗混合物をEtOAc (200 mL) で抽出し、ブライン溶液 (3×250 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で脱水し、濾過し、蒸発乾固させて、ブラウン色の粘稠な油状物を得た。生成物を、SiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー (勾配; 溶離剤: EtOAc/n-ヘキサン=1:9→1:4) によって精製して、所望の生成物、tert-ブチル (S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル) アミノ]-3-[(2-ニトロベンジル) アミノ] プロパノエート 3a をフェイントイエロー色の粘稠な油状物として得た (5.05 g、67%) : R_f=0.27 (SiO₂プレート、EtOAc/n-ヘキサン=1:4) ; ¹H NMR (400.13 MHz, 内部標準としてTMSを含むCDCl₃) δ 1.44 (s, 9H)、1.46 (s, 9H)、2.85~3.40 (m, 2H)、4.02 (d, J=14.5 Hz, 1H)、4.07 (d, J=14.5 Hz, 1H)、4.22~4.35 (m, 1H)、5.20~5.55 (m, 1H)、7.41 (ddd, J=8.4, 8.4, 2.0 Hz, 1H)、7.50~7.67 (m, 2H)、7.94 (d, J=8.0 Hz, 1H) ; ¹³C NMR (100.61 MHz, 内部標準としてTMSを含むCDCl₃) δ 28.1 (CH₃)、28.5 (CH₃)、50.7 (CH₂)、50.9 (CH₂)、54.4 (CH)、79.9 (C)、82.3 (C)、124.9 (CH)、128.2 (CH)、131.3 (CH)、133.3 (CH)、135.5 (C)、149.2 (C)、155.7 (C)、170.9 (C)。

20

30

40

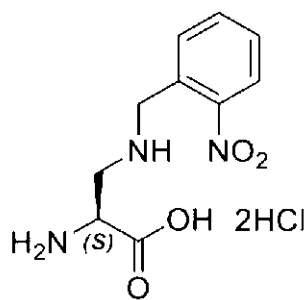
【0309】

(S)-2-アミノ-3-[(2-ニトロベンジル) アミノ] プロパン酸 3

【0310】

50

【化 3 2】

化学式: $C_{10}H_{13}N_3O_4 \cdot 2HCl$

精密質量: 239.09061

分子量: 312.14700 (2HCl塩として)

3. 2HCl

10

【0311】

乾燥100mL一口丸底フラスコに、tert-ブチル(S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-[(2-ニトロベンジル)アミノ]プロパノエート3a(4.59g、11.607mmol、1.0eq.)を装入した。HCl(25mL、1,4-ジオキサン中4M、100.0mmol、8.615eq.)、続いて乾燥Et₃SiH(5.0mL、31.304mmol、2.697eq.)を添加した。内容物を暗所でアルゴン雰囲気下において攪拌した。反応の進行を、TLC分析(SiO₂プレート、EtOAc/n-ヘキサン=3:7)によって定期的に監視した。48h後、インテンスホワイト色の沈殿物が形成され、TLC及びLC-MS分析(C18逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN、勾配)により反応が完了していると判断した。内容物を減圧下で蒸発乾固させた。残りの1,4-ジオキサンを共沸蒸発、3×乾燥CH₃OH(25mL)によって除去した。次いで、内容物を乾燥CH₃OH(25mL)に再溶解させ、0℃に冷却し、乾燥Et₂O(400mL)を用いて研和し、暗所で室温において激しく攪拌して、色の濃い沈殿物を得た。沈殿物を濾過し、さらなる乾燥Et₂O(150mL)、続いて乾燥n-ヘキサン(50mL)で洗浄し、次いで暗所において高真空下(<0.1mbar)で14hにわたって蒸発乾固させて、所望の生成物、(S)-2-アミノ-3-[(2-ニトロベンジル)アミノ]プロパン酸HCl塩3をオフホワイト色粉末として得た(3.575g、99%)：¹H NMR(400.13MHz, CD₃OD) δ 3.68(dd, J=13.2, 5.6Hz, 1H)、3.81(dd, J=13.2, 7.7Hz, 1H)；4.48(dd, J=7.7, 5.6Hz, 1H)、4.65(d, J=13.2Hz, 1H)、4.69(d, J=13.2Hz, 1H)、7.74~7.82(m, 1H)、7.84~7.95(m, 2H)、8.30(見かけ上d, J=8.1Hz, 1H)；¹³C NMR(100.61MHz, CD₃OD) δ 47.8(CH₂)、50.2(CH)、50.7(CH₂)、127.1(CH)、127.3(C)、132.8(CH)、135.3(CH)、136.0(CH)、150.3(C)、169.0(C)；MS(ESI+, LC-MS) m/z(相対強度) 240 [(M+H)⁺, 100%]。

20

30

40

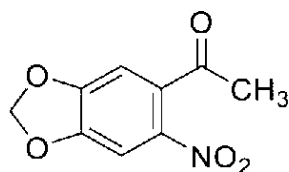
【0312】

4',5'-メチレンジオキシ-2'-ニトロアセトフェノン(4b)

【0313】

50

【化 3 3】



4b

化学式: $C_9H_7NO_5$

精密質量: 209.03242

分子量: 209.15700

10

【0 3 1 4】

McGall et al. (McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)) によって記載された手順をわずかに変更したものに従って、3', 4'-(メチレンジオキシ)アセトフェノン 4a (16.416 g, 0.1 mol) の氷 CH_3COOH (64 mL) 中溶液を、0℃において1 h かけて、conc. HNO_3 (136 mL、強度70%) を含む2リットル三口丸底フラスコに滴下添加した。反応混合物を、添加中及びさらに1 h にわたって、アルゴン雰囲気下で攪拌しながら0℃に維持した。次いで、混合物を40℃に加温し、さらに2.5 h 攪拌した。最後に、混合物をr. t. に冷却し、ビーカー中の砕氷(1リットル)にゆっくり注いだ。イエロー色沈殿物が出現した。これを15分間攪拌し、次いで濾過した。イエロー色固体を水(3×200 mL)で洗浄し、真空中で乾燥させた。次いで、粗イエロー色固体を再結晶(THF/n -ヘキサン)、次いで SiO_2 でのフラッシュクロマトグラフィー〔溶離剤: CH_2Cl_2/n -ヘキサン(1:1)から100% CH_2Cl_2 〕によって精製して、4', 5'-メチレンジオキシ-2'-ニトロアセトフェノン (Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243 (2014)、McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)、Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methylenedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)) 4bをイエロー色結晶として得た(12.141 g、58%) : $R_f = 0.52$ (CH_2Cl_2) ; m. p. 122.8~124.0℃ (Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methylenedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)) m. p. 112℃) ; ^1H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$) δ 2.45 (s, 3H)、6.16 (s, 2H)、6.71 (s, 1H)、7.48 (s, 1H) ; ^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 30.2 (CH_3)、103.8 (CH_2)、104.8 (CH)、106.2 (CH)、135.1 (C)、140.1 (C)、148.9 (C)、152.8 (C)、199.3 (C) ; IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 2980、1708、1525、1506、1484、1424、1362、1338、1271、1152、1038、932、875、819 cm^{-1} ; MS (ESI+) m/z (相対強度) 232 [(M+Na)⁺, 100%]、210 (2)、209 (7)、194 (100)、171 (45)、130 (32)、111 (9)。

20

30

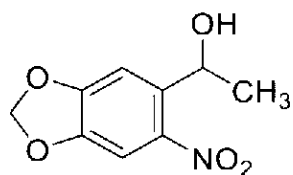
40

【0 3 1 5】

(R, S)-1-[4', 5'-(メチレンジオキシ)-2'-ニトロフェニル]エタノール

50

(4c)
【0316】
【化34】



4c

化学式: $C_9H_9NO_5$
精密質量: 211.04807
分子量: 211.17300

10

【0317】

4', 5'-メチレンジオキシ-2'-ニトロアセトフェノン 4b (43.714 g、0.209 mol、1.0 eq.) を、2リットル一口丸底フラスコ中で CH_2Cl_2 (400 mL)、 CH_3OH (650 mL) 及び無水 CH_3CH_2OH (425 mL) に懸濁させた。混合物を r. t. において 10 min 超音波処理して、イエロー色固体の大部分を溶解させた。NaBH₄ 顆粒 (7.116 g、0.188 mol、0.9 eq.) を 15 °C において 8 回に分けて (それぞれ 0.890 g) 15 min 毎に (合計時間 = 2 h) イエロー色懸濁液に添加した。注: NaBH₄ が溶解すると発泡が出現し、反応混合物は均質なイエロー色溶液になった。添加完了後、反応混合物を r. t. でさらに 4 h 撹拌した。この後、TLC 分析 (SiO_2 、TLC 溶離剤: 100% CH_2Cl_2) によって、反応が完了していると判断し、r. t. でさらに 2 h 撹拌しながら乾燥アセトン (100 mL) を添加することによって、反応をクエンチした。次いで、混合物を減圧下で蒸発乾固させて、イエロー色固体を得た。続いて、固体を CH_2Cl_2 (800 mL) に再溶解させ、逐次的に飽和 aq. NH_4Cl 溶液 (3 × 500 mL) で、最後に飽和 aq. $NaCl$ 溶液 (6 × 800 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で脱水し、濾過し、高真空で蒸発乾固させて、(R, S)-1-[4', 5'-(メチレンジオキシ)-2'-ニトロフェニル] エタノール (Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243 (2014)、McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)) 4c をイエロー色固体として得た (43.563 g、99%) : $R_f = 0.19$ (CH_2Cl_2) ; m. p. 76.5 ~ 77.5 °C ; ^1H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$) δ 1.50 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H)、2.54 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H)、5.42 (qd, $J = 6.3, 3.0$ Hz, 2H)、6.096 (見かけ上 d, $^2J_{HH} = 3.5$ Hz, 1H, ジアステレオトピック OCH_2O)、6.104 (見かけ上 d, $^2J_{HH} = 3.5$ Hz, 1H, ジアステレオトピック OCH_2O)、7.24 (s, 1H)、7.42 (s, 1H) ; ^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 24.3 (CH_3)、65.8 (CH)、103.1 (CH_2)、105.2 (CH)、106.4 (CH)、139.2 (C)、141.5 (C)、147.0 (C)、152.5 (C) ; IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3649、2980、2889、2360、2343、1521、1506、1482、1393、1340、1253、1135、1090、1038、934、819 cm^{-1} ; MS (ESI+) m/z (相対強度) 234 [(M+Na)⁺, 1%]、194 [(M-OH)⁺, 100]、130 (20) ; HRMS (ESI+) m/z $C_9H_9NO_5$ [M+Na]⁺ の計算値: 234.0373、実測値 234.0364 ($\Delta = -3.95$ ppm)。

20

30

40

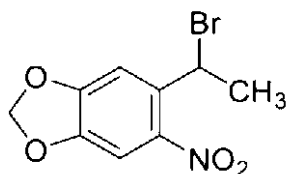
【0318】

50

(R, S) - 1 - ブロモ - 1 - [4 ' , 5 ' - (メチレンジオキシ) - 2 ' - ニトロフェニル] エタン (4 d)

【 0 3 1 9 】

【 化 3 5 】



化学式: $C_9H_8BrNO_4$

精密質量: 272.96367

分子量: 274.07000

4d

10

【 0 3 2 0 】

1 リットル三口丸底フラスコを、真空中でヒートガンを使用して 100°C 超において 15 min 乾燥させ、乾燥アルゴンガスでパージし、室温まで冷却させた。これに、(R, S) - 1 - [4 ' , 5 ' - (メチレンジオキシ) - 2 ' - ニトロフェニル] エタノール、4 c (15.838 g、75.0 mmol、1.0 eq.) を添加した。4 c を乾燥 CH_2Cl_2 (375 mL、完全に溶解させるには超音波処理が必要であった) に溶解させ、アルゴン雰囲気下で 0°C に冷却し、丸底フラスコをアルミ箔で包んで、遮光した。20 min 後、 PBr_3 (2.82 mL、30.0 mmol、0.4 eq.) を、 0°C においてシリジポンプを使用して 10 min にわたって滴下添加し、続いて乾燥ピリジン (0.5 mL) を添加した。イエロー色反応混合物を 0°C において 15 min にわたって攪拌し、次いで r. t. にし、1.5 h にわたって連続的に攪拌した。TLC 分析 (SiO_2 、TLC 溶離剤: 100% CH_2Cl_2) によって、反応が完了していると判断し、 0°C に冷却し、乾燥 CH_3OH (15 mL) の添加によってクエンチし、r. t. に加温し、アルゴン雰囲気下で 30 min にわたって攪拌した。クエンチの完了後、ロータリーエバポレーターを使用して減圧下で反応混合物を蒸発乾固させた。得られたイエロー色ゴム状物を、 CH_2Cl_2 (300 mL) 及び飽和 aq. NaHCO_3 溶液 (300 mL) に溶解させた。内容物を分液漏斗に入れ、水性相を廃棄し、有機相を、さらなる飽和 aq. NaHCO_3 溶液 ($1 \times 300\text{ mL}$) 及び飽和 aq. NaCl 溶液 ($3 \times 300\text{ mL}$) で逐次洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で脱水し、濾過し、蒸発乾固させて、イエロー色固体を得た。粗生成物を、 SiO_2 でのフラッシュクロマトグラフィー [溶離剤: CH_2Cl_2 / n-ヘキサン (1 : 1)、次いで 100% CH_2Cl_2] によって精製して、(R, S) - 1 - ブロモ - 1 - [4 ' , 5 ' - (メチレンジオキシ) - 2 ' - ニトロフェニル] エタン (Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. Journal of the American Chemical Society 136, 2240-2243 (2014)) 4 d (18.330 g、89%) の純粋な試料をシャイニングイエロー色の結晶として得た。試料を -20°C の冷凍庫中、乾燥雰囲気下で暗所において数ヶ月間保存し、著しい分解はなかった: $R_f = 0.17$ (CH_2Cl_2 / n-ヘキサン、1 : 4) ; m. p. $76.1 \sim 77.8^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400.13 MHz, CDCl_3) δ 2.04 (d, $J = 6.8\text{ Hz}$, 3 H)、5.89 (q, $J = 6.8\text{ Hz}$, 1 H)、6.13 (s, 2 H)、7.27 (s, 1 H)、7.35 (s, 1 H) ; ^{13}C NMR (100.61 MHz, CDCl_3) δ 27.6 (CH_3)、42.9 (CH)、103.3 (CH_2)、105.1 (CH)、108.8 (CH)、134.8 (C)、141.6 (C)、147.7 (C)、152.1 (C) ; IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 2981、2970、2930、1615、1504、1481、1420、1395、1385、1328、1305、1257、1156、1141、10

20

30

40

50

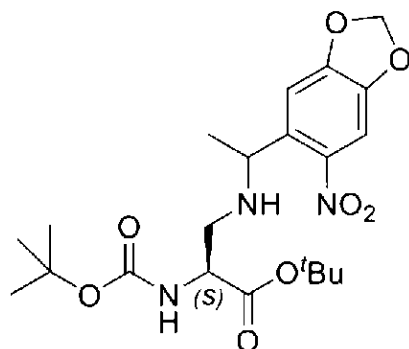
57、1028、1014、957、925、872、815、752、730、719、698 cm^{-1} ; HRMS (ESI+) m/z $\text{C}_9\text{H}_8^{79}\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値: 295.9529、実測値 295.9519 ($\Delta = -3.45$ ppm)。

【0321】

tert-ブチル (2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エチル]アミノ}プロパノエート (4e)

【0322】

【化36】



化学式: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$

精密質量: 453.21111

分子量: 453.49200

4e

【0323】

Boc-L-Dap-O^tBu · HCl 1b (6.233 g、21.0 mmol、1.1 eq.) を、乾燥1リットル三口丸底フラスコ中で乾燥THF (275 mL) に懸濁させ、乾燥DIPEA (9.98 mL、57.273 mmol、3.0 eq.) を添加した。内容物を窒素雰囲気下、r.t. で10 min にわたって攪拌した。フラスコをアルミ箔で包み、内容物を暗所で保管した。次いで、(R, S)-1-ブromo-1-[4', 5'- (メチレンジオキシ)-2'-ニトロフェニル]エタン 4d (5.232 g、19.091 mmol、1.0 eq.) を反応混合物に添加した。均質なイエロー色溶液を暗所で窒素雰囲気下、r.t. において68 h にわたって攪拌させておいた。TLC分析 (SiO₂プレート; CH₂Cl₂/n-ヘキサン=3:7) によって、反応が完了していると判断し、減圧下で蒸発乾固させて、ダークブラウン色の油状物を得た。粗反応油状物をCH₂Cl₂ (250 mL) に溶解させ、飽和ブライン溶液 (3×500 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で脱水し、濾過し、蒸発乾固させて、ダークブラウン色の粘稠な油状物を得た。次いで、これを、SiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー (勾配; 溶離剤: 100% CH₂Cl₂、次いでCH₂Cl₂/CH₃OH/NEt₃=94:5:1) によって精製して、所望の生成物、tert-ブチル (2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エチル]アミノ}プロパノエート 4e をイエローブラウン色の粘着性ゴム状物として得た (7.49 g、87%) : $R_f = 0.13$ (SiO₂プレート、CH₂Cl₂) ; ¹H NMR (400.13 MHz, 内部標準としてTMSを含むCDCl₃) δ 1.34 及び 1.36 (2×d, J=3.6 及び 3.6 Hz, 3H)、1.42 及び 1.450 (2×s, 9H)、1.454 及び 1.47 (2×s, 9H)、2.54~2.74 (m, 1H)、2.75~2.89 (m, 1H)、4.03~4.27 (m, 1H)、4.28~4.53 (m, 1H)、5.15~5.43 (m, 1H)、6.05~6.10 (m, 2H)、7.21 (見かけ上広幅なs, 1H)、7.345 及び 7.352 (2×s, 1H) ; ¹³C NMR (100.61 MHz, 内部標準として

10

20

30

40

50

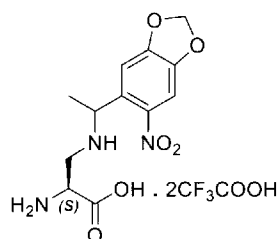
TMSを含むCDCl₃) δ (ジアステレオマーの混合物) 23.9 (CH₃)、24.0 (CH₃)、28.12 (CH₃)、28.15 (CH₃)、28.41 (CH₃)、28.46 (CH₃)、49.3 (CH₂)、49.4 (CH₂)、53.1 (CH)、53.2 (CH)、54.3 (CH)、54.5 (CH)、79.9 (C)、80.1 (C)、82.3 (C)、82.4 (C)、102.8 (2×CH₂)、105.2 (2×CH)、106.77 (CH)、106.83 (CH)、138.1 (C)、143.30 (C)、143.37 (C)、146.7 (C)、152.1 (C)、152.2 (C)、155.5 (C)、155.6 (C)、170.7 (C)、170.8 (C); MS (ESI+) m/z (相対強度) 454 [(M+H)⁺, 86%], 301 (70)、261 (100)、205 (7)、203 (10)、186 (7)、147 (10); HRMS (ESI+) m/z C₂₁H₃₂O₈N₃ [M+H]⁺の計算値: 454.2184、実測値 454.2201 (Δ=3.65 ppm)。

【0324】

(2S)-2-アミノ-3-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル]アミノ}プロパン酸(4)

【0325】

【化37】



4. 2TFA

(エピマーの約1:1混合物)

化学式: C₁₂H₁₅N₃O₆·2CF₃COOH

精密質量: 297.09609

分子量: 525.31342 (CF₃COOHの二塩として)

【0326】

tert-ブチル (2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル]アミノ}プロパノエート 4e (4.303 g、9.489 mmol、1.0 eq.) を、光を排除するためにアルミ箔で包んだ乾燥250 mL 丸底フラスコ中で乾燥CH₂Cl₂ (30 mL) に溶解させた。新たに蒸留したCF₃COOH (15 mL、195.887 mmol、20.644 eq.) を添加すると、イエロー色溶液がブラウン色に変わった。乾燥Et₃SiH (10.0 mL、62.608 mmol、6.598 eq.) を添加し、反応混合物を暗所でr. t. において攪拌した。反応をLC-MS分析によって定期的に監視した。48 h後、LC-MS分析 (C18 逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN、勾配) によって反応が完了していると判断し、次いで、混合物を蒸発乾固させて、ダークブラウン色のゴム状物を得た。乾燥2 L 丸底フラスコ中で、このゴム状物を無水CH₃OH (10 mL) に溶解させ、アルゴン雰囲気下において0℃に冷却した。これを、0℃において乾燥Et₂O (900 mL) の添加によって研和し、次いで、r. t. で1 hにわたって激しく攪拌して、ペールイエロー色の沈殿物を得た。沈殿物を濾過し、追加の乾燥Et₂O (2×200 mL) で、続いてn-ヘキサン (150 mL) で洗浄した。ペールイエロー色の粉末を、100 mL 丸底フラスコに移し、暗所において高真空 (<0.1 mbar) で40 hにわたって乾燥させた。(2S)-2-アミノ-3-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル]アミノ}プロパン酸 4が、さらさらしたペールイエロー色の粉末として得られた (3.646 g、73%)。生成物は、CF₃COOHの塩及びエピマーの約1:1混合物である。生成物を暗所でアルゴン下、-20℃において保存した: ¹H NMR (400.13 MHz, 内部標

準としてTMSを含むDMSO- d_6) δ 1.36及び1.38 (2 $\times$ d, J =3.8及び3.8 Hz, 3H)、2.65~2.95及び2.96~3.20 (2 $\times$ m, 1H)、3.07~3.25 (m, 1H)、3.60~3.70 (m, 1H)、3.71~3.85及び4.18~4.44 (2 $\times$ m, 1H)、6.21及び6.23 (2 $\times$ d, J =3.5及び2.9 Hz, 2H)、7.41及び7.42 (2 $\times$ s, 1H)、7.52及び7.53 (2 $\times$ s, 1H); ^{13}C NMR (100.61 MHz, 内部標準としてTMSを含むDMSO- d_6) δ (ジアステレオマーの混合物) 22.6 (CH_3)、22.7 (CH_3)、38.5 (CH_2)、45.8 (CH_2)、51.6 (CH)、51.8 (CH)、52.3 (CH)、52.6 (CH)、103.2 (CH_2)、103.3 (CH_2)、104.5 (CH)、104.6 (CH)、106.4 (CH)、106.6 (CH)、117.1 (C, q, $^1J_{\text{C-F}}$ =299.0 Hz)、135.4 (C)、135.6 (C)、142.96 (C)、143.01 (C)、146.61 (C)、146.66 (C)、151.93 (C)、151.96 (C)、158.56 (C, q, $^2J_{\text{C-F}}$ =31.5 Hz)、168.7 (2 $\times$ C)、169.6 (2 $\times$ C); MS (ESI+) m/z (相対強度) 298 [(M+H) $^+$, 100%], 261 (10)、225 (10)、211 (4)、147 (12)、144 (9)、134 (6)、105 (9)、82 (31); HRMS (ESI+) m/z $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_3$ [M+H] $^+$ の計算値: 298.1034、実測値 298.1039 (Δ =1.74 ppm)。

10

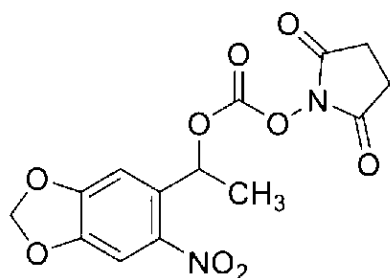
【0327】

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル (1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジ
オキソール-5-イル)エチル)カーボネート(5a)

20

【0328】

【化38】



5a

化学式: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_9$

精密質量:352.05428

分子量:352.25500

30

【0329】

(R, S)-1-[4', 5'-(メチレンジオキシ)-2'-ニトロフェニル]エタノール 4c (42.234 g、200.0 mmol、1.0 eq.)を、乾燥2リットル三口丸底フラスコに装入し、乾燥 CH_3CN (1 L)に溶解させた。この溶液に、乾燥DIEPEA (104.5 mL、600.0 mmol、3.0 eq.)、続いてN,N-ジスクシンイミジルカーボネート (80.896 gの純度 $\geq$ 95%、300 mmol、1.5 eq.)を添加した。フラスコをアルミ箔で包んで、内容物を暗所で保管した。不均質なイエロー色反応混合物を、暗所でアルゴン雰囲気下、r.t.において攪拌した。16 h後、反応混合物は均質であり、TLC分析(SiO_2 プレート、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =1:19)によって反応が完了していると判断した。次いで、イエロー色反応混合物を、Biotage (登録商標) Isolute HM-N吸着剤に吸着させ、減圧乾燥させた。次いで速やかに、これを、暗所において SiO_2 でのフラッシュクロマトグラフィー[溶離剤: CH_2Cl_2 、次いで $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =1:19]に供して、所望の生成物、2,5-

40

50

ジオキソピロリジン-1-イル- (1- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル) カーボネート 5aをイエロー色の針状結晶として得た (65.051 g、92%) [注: SiO₂への長時間曝露時の生成物の分解を回避するために、フラッシュカラムは速やかに行わなければならない]。生成物5aを直ちに、後続ステップに使用した。これは、-20℃の冷凍庫中で暗所において保存可能である: R_f=0.6 (SiO₂プレート、CH₃CN/CH₂Cl₂=1:19); ¹H NMR (400.13 MHz, 内部標準としてTMSを含むCDCl₃) δ 1.75 (d, J=6.4 Hz, 3H)、2.81 (s, 4H)、6.15 (d, J=3.0 Hz, 2H)、6.42 (q, J=6.4 Hz, 1H)、7.11 (s, 1H)、7.51 (s, 1H); ¹³C NMR (100.61 MHz, 内部標準としてTMSを含むCDCl₃) δ 22.2 (CH₃)、25.6 (CH₂)、76.4 (CH)、103.5 (CH₂)、105.5 (CH)、105.8 (CH)、133.1 (C)、141.6 (C)、148.0 (C)、150.7 (C)、153.0 (C)、168.6 (C)。

10

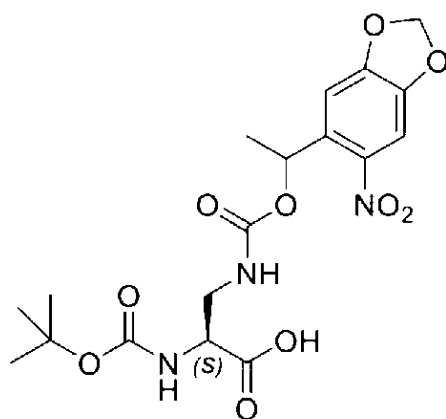
【0330】

(2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-({[1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エトキシ] カルボニル}-アミノ)プロパン酸 (5b)

【0331】

【化39】

20



化学式: C₁₈H₂₃N₃O₁₀

精密質量: 441.13834

分子量: 441.39300

5b

30

【0332】

Boc-L-Dap-OH 1a (2.553 g、12.5 mmol、1.25 eq.)を、光を排除するためにアルミ箔で包んだ乾燥1リットル一口丸底フラスコ中で乾燥THF (180 mL) 及び乾燥CH₃CN (20 mL) に懸濁させた。この混合物に、乾燥DIPEA (5.23 mL、30.0 mmol、3.0 eq.)を添加し、内容物をアルゴン雰囲気下、r. t. で20 minにわたって攪拌し、その後、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル- (1- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル) カーボネート 5a (3.523 g、10.0 mmol、1.0 eq.)を添加した。この不均質混合物を暗所でアルゴン雰囲気下、r. t. において攪拌し、反応の進行を、LC-MS分析によって定期的に監視した。数時間後、不均質混合物は均質なイエロー色溶液になり始めた。24 h後、反応が完了していると判断し、内容物をBiotage (登録商標) Isolute HM-N吸着剤に吸着させ、減圧乾燥させた。次いで速やかに、これを、暗所においてSiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー [溶離剤: CH₂Cl₂、次いでCH₂Cl₂/CH₃OH/CH₃COOH=94:5:1] に供して、所望の生成物、(2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-({[1-(6-

40

50

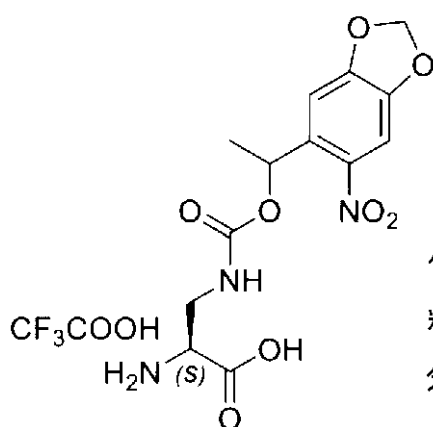
ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エトキシ] カルボニル} アミノ) プロパン酸 5b をブラウン-イエロー色ゴム状物として得た。これを、減圧下で CH_2Cl_2 / シクロヘキサン (1 : 1) を使用する共沸蒸発に供して、生成物 5b から残留 CH_3COOH を除去した。生成物を高真空で乾燥させて、5b の純粋な試料をイエロー色固体 (4.360 g, 99%) 及びエピマーの約 1 : 1 混合物として得た; $R_f = 0.41$ (SiO_2 プレート、 CH_2Cl_2 / CH_3OH / $\text{CH}_3\text{COOH} = 94 : 5 : 1$); MS (ESI^- 、 LC-MS) m/z (相対強度) 440 [$(\text{M}-\text{H})^-$ 、100%]。

【0333】

(2S)-2-アミノ-3-({ [1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エトキシ] カルボニル} -アミノ) プロパン酸 (5)

【0334】

【化40】



化学式: $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_8 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$

精密質量: 341.08591

分子量: 455.29921 (TFAを含む)

5.TFA (エピマーの約1:1混合物)

【0335】

新たに蒸留した CF_3COOH (15 mL、195.894 mmol、21.293 eq.) を、アルミ箔で包んだ乾燥 1 L-口丸底フラスコ中で、(2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-({ [1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) -エトキシ] カルボニル} アミノ) プロパン酸 5b (4.061 g, 9.2 mmol、1.0 eq.) の乾燥 CH_2Cl_2 (50 mL) 中の溶液に添加した。 CF_3COOH を添加すると、イエロー色溶液がダークブラウン色に変わった。反応物を暗所で r. t. において攪拌し、 TLC 分析によって監視した。2 h 後、 TLC 分析 (SiO_2 プレート; CH_2Cl_2 / CH_3OH / $\text{CH}_3\text{COOH} = 94 : 5 : 1$) 及び LC-MS 分析 (C18 逆相カラム、移動相として $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ 、勾配) の両方によって、反応が完了していると判断した。反応混合物を減圧下で蒸発乾固させて、ダークブラウン色のゴム状物を得た。このゴム状物を乾燥 CH_3OH (5 mL) に溶解させ、0°C に冷却し、乾燥 Et_2O (0.9 L) を用いて研和して、ペールイエロー色沈殿物を得た。混合物を、暗所でアルゴン雰囲気下、r. t. において激しく攪拌させておいた。次いで、ペールイエロー色沈殿物を濾過し、 Et_2O (2 × 100 mL) 及び乾燥ヘキサン (50 mL) で洗浄した。これを真空中で (< 0.1 mbar) 2 日間暗所で乾燥させて、所望の (2S)-2-アミノ-3-({ [1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エトキシ] カルボニル} -アミノ) プロパン酸 TFA 塩 5 を、微細なペールイエロー色粉末 (4.132 g, 99%) 及び ^1H 及び ^{13}C NMR 分光分析によって観察されたエピマーの約 1 : 1 混合物として得た: ^1H NMR (400.

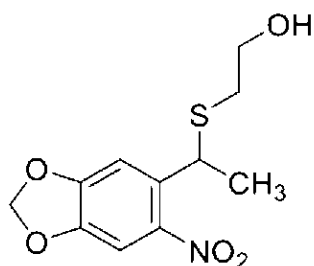
13 MHz, CD₃OD) δ 1.57 (d, J = 6.2 Hz, 3H)、2.68 (s, 2H)、3.41~3.58 (m, 1H)、3.59~3.74 (m, 1H)、3.78~4.15 (m, 1H)、6.14 (s, 2H)、6.22 (q, J = 6.2 Hz, 1H)、7.12 (見かけ上 d, J = 5.2 Hz, 1H)、7.47 (s, 1H); ¹³C NMR (100.61 MHz, CD₃OD) δ 22.4 (CH₃)、22.5 (CH₃)、42.1 (CH₂)、42.3 (CH₂)、55.6 (CH)、55.9 (CH)、70.4 (2×CH)、104.8 (2×CH₂)、105.7 (2×CH)、106.7 (CH)、106.9 (CH)、118.2 (C, q, ¹J_{C-F} = 292.6 Hz)、136.8 (C)、137.1 (C)、142.8 (C)、142.9 (C)、148.8 (C)、154.0 (C)、158.5 (C)、158.6 (C)、163.1 (C, q, ²J_{C-F} = 34.4 Hz)、170.9 (2×C)、174.9 (2×C); MS (ESI+) m/z (相対強度) 342 [(M+H)⁺, 100%]、311 (10)、233 (5)、189 (9)、130 (19); HRMS (ESI+) m/z C₁₃H₁₆O₈N₃ [M+H]⁺の計算値: 342.0932、実測値 342.0923 (Δ = -2.63 ppm)。

【0336】

2- { [1- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ } エタン-1-オール (6a)

【0337】

【化41】



化学式: C₁₁H₁₃NO₅S

精密質量: 271.05144

分子量: 271.28700

6a

【0338】

新たに調製した NaOH の溶液 (0.5 M、40 mL の脱イオン H₂O 中 8 g、20.0 mmol、1 eq.) を 500 mL の丸い三口丸底フラスコ (round 3-necked round-bottomed flask) に入れ、r. t. でアルゴンガス流によるバブリングによって溶液を脱気した。30 min 後、メルカプトエタノール (1.47 mL、21.0 mmol、1.05 eq.) をフラスコに添加し、さらに 15 min にわたって脱気を続けた。これとは別に、新たに、(R, S)-1-ブromo-1-[4', 5'-(メチレンジオキシ)-2'-ニトロフェニル]エタン 13 (5.481 g、20.0 mmol、1.0 eq) を、アルミホイルで包んだ 100 mL 丸底フラスコ中で、1, 4-ジオキサン (20 mL) に溶解させ、暗所で 15 min にわたって、アルゴンガス流のバブリングによって脱気した。脱気した、13 の 1, 4-ジオキサン中溶液を、aq. NaOH 及びメルカプトエタノール溶液を含むフラスコに、r. t. において 90 min の期間にわたってアルゴンガスの陽圧下でカニユーレを使用して 1 滴ずつ移した。イエロー色沈殿物が形成された。次いで、これを、脱気された 1, 4-ジオキサン (60 mL) の添加によって溶解させ、続いて、均質な透明イエロー色溶液が得られるまで、30 min にわたって超音波処理した。

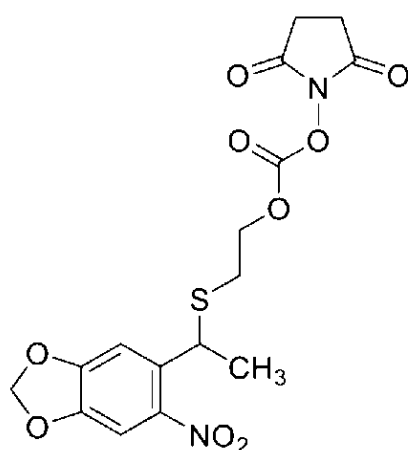
次いで、内容物を、暗所でアルゴン雰囲気下、r. t. において12 hにわたって攪拌させておいた。その後、TLC及びLC-MS分析（C18逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN、勾配）によって、反応が完了していると判断した。次いで、混合物を減圧蒸発させて、揮発性有機成分を除去した。次いで、イエロー色の水性内容物を、EtOAc（2×175 mL）で抽出し、合わせた有機相を、飽和NH₄Cl溶液（1×500 mL）、続いてブライン溶液（3×500 mL）で洗浄した。次いで、有機層を分離し、無水Na₂SO₄で脱水し、濾過し、蒸発乾固させて、イエロー色の油状物を得た。生成物を、暗所においてSiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー（溶離剤：EtOAc／n-ヘキサン＝3：7）によって精製して、2- { [1- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エタン-1-オール 6aを粘着性のイエロー色油状物として得た（5.179 g、95%）：R_f＝0.33（SiO₂プレート、EtOAc／n-ヘキサン＝3：7）；¹H NMR（400.13 MHz, CDCl₃）δ 1.55（d, J＝7.0 Hz, 3H）、1.96（t, J＝5.9 Hz, 1H）、2.44～2.65（m, 2H）、3.52～3.74（m, 2H）、4.78（q, J＝7.0 Hz, 1H）、6.10（dd, J＝3.8, 1.0 Hz, 2H）、7.27（s, 1H）、7.28（s, 1H）；¹³C NMR（100.61 MHz, CDCl₃）δ 23.2（CH₃）、34.9（CH₂）、38.4（CH）、60.9（CH₂）、103.1（CH₂）、104.8（CH）、108.0（CH）、136.1（C）、143.3（C）、146.9（C）、152.0（C）；IR（非希釈）ν_{max} 3393、2980、1617、1518、1503、1480、1418、1375、1332、1252、1156、1031、928、872、817、759；m/z（ESI-, LC-MS）270.1 [(M-H)⁻, 100%]。

【0339】

2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル- (2- { [1- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エチル) カーボネート (6b)

【0340】

【化42】



化学式:C₁₆H₁₆N₂O₉S

精密質量:412.05765

分子量:412.36900

6b

【0341】

DAP誘導体 6c及び6dの合成のための後続反応に使用する中間体6bを、アルコール6aから出発してインサイチュで合成した。500 mL三口丸底フラスコを、ヒートガンを使用して真空中で乾燥させ、アルゴンガスでパージした；この手順を、使用前に3回繰り返した。乾燥フラスコに、乾燥CH₃CN（90 mL）に溶解させた2- { [1-

(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エチル}チオ}エタン-1-オール 6a (4.883 g、18.0 mmol、1.0 eq.) を装入した。この反応混合物に、暗所でアルゴン雰囲気下、r. t. において、乾燥DIEA (9.41 mL、54.0 mmol、3.0 eq.)、続いてN, N'-ジスクシンイミジルカーボネート (6.796 gの純度 $\geq 95\%$ 、25.2 mmol、1.4 eq.) を添加した。反応混合物が濁ったイエロー色に変わり、ホワイト色沈殿が形成され始め、1 h 後、反応混合物は均質なイエローブラウン色溶液になった。反応物を、r. t. で12 hにわたって攪拌させておき、その後、TLC分析 (SiO₂プレート、EtOAc/n-ヘキサン=3:7) によって反応が完了していると判断した。2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル-(2-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エチル}チオ}エチル)カーボネート 6bを、さらに精製せずに直ちに次のステップに持ち越した: R_f=0.12 (SiO₂プレート、EtOAc/n-ヘキサン=3:7)。

10

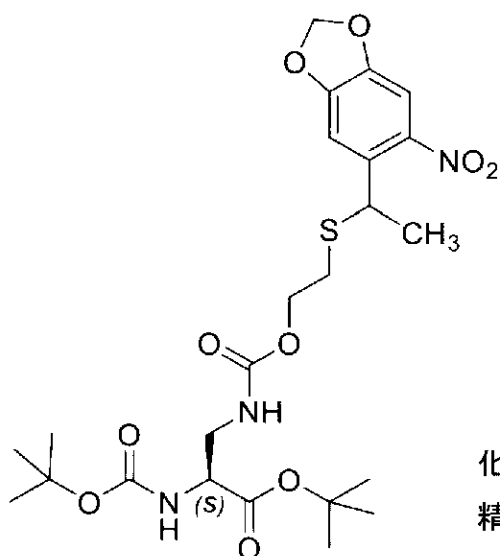
【0342】

tert-ブチル (2S)-2-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-3-{[(2-{[1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エチル}チオ}エトキシ)カルボニル]アミノ}プロパノエート (6c)

【0343】

【化43】

20



30

化学式: C₂₄H₃₅N₃O₁₀S

精密質量: 557.20432

分子量: 557.61500

6c

40

【0344】

Boc-L-Dap-O^tBu·HCl (8.548 g、28.8 mmol、1.6 eq.) を、前記で調製した6bの溶液に一度に添加した。イエロー色の反応混合物が数分で均質になり、内容物を暗所でアルゴン雰囲気下、において攪拌した。10 h 後、TLC分析 (SiO₂プレート、R_f=0.39、EtOAc/n-ヘキサン=3:7) 及びLC-MS分析 (C18逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN) の両方によって、6bの消費を確認して、反応が完了していると判断した。次いで、反応混合物をBiotage (登録商標) Isolute HM-N吸着剤に吸着させ、減圧乾燥させた。次いで、これを、暗所でSiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー [溶離剤: EtOAc/n-ヘキサン=3

50

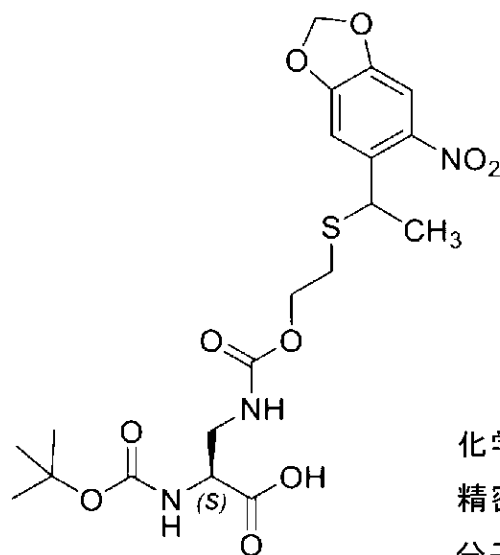
： 7] に供して、所望の *tert*-ブチル (2*S*)-2-[(*tert*-ブトキシカルボニル) アミノ] -3-{ [(2- { [1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エトキシ) カルボニル] アミノ} プロパノエート 6c を、どろりとしたイエロー色ゴム状物 (9.405 g、94%) 及びエピマーの約 1 : 1 混合物として得た： $R_f = 0.39$ (EtOAc / *n*-ヘキサン = 3 : 7) ; $^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) δ (エピマーの混合物) 1.44 (s, 9H)、1.46 (s, 9H)、1.54 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)、2.36~2.61 (m, 2H)、3.41~3.68 (m, 2H)、4.00~4.18 (m, 2H)、4.24 (広幅な s, 1H)、4.85 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H)、5.15 (広幅な s, 1H)、5.41 (広幅な s, 1H)、6.10 (d, $J = 6.8$, 2H)、7.27 (s, 1H)、7.29 (s, 1H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ 23.1 (CH_3)、28.1 (CH_3)、28.4 (CH_3)、30.5 (CH_2)、39.0 (CH)、43.2 (CH_2)、54.6 (CH)、65.2 (CH_2)、80.1 (C)、82.9 (C)、103.0 (CH_2)、104.7 (CH)、108.2 (CH)、136.3 (C)、143.5 (C)、146.9 (C)、152.1 (C)、155.6 (C)、156.4 (C)、169.7 (C) ; m/z (ESI+, LC-MS) 558.2 [($M+H$)⁺, 100%]

【0345】

(2*S*)-2-[(*tert*-ブトキシカルボニル) アミノ] -3-{ [(2- { [1-(6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エトキシ) カルボニル] アミノ} プロパン酸 (6d)

【0346】

【化44】



化学式: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$

精密質量: 501.14171

分子量: 501.50700

6d

【0347】

Boc-L-Dap-OH (13.479 g、66.0 mmol、1.082 eq.) を、アルゴン下において 6b (26.70 g、前記で調製) の乾燥 CH_3CN (305 mL) 中溶液に一度に添加し、*r.t.* で 12 h にわたって攪拌した。その後、LC-MS (C18 逆相カラム、移動相として $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$) によって、反応が完了している

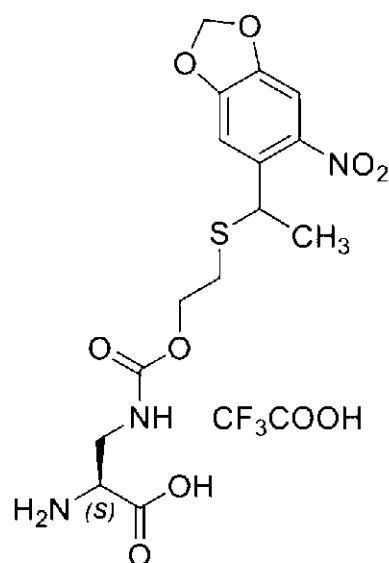
と判断し、内容物を、Biotage（登録商標）Isolute HM-N吸着剤に吸着させ、減圧乾燥させた。次いで、これを、暗所で球状SiO₂でのフラッシュクロマトグラフィー〔Supelco（登録商標）、Sigma Aldrich Ltd.社から購入、粒径40～75 μm；勾配；溶離剤：EtOAc／n-ヘキサン＝1：1→7：3→1：0〕に供して、所望の（2S）-2-〔（tert-ブトキシカルボニル）アミノ〕-3-〔〔（2-〔〔1-（6-ニトロベンゾ〔d〕〔1，3〕ジオキソール-5-イル）エチル〕チオ〕エトキシ）カルボニル〕アミノ〕プロパン酸 6dをどろどろしたイエロー色ゴム状物（28.995 g、95%）及びエピマーの約1：1混合物として得た：¹H NMR〔400.13 MHz，内部標準として0.1% v/vのTMSを含むCDCl₃〕δ（エピマーの混合物）1.43（s，9H）、1.52（d，J＝6.8 Hz，3H）、2.30～2.95（m，2H）、3.33～3.82（広幅なm，2H）、3.86～4.18（m，2H）、4.20～4.48（m，1H）、4.64～4.97（m，1H）、5.34～5.58（広幅なs，1H）、5.60～5.84（広幅なs，1H）、6.20（d，J＝8.3 Hz，2H）、7.10～7.39（m，2H）、8.47（広幅なs，1H）；¹³C NMR〔100.61 MHz，内部標準として0.1% v/vのTMSを含むCDCl₃〕δ 23.1（CH₃）、28.4（3×CH₃）、30.5（CH₂）、39.0（CH）、42.7（CH₂）、54.4（CH）、65.3（CH₂）、80.8（C）、103.1（CH₂）、104.7（CH）、108.1（CH）、136.2（C）、143.4（C）、146.9（C）、152.1（C）、156.3（C）、157.2（C）、173.5（C）；m/z（ESI-，LC-MS）500.1〔（M-H）-，100%〕

【0348】

（2S）-2-アミノ-3-〔〔（2-〔〔1-（6-ニトロベンゾ〔d〕〔1，3〕ジオキソール-5-イル）エチル〕チオ〕エトキシ）カルボニル〕アミノ〕プロパン酸（6）

【0349】

【化45】



化学式:C₁₅H₁₉N₃O₈S.CF₃COOH

精密質量:401.08929(TFAを含まない)

分子量:515.41321(TFAを含む)

6.TFA(エピマーの約1:1混合物)

【0350】

方法I（6cから調製）：

（2S）-2-〔（tert-ブトキシカルボニル）アミノ〕-3-〔〔（2-〔〔1

- (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エトキシ) カルボニル] アミノ} プロパノエート 6c (6.728 g、12.066 mmol、1.0 eq.) の乾燥試料を、乾燥250 mL 一口丸底フラスコに入れ、乾燥CH₂Cl₂ (50 mL) に溶解させ、フラスコを箔に包んで、光を排除した。この溶液に乾燥Et₃SiH (20 mL、125.215 mmol、10.378 eq.) を添加し、続いて、新たに蒸留したCF₃COOH (20 mL、261.182 mmol、21.647 eq.) を、r. t. においてシリンジを用いて15 min かけて滴下添加した。反応混合物がイエロー色からブラウングリーン色に変わった。これを、暗所でr. t. において攪拌させておいた。24 h 後、TLC (SiO₂ プレート、EtOAc / n-ヘキサン = 3 : 7) 及びLC-MS 分析 (C18 逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN) によって、反応が完了していると判断した。反応混合物を暗所で減圧濃縮して、イエローブラウン色のゴム状物を得た。これを無水CH₃OH (20 mL) に溶解させ、減圧下で蒸発乾固させた：これを3回繰り返して、高真空 (< 0.1 mbar) で乾燥させて、残留CF₃COOH、Et₃SiH 及びH₂O を全て除去した。次いで、イエローブラウン色のゴム状物を乾燥CH₃OH (40 mL) に溶解させ、アルゴン雰囲気下で、乾燥2 L 丸底フラスコに移し、0 °C に冷却した。暗所でアルゴンガスの陽圧下においてこの溶液に、カニユレによって乾燥Et₂O (2 L) を添加し、内容物を、激しく攪拌した。イエロー色沈殿物が形成され、内容物を0 °C において15 min にわたって、次いでr. t. でさらに2 h にわたって、激しく攪拌した。パールイエロー色沈殿物を濾過し、乾燥Et₂O (3 × 250 mL) で、最後に乾燥n-ヘキサン (50 mL) で洗浄した。生成物を暗所において真空中で (< 0.1 mbar) 一晚、14 h にわたって乾燥させて、(2 S) - 2 - アミノ - 3 - { [(2 - { [1 - (6-ニトロベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-イル) エチル] チオ} エトキシ) カルボニル] アミノ} - プロパン酸 TFA 塩 6 を、パールイエロー色粉末 (3.940 g、63 %) 及びエピマーの1 : 1 混合物として得た：¹H NMR [400.13 MHz, 内部標準として1 % v / v のTMSを含むCD₃OD / CF₃COOD (5 : 1)] δ (エピマーの混合物) 1.55 (d, J = 7.0 Hz, 3H)、2.49 ~ 2.73 (m, 2H)、3.63 (dd, J = 15.0, 6.4 Hz, 1H)、3.78 (ddd, J = 15.0, 3.6, 2.3 Hz, 1H)、4.0 ~ 4.24 (m, 3H)、4.81 (q, J = 7.0 Hz, 1H)、6.11 及び6.13 (2 × s, 1H)、6.40 (s, 1H)、7.29 及び7.33 (2 × s, 1H) ; ¹³C NMR [100.61 MHz, 内部標準として1 % v / v のTMSを含むCD₃OD / CF₃COOD (5 : 1)] δ 23.2 (CH₃)、31.4 (CH₂)、40.0 (CH)、42.1 (CH₂)、55.1 (CH)、65.8 (CH₂)、104.8 (CH₂)、105.6 (CH)、109.0 (CH)、117.0 (C, ¹J_{C-F} = 286.5 Hz)、137.1 (C)、144.9 (C)、148.7 (C)、153.7 (C)、160.7 (C)、160.8 (C, ¹J_{C-F} = 38.1 Hz)、170.2 (C) ; MS (ESI+) m / z (相対強度) 402 [(M+H)⁺, 100 %]、386 (20)、224 (9)、208 (11)、151 (11) ; HRMS (ESI+) m / z C₁₅H₂₀N₃O₈S [M+H]⁺ の計算値：402.0971、実測値402.0974 (Δ = 0.7 ppm)。

【0351】

保存： DAP アミノ酸 6・TFA の乾燥試料を、低温で乾燥した暗環境で気密性の暗色ガラスバイアルに保存した。これは、3年間分解することなく安定であった。

取り扱い： DAP アミノ酸 6・TFA は、光感受性であり、湿った空気への曝露時にわずかに吸湿性である。このため、バイアル中のその試料は常に、暗く乾燥した雰囲気を取り扱った。特筆すべきは、冷蔵庫又は冷凍庫から取り出した6・TFAを含むバイアルは、開封して取り扱う前に必ず、r. t. まで温まるようにしたことである。

【0352】

方法II (6d から調製) :

(2 S) - 2 - [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] - 3 - { [(2 - { [1

ー（6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル）エチル}チオ}エトキシ）カルボニル]アミノ}プロパン酸6d（26.70g、53.2395mmol、1.0eq.）の乾燥試料を、乾燥1リットル一口丸底フラスコに入れ、乾燥CH₂Cl₂（300mL）に溶解させた。光を排除するためにフラスコをアルミ箔で包み、乾燥Et₃SiH（84.69mL、530.24mmol、10.0eq.）を溶液に加えた。5min後、新たに蒸留したCF₃COOH（81.54mL、1.0648mol、20.0eq.）を、15minにわたって溶液に滴下添加した。溶液がイエローブラウン色に変わった。これを、暗所でr.t.において攪拌させておいた。5h後、TLC（SiO₂プレート、EtOAc/CH₃COOH=98:2）及びLC-MS分析（C18逆相カラム、移動相としてH₂O-CH₃CN）によって、反応が完了していると判断した。溶液を減圧下で濃縮乾固させて、イエローブラウン色ゴム状物を得た。これを、乾燥CH₃OH（40mL）に溶解させ、減圧下で蒸発乾固させた；これを3回繰り返し、生成物を高真空（<0.1mbar）で乾燥させて、残留CF₃COOH、Et₃SiH及びH₂Oを全て除去した。イエローブラウン色ゴム状物を乾燥CH₃OH（40mL）に溶解させ、アルゴン雰囲気下で、乾燥3L丸底フラスコに移し、0℃に冷却した。内容物を激しく攪拌しながら、アルゴンガスの陽圧下でカニューレによってフラスコに乾燥Et₂O（2.5L）を添加した。パールイエロー色沈殿物が形成された。内容物を0℃で15minにわたって、次いでr.t.で2hにわたって激しく攪拌した。次いで、沈殿物を濾過し、乾燥Et₂O（3×500mL）で、続いて乾燥n-ヘキサン（150mL）で洗浄した。生成物を暗所において高真空（<0.1mbar）で一晩、14hにわたって乾燥させて、（2S）-2-アミノ-3-{[(2-{[1-（6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル）エチル}チオ}エトキシ）カルボニル]アミノ}プロパン酸TFA塩6を、パールイエロー色粉末（20.465g、75%）及びエピマーの約1:1混合物として得た。

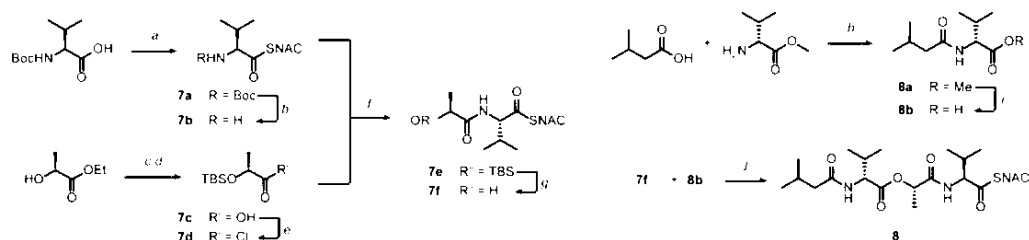
【 0 3 5 3 】

V L m T E 基質の合成

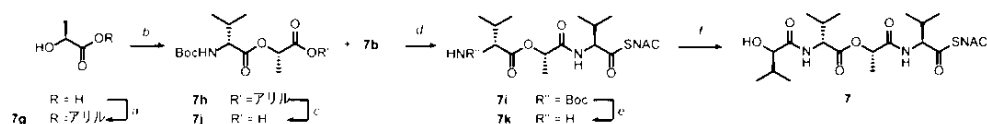
【 0 3 5 4 】

【化 4 6】

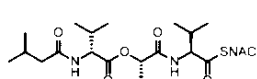
a



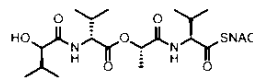
b



C



d



【 0 3 5 5 】

デブシペプチジル-SNAC化合物 7 及び 8 の合成スキーム。

a, デオキシテトラデプシペプチジル-SNAC 8の合成。a) 8c、EDC、DMAP、72%；b) TFA、DCM、99%；c) TBSCl、Imid.、DCM；d) LiOH、THF、78%、2ステップ；e) (COCl)₂、DMF、DCM；f) TEA、DCM、53%；g) HF、Pyr.、MeCN、84%；h) EDC、DMAP、TEA、DCM、60%；i) LiOH、MeOH、THF、60%；j) EDC、DMAP、DMF、5:4dr、92%

b, テトラデプシペプチジル-SNAC 7の合成。a) アリルBr、Cs₂CO₃、DMF、95%；b) Boc-d-Val、EDC、DMAP、DCM、84%；c) Pd(PPh₃)₄、モルホリン、DCM；d) EDC、HOBt、DIPEA、DCM、94%；e) HCl、ジオキサン；f) d-HIV、EDC、HOBt、DIPEA、DCM、95%。

10

c デオキシテトラデプシペプチジル-SNAC 8の構造、及び

d テトラデプシペプチジル-SNAC 7の構造。

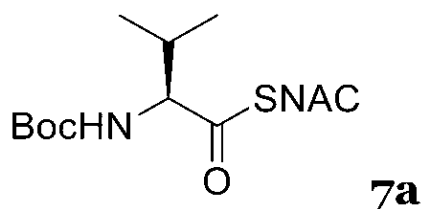
【0356】

(S)-S-(2-アセトアミドエチル)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタンチオエート (7a)

【0357】

【化47】

20



30

【0358】

Boc-L-バリン (7.29 g、33.56 mmol、1.0当量) をCH₂Cl₂ に溶解させた。N-アセチル-L-システアミン (4.00 g、33.56 mmol、1.0当量)。この混合物に、N-(3-ジアミノメチルプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC、7.72 g、40.27 mmol、1.2当量) 及び4-(ジメチルアミノ)ピリジン (DMAP、410 mg、3.36 mmol、0.1当量) を添加した。反応物を周囲温度において16 hにわたって攪拌した。反応をNH₄Cl (aq) でクエンチし、EtOAcで3回抽出した。有機画分を合わせ、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、濃縮した。所望の生成物 (7.69 g、24.16 mmol、収率72%) を、シリカカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中5% MeOH) によって精製した。R_f=0.37 (アセトン:ヘキサン類2:3)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (s, 1H)、4.97 (d, J=8.8 Hz, 1H)、4.21 (dd, J=8.9, 4.8 Hz, 1H)、3.48~3.30 (m, 2H)、3.08~2.94 (m, 2H)、2.22 (td, J=13.4, 6.7 Hz, 1H)、1.43 (s, 9H)、0.96 (d, J=6.9 Hz, 3H)、0.85 (d, J=6.9 Hz, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 201.74、170.35、155.66、80.42、65.68、39.38、30.77、28.38、28.33、23.16、19.40、17.01。HRMS (ESI+) 計算質量値 (C₁₄H₂₆N₂O₄SNa) 341.1511、実測値341.1512。

40

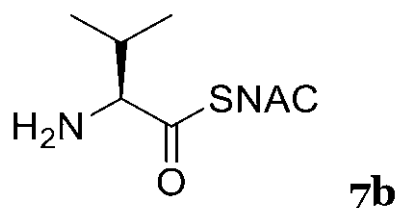
【0359】

50

(S) - S - (2 - アセトアミドエチル) 2 - アミノ - 3 - メチルブタンチオエート (7b)

【0360】

【化48】



10

【0361】

丸底フラスコ中で、7a (0.5 g、1.57 mmol、1.0 当量) を CH_2Cl_2 (3 mL) に溶解させた。この溶液を、氷浴を使用して 0°C に冷却し、トリフルオロ酢酸 (3 mL) を添加した。反応を周囲温度において 45 min にわたって進行させた。反応混合物を濃縮し、所望の生成物 (341 mg、1.56 mmol、収率 > 99%) をシリカカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 中 MeOH 5% から 10%) によって精製した。 ^1H NMR (300 MHz、DMSO) δ 8.45 (s, 1.57 2H)、8.10 (t, $J=5.5$ Hz, 1H)、4.15 (d, $J=4.8$ Hz, 1H)、3.27~3.17 (m, 2H)、3.13~2.98 (m, 2H)、2.28~2.09 (m, 1H)、0.99 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)、0.95 (d, $J=7.0$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (75 MHz、DMSO) δ 196.18、169.35、63.48、37.78、30.10、28.40、22.50、18.03、17.26。

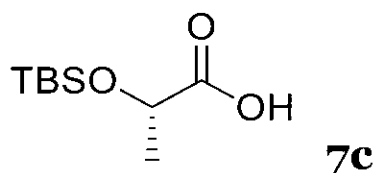
20

【0362】

(S) - 2 - ((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) プロパン酸 (7c)

【0363】

【化49】



30

【0364】

丸底フラスコ中で、L-乳酸エチル (5.08 g、43.0 mmol、1.0 当量) を CH_2Cl_2 (55 mL) に溶解させ、溶液を、氷浴を使用して 0°C に冷却した。この混合物に、tert-ブチルジメチルシリルクロリド (6.48 g、45.15 mmol、1.05 当量) 及びイミダゾール (3.51 g、51.6 mmol、1.2 当量) を添加し、その後、反応を周囲温度において 2 h にわたって進行させた。次いで、反応混合物を H_2O で希釈し、 CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。有機画分を合わせ、氷冷 5% HCl (aq) で洗浄し、ブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、濃縮した。粗中間体 (S) - エチル 2 - ((tert-ブチルジメチルシリルオキシ) プロパノエート) を THF (215 mL) に溶解させた。混合物を、氷浴を使用して 0°C に冷却し、LiOH (0.4 M、2

40

50

15 mL) の冷却溶液を 20 min かけて滴下添加した。反応混合物を周囲温度で 4 h にわたって攪拌した。得られた反応混合物を、元の容量の半分まで濃縮し、得られた水溶液を Et₂O で 3 回抽出した。有機画分を合わせ、NaHCO₃ 飽和溶液 (aq) で 3 回抽出した。水性画分を合わせ、1 M KHSO₄ (aq) で pH 4 まで酸性化し、Et₂O で 3 回抽出した。有機画分を合わせ、Na₂SO₄ で脱水し、濃縮した。所望の生成物 (6.88 g、33.7 mmol、2 ステップで収率 78%) を得た。これは、さらに精製せずに使用した。NMR データは、文献値 (Ekici, O.D., Paetzel, M. & Dalbey, R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. Protein Sci 17, 2023-2037 (2008)) と一致していた。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.36 (q, J = 6.8 Hz, 1H)、1.45 (d, J = 6.8 Hz, 3H)、0.92 (s, 9H)、0.13 (s, 6H)。

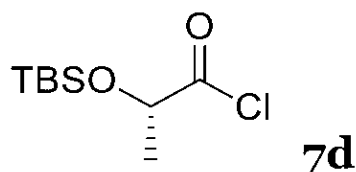
10

【0365】

(S)-2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propanoyl chloride (7d)

【0366】

【化50】



20

【0367】

丸底フラスコ中で、7c (3.7 g、18 mmol、1.0 当量) を DMF (45 mL) に溶解させ、溶液を、氷浴を使用して 0 °C に冷却した。塩化オキサリル (DCM 中 2.0 M 溶液 13.6 mL、10.0 当量) 及び触媒量の DMF を添加した。反応は、2 h にわたって 0 °C から周囲温度まで進行した。反応混合物を濃縮した。粗油状物は、精製せずに後続反応に使用した。

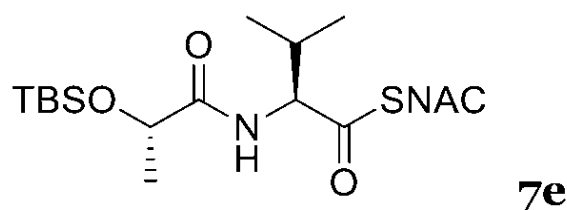
30

【0368】

TBSO-L-Lac-L-Val-SNAC (7e)

【0369】

【化51】



40

【0370】

丸底フラスコ中で、7b (1.95 g、9 mmol、1.0 当量) を CH₂Cl₂ (40 mL) に溶解させた。粗油状物 7d (18 mmol、2.0 当量) を CH₂Cl₂ (5

50

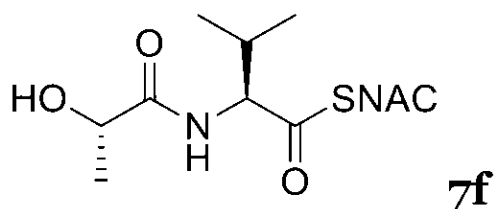
mL) に溶解させ、この混合物に添加した。Et₃N (2.5 mL、18 mmol、2.0 当量) を添加し、反応を 4 h にわたって進行させた。反応混合物を NH₄Cl (aq) でクエンチし、EtOAc で 3 回抽出し、ブラインで洗浄し、濃縮した。所望の生成物 (1.93 g、4.77 mmol、収率 53%) を、粗混合物からシリカカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中 EtOAc 50% から 90%) によって精製した。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (d, J = 9.3 Hz, 1H)、6.03 (s, 1H)、4.53 (dd, J = 9.3, 4.5 Hz, 1H)、4.25 (q, J = 6.7 Hz, 1H)、3.38 (q, J = 6.2 Hz, 2H)、3.07~2.98 (m, 2H)、2.40~2.21 (m, 1H)、1.93 (s, 3H)、1.38 (d, J = 15.9 Hz, 3H)、1.01~0.82 (m, 15H)、0.13 (s, 3H)、0.12 (s, 3H)。¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 200.34、174.90、170.47、70.03、63.48、39.47、31.04、28.51、25.82、23.23、22.04、19.47、18.00、16.83、-4.54、-5.03。

[0371]

HO-L-Lac-L-Val-SNAC (7f)。

[0372]

[化52]



[0373]

化合物 7e (250 mg、0.617 mmol、1.0 当量) を、50 mL ポリプロピレン Falcon チューブ 中でアセトニトリル (20 mL) に溶解させた。ピリジン (249 μL、3.09 mmol、5 当量) 及び HF (48 wt. % aq. 533 μL、30.9 mmol、50 当量) を添加した。反応物を周囲温度において 16 h にわたって攪拌した。反応混合物を NH₄Cl (aq) でクエンチし、EtOAc で 3 回抽出し、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、濃縮した。所望の生成物 (150.1 mg、0.517 mmol、収率 84%) を、シリカカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中 MeOH 2% から 8%) によって精製した。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (d, J = 9.2 Hz, 1H)、6.20 (s, 1H)、4.54 (dd, J = 9.2, 5.4 Hz, 1H)、4.30 (q, J = 6.8 Hz, 1H)、4.15 (s, 1H)、3.52~3.32 (m, 2H)、3.12~2.94 (m, 2H)、2.36~2.21 (m, 1H)、1.95 (s, 3H)、1.44 (t, J = 6.3 Hz, 3H)、0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H)、0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 200.20、175.47、170.94、68.66、63.77、39.24、30.90、28.71、23.25、21.28、19.45、17.27。

[0374]

(S)-アリル 2-ヒドロキシプロパノエート (7g)

[0375]

10

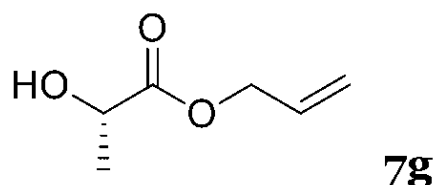
20

30

40

50

【化53】



【0376】

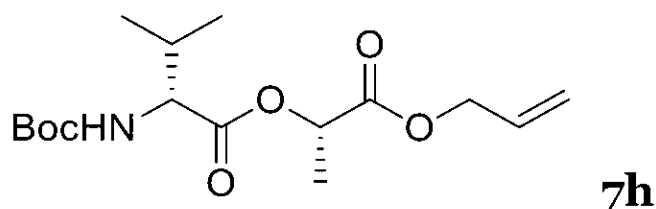
丸底フラスコ中で、1 g の L-乳酸 (11.11 mmol、1 当量) 及び 3.8 g の炭酸セシウム (11.67 mmol、1.05 当量) を 13 mL の DMF に溶解させた。臭化アリル (3.75 mL、5.37 g、44.44 mmol、4 当量) を周囲温度において滴下添加した。添加が完了したら、反応物を周囲温度で 48 h にわたって攪拌した。完了時に、回転蒸発によって過剰の臭化アリルを除去し、残りの溶液を水で希釈し、次いで Et₂O で 3 回抽出した。合わせた有機画分を水で 2 回、ブラインで 1 回洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、濃縮して、表題化合物 (1.47 g、95%) をパールイエロー色の油状物として得た。特徴付けデータは、報告値 (Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S.D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488 (2011)) と一致している。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.99~5.82 (m, 1H)、5.40~5.18 (m, 2H)、4.71~4.59 (m, 2H)、4.29 (q, J=6.9 Hz, 1H)、2.75 (s, 1H)、1.42 (d, J=6.9 Hz, 3H)。

【0377】

(R)-(S)-1-(アリルオキシ)-1-オキソプロパン-2-イル 2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-3-メチルブタノエート (7h)。

【0378】

【化54】



【0379】

丸底フラスコ中で、1 g の 7g (7.69 mmol、1 当量) 及び 1.67 g の Boc-D-Val (8.46 mmol、1.1 当量) を、39 mL の CH₂Cl₂ に溶解させた。この溶液に、周囲温度で 2.21 g の EDC (11.54 mmol、1.5 当量) 及び 1.03 g の DMAP (8.46 mmol、1 当量) を添加した。得られた溶液を周囲温度で 20 h にわたって攪拌した。反応を NH₄Cl (aq) でクエンチし、CH₂Cl₂ で 3 回抽出し、NaHCO₃ (aq) で洗浄し、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、濃縮した。表題化合物 (2.12 g、84%) を、シリカカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中 20% EtOAc) によって精製した。R_f=0.41 (EtOAc:ヘキサン類 1:3) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95~5.81 (m,

1 H)、5.29 (dddd, $J=21.3, 11.7, 6.6, 1.3$ Hz, 2 H)、5.13 (q, $J=7.0$ Hz, 1 H)、4.97 (d, $J=8.9$ Hz, 1 H)、4.67~4.59 (m, 2 H)、4.28 (dd, $J=8.9, 4.8$ Hz, 1 H)、2.25~2.11 (m, 1 H)、1.50 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H)、1.43 (s, 9 H)、0.97 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H)、0.91 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.50、169.95、155.56、131.43、118.83、79.77、69.17、65.93、58.60、31.28、28.32、18.99、17.49、17.00。HRMS (ESI+) : $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NNaO}_6$ の正確な質量計算値 : 352.1736。実測値 : 352.1721。

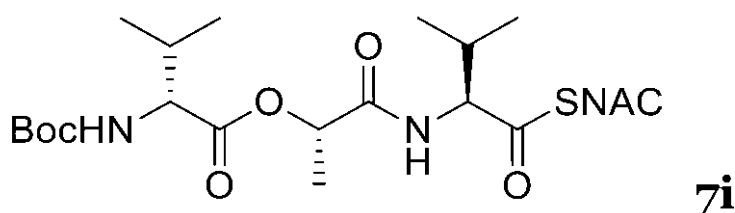
10

【0380】

Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-SNAC (7i)

【0381】

【化55】



20

【0382】

丸底フラスコ中で、250 mg の 7 h (0.76 mmol、1 当量) を、窒素雰囲気下において 4 mL の CH_2Cl_2 に溶解させた。この溶液に 86 μL のモルホリン (87 mg、0.99 mmol、1.3 当量) 及び 62 mg の $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ を一度に添加した。反応物を周囲温度で攪拌し、TLC で監視した。完了時に、10% aq. HCl の添加によって反応をクエンチし、有機層を除去し、残りの水性画分を CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。合わせた有機画分をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、濃縮し、この中間体、7 j を直ちに後続反応において使用した。火炎乾燥した丸底フラスコに、194 mg の 7 b (HCl 塩として、0.76 mmol、1 当量) 及び 4 mL の CH_2Cl_2 中の粗 7 j (0.76 mmol、1 当量) を添加した。得られた溶液に、400 μL のヒューニツヒ塩基 (295 mg、2.28 mmol、3 当量)、154 mg の HOBt (1.14 mmol、1.5 当量) 及び 220 mg の EDC (1.14 mmol、1.5 当量) を添加した。反応物をアルゴン下で周囲温度において 20 h にわたって攪拌した。反応を NH_4Cl (aq) でクエンチし、 CH_2Cl_2 で 3 回抽出し、 NaHCO_3 (aq)、次いでブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、濃縮した。表題化合物 (350 mg、2 ステップで 94%) を、シリカカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中 40% アセトン) によって精製した。 $R_f=0.35$ (アセトン : ヘキサン類 2 : 3) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.08 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H)、6.07 (s, 1 H)、5.38 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H)、5.02 (d, $J=7.0$ Hz, 1 H)、4.46~4.39 (m, 1 H)、3.99 (t, $J=6.9$ Hz, 1 H)、3.45~3.30 (m, 2 H)、3.11~2.89 (m, 2 H)、2.30 (dq, $J=13.4, 6.7$ Hz, 1 H)、2.11~2.01 (m, 1 H)、1.92 (s, 3 H)、1.49 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H)、1.39 (s, 9 H)、1.01~0.91 (m, 12 H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 200.14、171.72、170.89、170.48、155.92、80.45、70.58、64.74、

30

40

50

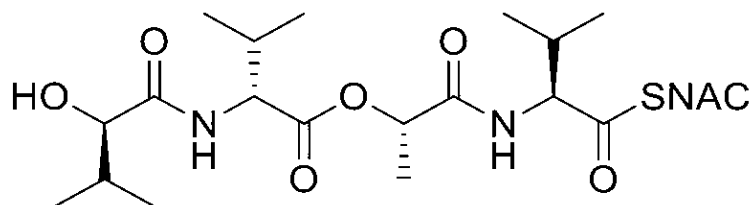
59.74、39.30、30.47、30.27、28.46、28.26、23.10、19.33、18.90、18.49、17.85、17.53。HRMS (ESI+) : $C_{22}H_{39}N_3NaO_7S$ の正確な質量計算値 : 512.2406。実測値 : 512.2391

【0383】

HO-D-Hiv-D-Val-L-Lac-L-Val-SNAC (7)

【0384】

【化56】



7

【0385】

丸底フラスコに、最少量のTHF中118mgの7i (0.24mmol、1当量) を添加し、これを0℃に冷却した。これに、ジオキサン (Sigma社) 中1mLの4M HCl を添加し、反応物を周囲温度まで温まるようにした。反応をTLCで監視し、完了時に、回転蒸発によって全ての溶媒を除去した。未精製中間体7kは直ちに後続反応に使用した。中間体7kを2mLのCH₂Cl₂に溶解させ、これに、125μLのヒューニッヒ塩基 (93mg、0.72mmol、3当量)、32mgのD-α-ヒドロキシソ吉草酸 (0.27mmol、1.1当量)、49mgのHOBt (0.36mmol、1.5当量) 及び70mgのEDC (0.36mmol、1.5当量) を逐次添加した。反応物を周囲温度で24hにわたって攪拌し、完了時にNH₄Cl (aq) でクエンチし、CH₂Cl₂で5回抽出し、NaHCO₃ (aq) で、次いでブラインで洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、濃縮した。表題化合物 (111mg、95%) を、シリカカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中50%アセトン) によって精製した。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.29 (s, 1H)、6.20 (t, J=5.7Hz, 1H)、5.26 (q, J=7.0Hz, 1H)、4.55 (br, 1H)、4.47 (dd, J=9.0, 6.5Hz, 1H)、4.26 (t, J=7.7Hz, 1H)、3.99 (d, J=2.9Hz, 1H)、3.52~3.25 (m, 2H)、2.99 (ddt, J=20.4, 13.3, 6.5Hz, 2H)、2.39~2.25 (m, 1H)、2.20~2.06 (m, 2H)、1.97 (s, 3H)、1.54 (d, J=7.0Hz, 3H)、1.06~0.93 (m, 15H)、0.88 (d, J=6.9Hz, 3H)。¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 200.05、175.25、171.69、171.43 (2C)、76.33、71.14、64.55、58.39、38.95、31.95、30.25、30.12、28.64、23.22、19.49、19.17、19.13、18.83、18.18、18.04、16.15。HRMS (ESI+) : $C_{22}H_{39}N_3NaO_7S$ の正確な質量計算値 : 512.2401。実測値 : 512.2406

【0386】

(R)-メチル 3-メチル-2-(3-メチルブタンアミド)ブタノエート (8a)

【0387】

10

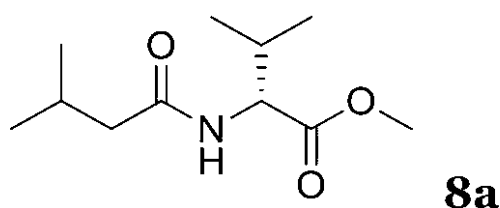
20

30

40

50

【化57】



【0388】

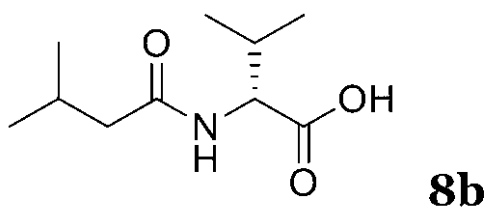
丸底フラスコ中で、D-バリンメチルエステル塩酸塩（250mg、1.5mmol、1.0当量）を、CH₂Cl₂（15mL）に溶解させた。イソ吉草酸（230mg、2.25mmol、1.5当量）、EDC（430mg、2.25mmol、1.5当量）、DMAP（276mg、2.25mmol、1.5当量）及びEt₃N（420μL、3.00mmol、2.0当量）を添加し、反応物を、周囲温度において16hにわたって混合させた。反応をNH₄Cl（aq）でクエンチし、CH₂Cl₂で3回抽出し、NaHCO₃（aq）で洗浄し、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、濃縮した。所望の化合物（193.7mg、0.90mmol、収率60%）を、シリカカラムクロマトグラフィー（ヘキサン類中EtOAc 20~50%）によって精製した。¹H NMR（400MHz, CDCl₃）δ 5.96（d, J=8.0Hz, 1H）、4.57（dd, J=8.8, 4.9Hz, 1H）、3.71（s, 3H）、2.19~2.04（m, 4H）、0.97~0.86（m, 12H）。¹³C NMR（100MHz, CDCl₃）δ 172.85、172.49、56.91、52.19、46.14、31.35、26.29、22.56、22.53、19.07、17.93

【0389】

(R)-3-メチル-2-(3-メチルブタンアミド)ブタン酸(8b)

【0390】

【化58】



【0391】

丸底フラスコ中で、8a（180mg、1.2mmol、1.0当量）をMeOH（24mL）及びTHF（24mL）に溶解させ、溶液を、氷浴を使用して0℃に冷却した。LiOH（1M、24mL）を滴下添加し、溶液を4hかけて0℃から周囲温度まで進めた。この溶液を、1/3の容量に濃縮して、得られた水溶液を、10% HClでpH3まで酸性化した。溶液をCH₂Cl₂で3回抽出し、Na₂SO₄で脱水し、濃縮した。所望の生成物（145mg、0.72mmol、収率60%）を、シリカカラムクロマトグラフィー（CH₂Cl₂中5% MeOH+0.5%酢酸）によって精製した。¹H NMR（300MHz, MeOD）δ 4.32（d, J=5.8Hz, 1H）、2.23~2.01（m, 4H）、1.01~0.92（m, 12H）。¹³C NMR（75MHz, MeOD）δ 175.84、174.93、59.00、45.90、31.53、27.50、22.76、22.72、19.65、18.41。

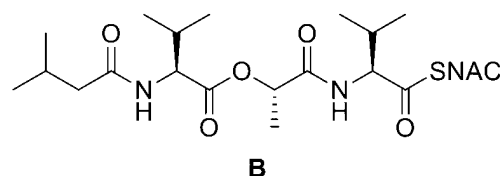
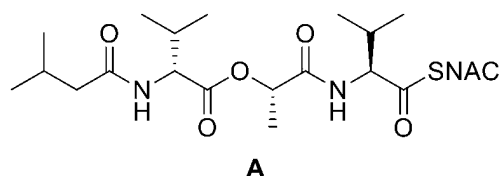
【0392】

8 (A) 及び 8 c (B)

(R) - (S) - 1 - (((S) - 1 - ((2 - アセトアミドエチル) チオ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル 3 - メチル - 2 - (3 - メチルブタンアミド) ブタノエート (8)

【0393】

【化59】



10

【0394】

丸底フラスコ中で、アルコール 7 f (25.2 mg、0.087 mmol、1.0 当量) 及びカルボン酸 8 b (35 mg、0.174 mmol、2.0 当量) を DMF (1 mL) に溶解させた。ドライアイス／アセトン浴を使用して、この溶液を -20℃ に冷却し、EDC (67 mg、0.35 mmol、4.0 当量) 及び DMAP (21 mg、0.174 mmol、2.0 当量) を添加した。混合物を周囲温度まで温まるようにした。反応が 16 h にわたって進行した。反応を NH₄Cl (aq) でクエンチし、EtOAc で 3 回抽出した。有機画分を合わせ、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、濃縮した。5 : 4 の比 (A : B) の C - 2.2 ジアステレオマーの混合物 (37.9 mg、0.08 mmol、収率 92%) を粗残留物から、シリカカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中 MeOH 1% ~ 5%) によって精製した。ジアステレオマーを、分取 TLC で分離した。8 (A) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、6.15 (s, 1H)、5.93 (d, J = 6.8 Hz, 1H)、5.35 (q, J = 7.0 Hz, 1H)、4.44 167 (dd, J = 8.3, 6.4 Hz, 1H)、4.29 (t, J = 7.0 Hz, 1H)、3.50 ~ 3.32 (m, 2H)、3.08 ~ 2.95 (m, 2H)、2.41 ~ 2.29 (m, 1H)、2.19 ~ 2.00 (m, 4H)、1.96 (s, 3H)、1.53 (d, J = 6.9 Hz, 3H)、1.05 ~ 0.92 (m, 18H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 200.14、173.48、171.62、171.04、170.65、71.03、64.93、58.71、45.66、39.33、30.37、30.35、28.75、26.31、23.27、22.63、22.57、19.48、19.07、18.79、18.11、17.91。8 c (B) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、6.04 (s, 1H)、5.81 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、5.25 (q, J = 6.8 Hz, 1H)、4.54 (dd, J = 8.8, 5.9 Hz, 1H)、4.49 (dd, J = 7.3, 4.7 Hz, 1H)、3.47 ~ 3.36 (m, 2H)、3.11 ~ 2.98 (m, 2H)、2.38 ~ 2.26 (m, 2H)、2.20 ~ 2.09 (m, 3H)、1.95 (s, 3H)、1.51 (d, J = 6.9 Hz, 3H)、1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H)、0.99 (dd, J = 6.7, 2.5 Hz, 12H)、0.94 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 199.74、173.66、170.84、170.68、170.49、71.63、64.29、57.90、46.06、39.32、30.72、30.55、28.91、26.35、23.30、22.64、22.57、19.42 (2C)、18.16、17.94、17.70。HRMS (ESI+) : C₂₂H₃₉N₃NaO₆S の正確な質量計算値 : 496.2452。実測値 : 496.2457

20

30

40

【0395】

50

実施例 1～8 の要約

本発明者らは、組換えタンパク質において DAP を遺伝的にコードする戦略について記載する。本発明者らは、触媒システイン又はセリンの代わりに DAP を遺伝的にコードすることによって、不安定なチオエステル又はエステル中間体をそれらの安定なアミド類似体として捕捉できることを示す。本発明者らは、システインプロテアーゼ及びチオエステラーゼに対するこのアプローチの有用性を例示し、Vlm TE によるバリノマイシンの合成における中間体についての独自の洞察を提供した。本発明者らの結果は、ドデカペプチジル結合 Vlm TE に関連するリッドの大規模な再配列を明らかにしている。重要なことに、DAP 系は、広く使用されている反応能力のある基質（例えば、プロテアーゼ部位を含むネイティブタンパク質）、基質類似体（この場合は、SNAC）と、市販の天然産物（ここでは、バリノマイシン及びおそらく他の環状生成物（Tseng, C.C. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41, 13350-13359 (2002)））の両方を使用して、ネイティブに近いアシル-酵素複合体を形成できる。

【0396】

これらの構造には、TE ドメイン触媒サイクルの中心的存在である PCP ドメインが存在しないが、その結合部位は、情報価値のある、EntF の、デッドエンド阻害剤をトラップした PCP-TE 構造（Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S.D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488 (2011)）から推測できる（図 7）。PCP ドメインは TE の αE にドッキングし、PPE は約 15 Å 伸長して、チオールを Ser/DAP 2463 の近くに位置付ける（図 7a、c-iii）。EntF 構造における PPE の位置は、リッドのドデカペプチド結合コンフォメーションと適合性であるが、本発明者らの Vlm TE 構造におけるアポ/テトラペプチド結合コンフォメーションとは適合性でない。（EntF 構造におけるリッドは、部分的に無秩序である。）この EntF 構造は、PCP 及び TE ドメインがデプシペプチジル-PPE のチオエステルを Ser/DAP 2463 の近くにどのように位置付けることができるかを示したが、Vlm では、これらのドメインは、オリゴマー化ステップのためにはテトラデプシペプチジル-PPE の末端ヒドロキシルを Ser/DAP 2463 の近くに位置付けすることもできなければならない。そのためには、テトラデプシペプチドのさらに約 15 Å の長さ（末端ヒドロキシルと PPE 硫黄の間に）が TE ドメインに収容されなければならない（図 7c-ii と 7c-iii を比較）。リッドは、本発明者らがドデカペプチジル-TE DAP 構造において観察するものと類似したポケットをおそらく使用して、これを容易にする可能性がある。

【0397】

したがって、既知の構造を組み立てて、オリゴマー化及び環化の仮説上の経路にすることができる（図 7）。観察されたアポ/テトラデプシペプチド結合コンフォメーションである場合、Vlm TE の $L\alpha 1$ は、いかなる結合したデプシペプチドも、環化のために周囲にカールするのを阻害できるであろう（図 7）。PCP の結合は、ドデカデプシペプチド結合 TE について本発明者らが観察したものと類似した TE コンフォメーションを誘導でき、それが、PCP ドメインに結合した約 30 Å のテトラデプシペプチジル-PPE を収容しそれを活性部位に向けて導くことができるであろう（図 7b）。開いた／ほとんど無秩序のリッド（EntF PCP-TE に見られるような）への遷移により、PCP は Ser 2463 に戻すためにチオエステルを提示することを可能にできるであろう。最後に、半球状のポケットを有する、ドデカデプシペプチド-TE DAP 構造で観察されるリッドのコンフォメーションは、環化のためにドデカデプシペプチドを Ser 2463 に向かってカールバックするのに役立つ。（図 7b、c-iv）。

【0398】

ドデカデプシペプチド-TE DAP の構造に見られるリッドのコンフォメーション及び半球状ポケットは、チオエステラーゼサイクルの環化ステップの間中、非常に重要である可

能性がある。このポケットは主に疎水性残基で構成されており、Ser/DAP2463に結合したドデカデプシペプチドが直線的に伸長するのを防ぐ立体障害を提供する（図7b）。むしろ、このリッドのコンフォメーションは、TEと基質とのアシル結合に向かって基質の遊離端をカールバックさせるのに好都合である。したがって、ドデカデプシペプチドのバリノマイシンへの環化は、ポケットによってエントロピー的に制御され、ドデカペプチドのコンフォメーションはポケット及びTEドメイン活性部位への部分的な局限によって決定付けられると考え得る。

【0399】

TEドメインが真正な (bona fide) 基質と共有結合している場合であっても、他の研究で見られ及びここでは劇的に見られるリッドの可動性、並びにリッドとTEドメインの残りの部分との特異的な相互作用の不足により、合成サイクルのこれらのステップのいずれかに単一の十分に規定されたコンフォメーションが存在する可能性が低くなる。チロシンシンターゼにおいて環化を促進するために、環化基質の所定の／テンプレート化コンフォメーションの形成が提示されており (Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000)、Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001))、一方、ピクロマイシンシンターゼにおいてこれを行うためにリッドとポリケチド基質との特異的な相互作用が提示されたが、Vlm TEにおけるこれらのメカニズムの証拠はない。実際に、テトラデプシペプチドはPCPドメインへのライゲーシオンとTEドメインへのライゲーシオンとの間を行きつつ戻りつつ遷移しなければならないため、及び同じテトラデプシペプチドが1つのサイクルの間に複数の異なる位置をとらなければならないため、特異的で強い結合相互作用は合成サイクルを遅くし得るであろう。むしろ、リッドのコンフォメーションは、サイクルを通じて急速に変動し、「呼吸」し、過渡的に (transiently)、反応能力のあるコンフォメーションとなる可能性がある。興味深いことに、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) ポリケチドシンターゼTEドメインと新規阻害剤とは、リッドヘリックスのクラスター間で結合する (Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets *M. tuberculosis* Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225 (2017))。それは、基質結合と競合することが提示されているが、そのような阻害剤は、本発明者らがここで観察したものと同様なリッドの構造再配列を防ぐことによって作用できるであろう。

【0400】

本発明者らは、コードされたDAPを利用して、バリノマイシンの合成におけるチオエステラーゼアシルー酵素中間体についての洞察を提供することに焦点を当ててきたが、DAP系は、天然産物メガ酵素ドメイン、例えば、他の環化TEドメイン、トランスグルタミナーゼ相同体縮合ドメイン及びPKSケトシンターゼドメインを含む、システイン又はセリン結合アシルー酵素中間体を特徴とする多種多様な酵素の研究 (Holliday, G.L., Mitchell, J.B.O. & Thornton, J.M. Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. *Journal of molecular biology* 390, 560-577 (2009)) にかなり有望である。ここで報告されたアプローチの拡大は、多様なアシルー酵素中間体の構造的及び生化学的特徴付けを容易にする。加えて、アシルー酵素中間体を介して進行する (Cravatt, B.F., Wright, A.T. & Kozarich, J.W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 77, 383-414 (2008)) が未知の基質特異性を有する、酵素においてDAPを遺伝的にコードすることにより、ネイティブ基質を共有結合によって捕捉及び同定することができる可能性がある。

【実施例9】

【0401】

UBE2L3-DAPの発現、精製及び活性試験

UBE2L3 (C86DAP5) の、GST-タグアフィニティー精製、それに続く、TEVプロテアーゼによるGST-タグの切断及びStrep-タグアフィニティー精製による精製もまた、試験した。この戦略により、クリーンな生成物が得られた。

精製されたUBE2L3 (C86DAP5) -Strepの質量を、LC-ESI-MSによって決定した：

UV光照射前のUBE2L3 (C86DAP5) -StrepのLC-ESI-MS：
UBE2L3 (C86DAP5) -Strep [1]：予想値：19050.57Da、
実測値：19048.79Da；UBE2L3 (C86INT)；Strep [2]：予想値：18857.53Da、実測値：18853.15Da。

10

【0402】

DAP5の脱保護は、2つのはっきり異なるステップで行われる。第1に、UV光の作用下で光ケージ基 (photocaging group) が除去され、半脱保護された中間体となる。第2の分子内反応により、最終的に、完全に脱保護されたDAPが得られる。UBE2L3 (C86DAP5) の精製後、タンパク質のほとんどが半脱保護中間体 (UBE2L3 [C86INT]) を含んでいるがその一部は完全な光ケージ化形態 (photocaged form) で存在していることが判明した。UV光照射後、タンパク質の質量をLC-ESI-MSによって再び評価した：

UV光照射後のUBE2L3 (C86DAP5) -StrepのLC-ESI-MS：UBE2L3 (C86INT) -Strep [2]：予想値：18857.53Da、実測値：18853.15Da。

20

【0403】

予想通り、UV光照射後、UBE2L3 (C86DAP5) -Strepは検出できなかった。実際に、UBE2L3 (C86INT) -Strepのみを検出できた。続いて、タンパク質を37℃で3hにわたってインキュベートし、その質量をLC-ESI-MSで評価した。予想通り、UBE2L3 (C86DAP) -Strepが、UBE2L3 (C86INT) -Strepと一緒に検出された。

UV光照射及び37℃で3hのインキュベーション後のUBE2L3 (C86DAP5) -StrepのLC-ESI-MS：UBE2L3 (C86INT) -Strep [2]：予想値：18857.53Da、実測値：18853.15Da；UBE2L3 (C86DAP) -Strep [3]：予想値：18753.59Da、観察値：18753.13Da。

30

【0404】

残念ながら、37℃におけるより長いインキュベーション時間 (6h及び16h) は、UBE2L3 (C86INT) -Strepの脱保護の改善にはつながらなかった。実際に、DAPを含むタンパク質の割合は変化していないようであった。これは、UV光照射及びより長いインキュベーション時間後のUBE2L3 (C86DAP5) -Strepの総タンパク質LC-ESI-MSの約30%に相当する。UBE2L3 (C86INT) -Strepを37℃において6h又は16hにわたってインキュベートした。脱保護の改善は認められず、DAPを含むタンパク質の割合 (約30%) はほとんど未変化のままであった。

40

【0405】

UV光の照射及び37℃における一晩のインキュベーションを行ったUBE2L3 (C86DAP5) にUbをチャージできるかどうか試験するために、0.2µMのE1及びHAタグ付きUbをE2ローディング緩衝液中に含む反応を設定した。各反応 (陽性対照 [wt]、陰性対照 [C86A] 及び [C86DAP]) を、Ubを含めて又は含めずに行った (図23を参照)。

【0406】

予想通り、UBE2L3 (wt) では、チオエステル結合E2-Ub複合体に相当する、より高分子量のバンドが観察できた。加えて、UBE2L3 [C86DAP] でも、イ

50

ソペプチド結合UBE2-Ub複合体に相当する、より高分子量のバンドを検出できた。UBE2L3の、Ubとの複合体への不完全な変換(図23)は、UBE2L3におけるDAP5の不完全な脱保護と一致している。

UBE2L3(C86DAP)とUbの間に新しく形成されたイソペプチド結合はレドックス非感受性(redox insensitive)であり、 β -メルカプトエタノールの存在下では還元することができない。これは、レドックス感受性(redox sensitive)である、UBE2L3(wt)及びUbから形成された複合体とは大いに異なる(図23)。

異なるバンドの同一性をさらに特徴付けるために、抗HA及び抗UBE2L3プロットの両方を行った(図23B及びC)ところ、HAUb及びUBE2L3(C86DAP)の両方の存在下で形成されたより高分子量のバンドがUBE2L3及びUbを含むことを明らかに示している。

10

【0407】

最後に、新しく形成された結合の化学的性質を特徴付けるために、UBE2L3(C86DAP)-Ub複合体に相当するバンドを切り出し、トリプシン消化後にタンデム質量分析によって分析した(Proteomics Facility, University of Bristolによって行われた)。イソペプチド結合UBE2L3(C86DAP)-Ub複合体のタンデム質量分析。

タンデム質量分析は、所望の部位でのDAP修飾、及びDAPへのUbロードと一致する残基での予想されるGly-Gly修飾をはっきりと同定する。

この分析により、UBE2L3(C86DAP)とUbとの安定なアミド結合の形成がはっきりと確認された。

20

【実施例10】

【0408】

生細胞における適用

本実施例において、本発明者らは、生細胞における技術を実証する。

【0409】

本実施例において、本発明者らは、本発明を大腸菌細胞(BL21)及び哺乳動物細胞(HEK293T)において示す。

【0410】

本発明者らは、図24及び25に示したTEV-GFP WBデータに言及する。

【0411】

特に、本発明者らは、大腸菌生細胞におけるDap媒介基質捕捉を示す図24に言及する。GFP(GFPはC末端にTEV切断部位を有する)と、C末端Streptag付きTEVプロテアーゼ(WT/Ala/TAG(Dap pcを有する又は有さない; (本実施例においては、化合物「DAP5」を「Dap pc」と称する))の種々のバリエーションとを、大腸菌BL21細胞で20℃において共発現させた。発現の20h後、細胞にUV光(35mW/cm²)を2分間にわたって直接照射し、37℃において振盪した。等体積の細胞を、示した時点で採取し、ウェスタンブロット(TEVに対する抗Strept及び抗GFP)によって分析した。TEV(Dap)のみが、TEV-GFPコンジュゲートのUV依存的生成を示した。このコンジュゲートを、UV照射後10min以内に検出でき、反応は大腸菌BL21細胞内で2h以内に完了した。

30

40

【0412】

さらに、本発明者らは、哺乳動物HEK293T細胞におけるDap媒介基質捕捉を示す図25に言及する。GFP(C末端にTEV切断部位を有するGFP)及びC末端Streptag付きTEVプロテアーゼの種々のバリエーション(WT/Ala/TAG(Dap pc(DAP5)を有する又は有さない))をHEK293T細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクションの48h後、細胞にUV光(8mW/cm²)を2分間にわたって直接照射した。次いで、細胞を37℃においてインキュベートし、示した時点で採取した。細胞を溶解させ、StreptactinXTによってTEVをプルダウンした。プルダウンの結果を、ウェスタンブロット(TEVに対する抗Strept及び抗GFP)によって分析した。TEV(Dap)のみがTEV-GFPコンジュゲートのUV

50

依存的生成を示した。コンジュゲートは、UV照射後30min以内に形成され始め、HEK293T細胞でのインキュベーション時間の増加とともに濃縮された。

【0413】

実施例10の追加の方法：

大腸菌におけるTEV(Dap)-GFP_{sub}捕捉

GFPを含むプラスミド及びTEVを含むプラスミドで同時形質転換されたBL21(DE3)細胞を、20℃においてタンパク質を発現するように誘導した。0.1mM Dap (DAP5)を培地に添加して、Dap (DAP5)を組み込んだ。20h後、細胞をFalcon 50mL コニカル遠心チューブに移し、穏やかに攪拌しながら2minにわたってUV光(365nm、35mW/cm²)を照射した。次いで、細胞を5,000gで5minにわたって遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを、新たに添加した抗生物質を含む新鮮な培地に再懸濁させた。細胞培養物を37℃で振盪した。示した各時点で、5mLの細胞培養物を採取し、BugBuster(Merck社)中で溶解させた。全溶解物をWB(抗Strept(ab76949、abcam社)及び抗GFP(ab13970、abcam社))によって分析した。

【0414】

HEK293T細胞におけるTEV-GFP_{sub}捕捉

HEK293T細胞を、GFPを含むプラスミド、TEVを含むプラスミドで同時トランスフェクトした。アンバー抑制のために、トランスフェクションの30min後に1mMのDap (DAP5)を添加した。トランスフェクションの48h後、6ウェルプレート中の細胞にUV光(365nm、10mW/cm²)を2minにわたって照射した。次いで、培地を新鮮な培地で置き換え、37℃においてインキュベートした。示した各時点で、細胞を採取し、NP溶解緩衝液(Cat. No.87787、Thermo社)中で溶解させた。全溶解物をStrepTactinXTプルダウンに使用した。ビーズからの溶出液を、WB(抗Strept(ab76949、abcam社)及び抗GFP(ab13970、abcam社))によって分析した。

【0415】

補足的な方法

本研究において使用したプライマーのリスト。変異した残基は、大文字で示してある。

【0416】

【表 2】

プライマー名	プライマー配列	
MbY271f	ggaaaggtctcgaccctgNNKaactatctgcgtaaactggatcgtatc	
MbY271r	ggaaaggtctcagggtcggggccagcatcggacgcag	
MbN311f	ggaaaggtctccatggttNNKttttgccaaatgggcagcggctgcacc	10
MbN311r	ggaaaggtctcaccatggtgaattcttcagggtgtctttgc	
MbY349f	ggaaaggtctccatggtgNNKggcgataccctggatattatgcatgg	
MbY349r	ggaaaggtctcaccatgcagctatcgccacaatttcgaagtc	
MbV366f	ggaaaggtctccagcgcgNNKgtgggtccggttagcctggatcgtg	
MbV366r	ggaaaggtctcgctgctcagttccagatcgccatgc	20
MbW382f	ggaaaggtctctaaaccgNNKattggcgcgggttttggcctggaacg	
MbW382r	ggaaaggtctcggtttatcaatgccccattcacgatcc	
TEV_Amb_fw	ggaaaggtctcgTAGggcagtcattagtagtatcaactagagatgg	
TEV_Amb_rev	ggaaaggtctcccCTActgccatccttggttgaatccaatgc	
TEV_Ala_fw	ggaaaggtctcgGCTggcagtcattagtagtatcaactagagatgg	
TEV_Ala_rev	ggaaaggtctcccAGCctgccatccttggttgaatccaatgc	30
TE_for_pNHD_fw	ttattacatatgcatcatcaccaccatc	
TE_for_pNHD_rev	ataataactcgagttagccacgcg	
Vlm2_TE_Amb_Fw	gtgtatatcggtgtcacTAGctgggtggccatat	
Vlm2_TE_Amb_Rev	atatggccaccagCTAgtgaccaccgatatacac	

40

【0417】

インバースPCRによるDAPRSlibライブラリーの作製

プラスミドpBK-pylsをテンプレートとして使用して（Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. Journal of Biological Chemistry 277, 50564-50572 (2002)）、製造業者のガイドラインに従って、PrimeSTAR HS DNAポリメラーゼ（Takara Bio社）を使用する逐次的な5ラウンドのインバースPCR反応によって、アミノ酸 6 のライブラリー（DAPRSlib）を生成した。プライマーは、pyls遺伝子の位置Y271、N311、Y349、V366及びW382のコドン、20種全ての天然アミノ酸のコドンにランダム化

50

した（全てのプライマーを補足表 1 に列挙する）。得られた PCR 産物を B s a I - H F 及び D p n I で消化し、T 4 DNA リガーゼで環状化した。DNA を Electrocompetent MegaX DH10B（商標）T1R Electrocomp（商標）大腸菌細胞（Invitrogen 社）に、製造業者の指示に従って形質転換し、適切な抗生物質を含む一晚培養物に接種して、プラスミド DNA を調製した。適切な抗生物質を含む L B - 寒天プレート上で形質転換レスキュー培養物の段階希釈液をプレーティングすることによって、多様性を推定した。単離された 10^8 種の形質転換体のライブラリーは、97% の信頼度でライブラリーの理論的多様性を網羅した。

【0418】

DAP 誘導体による活性 a a R S の選択

アミノ酸 2 ～ 6 に特異的なシンテターゼ変異体の選択を、以前に報告された (Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50564-50572 (2002)) ようにして、以下のライブラリー: DAPRS Lib (Y271、N311、Y349、V366、W382)、D3 (L270、Y271、L274、N311、C313)、PylS fwd (A267、Y271、L274、C313、M315)、Susan 1 (A267、Y271、Y349、V366、W382)、Susan 2 (N311、C313、V366、W382、G386)、Susan 4 (A267、Y349、S364、V366、G386) を使用して実施した。簡潔には、pBKベクターにおける Mb PylRS ライブラリーを、5 ラウンドのポジティブとネガティブの交互選択に供した。ポジティブ選択は、所望の n c A A (1 mM) の存在下で、許容位置にアンバーコドン (コドン 112) を有し、同族の tRNA を発現する、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼレポーターを使用して、行った。クロラムフェニコール (典型的には $50 \mu\text{g}/\text{mL}$) L B 寒天でのポジティブ選択を生き延びた細胞は、細胞内に構成的に存在する天然アミノ酸又は細胞に添加された n c A A のいずれかを使用すると予測される。使用したネガティブ選択では、アンバーコドンを含み、n c A A の非存在下で同族の tRNA を提供する、バルナーゼレポーターを使用して、天然アミノ酸を使用するシンテターゼバリエーションを除去した。

【0419】

GFP (150TAG) His6 の発現及び精製

150 位に 6 が組み込まれたスーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) を、pBK-DAPRS 又は pBK-PylRS ベクターを含む MegaX DH10B T1R 細胞において pSF-sfGFP150TAG から発現させた。 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリン、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン及び 1 mM の 6 又は N^ε-tert-ブチルオキシカルボニル-リジン (BocK) が補充された L B ブロスに、形質転換細胞を接種した。0.2% (w/v) L - (+) -アラビノース (Sigma 社) を用いて 37°C で 16 h にわたって、 220 rpm で振盪しながら、発現を誘導した。次いで、細菌を収集し、ポリヒスチジンアフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質を精製した。

【0420】

His6-リポイル-TEV-Strep の発現及び精製

BL21 (DE3) 細胞を、pNHD-His6-リポイル-TEV_{wt}-Strep、pNHD-His6-リポイル-TEV_{Ala}-Strep (遺伝子は、Mark Allen 社から譲り受けた) (Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000)) で形質転換するか又は pSF-DAPRS-PylT (Zhou, Y., Prediger, P., Dias, L.C., Murphy, A.C. & Leadlay, P.F. Macrodilide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 5232-5235 (2015)) pNHD-His6-リポイル-TEV_{Amber}-Strep で同時形質転換し、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリン及び (及び同時形質転換された細胞については $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン) を含む T B - 寒天プレート上で 37°C において一晚増殖させた。 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ のテ

ラサイクリン（及び同時形質転換された細胞については $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン）を含むTB-培地に、幾つかの形質転換コロニーを接種した。培養物を、 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリン（並びに同時形質転換された細胞の場合は $25\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン及び $100\mu\text{M}$ の6）を含むTB培地中に1:100希釈し、 37°C でインキュベートした； OD_{600} が0.5~0.7に達したら、培養物を 20°C に移行させた。30minのさらなるインキュベーション後、 $250\mu\text{M}$ のイソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を使用して、培養物を誘導し、 20°C において16hにわたってタンパク質発現を実施した。細胞を、遠心分離によって収集し、 50mM tris-HCl （ $\text{pH}7.5$ ）、 150mM NaCl 、 2mM β -メルカプトエタノール、Roche Inhibitor Cocktailタブレット1錠/ 50mL 、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ リゾチーム（Sigma社）、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase（Sigma社）に再懸濁させ、超音波処理によって溶解させた。溶解物を、 $39,000\times g$ で30minの遠心分離によって清澄化し、 $0.4\mu\text{m}$ ポリエーテルスルホン（PES）膜で濾過した。His6-リポイル-TEV-Strepを、ニッケルアフィニティークロマトグラフィー（HisTrap HPカラム、GE Healthcare社）を使用してイミダゾールの直線勾配（ 0mM ~ 500mM ）によって精製した。タンパク質を含む画分を、Strep-tagアフィニティー精製によって 5mL StrepTrap HPカラム（GE Healthcare社）を使用してさらに精製した。試料をロード後、カラムをstrep結合緩衝液（ 50mM 4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸 [HEPES]（ $\text{pH}8.0$ ）、 150mM NaCl 、 1mM エチレンジアミン四酢酸 [EDTA]、 5mM ジチオトレイトール [DTT]）で洗浄した。デスチオビオチンの直線勾配（ 0mM ~ 1.25mM ）を使用して、タンパク質を溶離させた。His6-リポイル-TEV-Ambler-Strepの場合は、精製の最後にタンパク質にUV光（ 365nm 、 35mWcm^{-2} 、 1min ）を照射した。

【0421】

Ub_{tev}の発現及び精製

BL21（DE3）細胞をpNHD-Ub-tev-His6で形質転換し、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天プレート上で 37°C において一晚増殖させた。 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含むLB培地に、形質転換から得られた幾つかのコロニーを接種した。培養物を、 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含む新鮮なLB培地中に1:100希釈した； OD_{600} が0.5に達したら、 1mM のIPTGを使用して培養物を誘導し、 37°C において6hにわたってタンパク質発現を実施した。遠心分離により細胞を収集し、 50mM tris-HCl （ $\text{pH}7.5$ ）、 150mM NaCl 、 2mM β -メルカプトエタノール、Roche Inhibitor Cocktailタブレット1錠/ 50mL 、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ リゾチーム（Sigma社）、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase（Sigma社）に再懸濁させ、超音波処理によって溶解させた。溶解物を、 $39,000\times g$ で30minの遠心分離及び $0.4\mu\text{m}$ PES膜での濾過によって清澄化した。Ubを、ニッケルアフィニティークロマトグラフィー（HisTrap HPカラム、GE Healthcare社）を使用して、イミダゾールの直線勾配（ 30mM ~ 500mM ）で精製した。タンパク質を 4°C において 10mM tris-HCl に対して一晚透析し、イオン交換クロマトグラフィー（HiTrapS 5mL カラム、GE Healthcare社）によって 50mM 酢酸アンモニウム（ $\text{pH}4.5$ ）中の NaCl 勾配（ 0 ~ 1M mM ）を使用して、Ubをさらに精製した。純粋な画分をブールしてから、 20mM tris-HCl （ $\text{pH}7.4$ ）に対して一晚透析した。次いで、Amicon Ultra-15（ 3kDa MWCO）遠心フィルターデバイス（Millipore社）を使用して、試料を約 $15\text{mg}/\text{mL}$ に濃縮した。

【0422】

TEVとUb_{tev}との反応

$15\mu\text{g}$ のHis6-リポイル-TEV-Strepを $60\mu\text{g}$ のUb_{tev}と共に 30°C でインキュベートし、 $150\mu\text{L}$ の 50mM HEPES（ $\text{pH}8.0$ ）、 150mM NaCl 、 1mM EDTA、 5mM DTT中で一晚反応させた。 $20\mu\text{L}$ の反応物を4~12%のNuPAGE Bis-Trisゲル（Invitrogen社）にロードし、2-（ n -モルホリノ

10

20

30

40

50

)-エタンスルホン酸 (MES) 緩衝液中で 45 min にわたって泳動させた。25 mM Tris (pH 8.2)、192 mM グリシン、10% (v/v) メタノールを使用して、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Roche 社) にタンパク質を転写した。続いて、室温で 5% (w/v) の粉ミルクを含む TBS-T 緩衝液 (25 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% [v/v] Tween 20) 中で 1 h にわたって膜をブロックした。抗体 (Strept-Actin-HRP コンジュゲート (α Strept) [IBA Lifesciences 社] 又は P4D1 抗体 (α Ub) [Enzo Life Sciences 社]) を 5% TBS-T-ミルク中に添加し、4°C で一晩インキュベートした。二次抗体 (α Ub 抗体用) を 5% TBS-T-ミルクに加え、室温で 1 h にわたってインキュベートした。ブロットは、Amersham 増強化学発光 (ECL, enhanced chemiluminescence) (GE Healthcare 社) 及び ChemiDoc XRS+ ゲルイメージングシステム (Bio-Rad 社) を使用して展開した。

【0423】

DAP 誘導体の細胞内濃度の分析

DAP 誘導体の細胞内濃度の分析を以前に記載された (Zhou, Y., Prediger, P., Dias, L.C., Murphy, A.C. & Leadlay, P.F. Macrodilide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. Angew Chem Int Ed Engl 54, 5232-5235 (2015)) ようにして行った。要するに、DAP 誘導体を LB 培地の 5 mL 溶液に最終濃度 1 mM まで添加した。対照試料もまた、5 mL の非補充 LB 培地を用いて調製した。各溶液に DH10B 細胞を接種した。培養物を暗所、37°C において 12 h にわたって 220 rpm で攪拌した。各試料の OD₆₀₀ を決定し、各培養物からの細胞を収集した。細胞ペレットを、再懸濁及び遠心分離のサイクルにより、1 mL の新鮮な氷冷 LB 培地で 3 回洗浄した。洗浄した細胞ペレットをメタノール：水 (60：40) 溶液に再懸濁させた。ジルコニウムビーズ (0.1 mm) を各懸濁液に添加した。懸濁液を 12 min にわたってボルテックスして、細胞を溶解させた。溶解物を 4°C において 21000 × g で 30 min にわたって遠心分離した。上清を注意深く取り除き、新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れた。溶液を 4°C において 21000 × g で 2 h にわたって再び遠心分離した。得られた試料からの上清の 100 µL アリコートで LC-ESI-MS で分析した。水中 0.5% ~ 95% のアセトニトリルの勾配を適用して、Zorbax C18 (4.6 × 150 mm) カラムから清澄化された溶解物を溶離させた。1 OD₆₀₀ 単位当たり細胞 8 × 10⁸ 個の推定値及び 0.6 × 10⁻¹⁵ の細胞体積を使用して、濃度を推定した。

【0424】

Vlm TE コンストラクトのクローニング、発現及び精製

Vlm2-PCP4-TE (ストレプトマイセス・ツシマエンスシ (Streptomyces tsusimaensis) 由来の Vlm2 の残基 2290 ~ 2655 をコードする、GenBank: ABAB59548.1) を含むコドン最適化コンストラクトを、pJExpress411 ベクター中で ATUM (以前の DNA2.0) によって、N 末端ヘキサヒスチジンタグ、続いてタバコエッチウイルスプロテアーゼ (TEV) 切断認識配列 (pJExpress411-vlm2-PCP4-TE_{wt}) を用いて合成した。pJExpress411-vlm2-PCP4-TE_{wt} には、ヌクレオチドの 2024 ~ 2025 位及び 2267 ~ 2268 位に 2 つの BamHI 認識配列が含まれていた。BamHI での消化、それに続く T4 DNA リガーゼ (New England Biolabs 社) でのライゲーションにより、PCP4 ドメイン配列が切り取られ、Vlm2 の残基 2368 ~ 2655 をコードするプラスミド pJExpress411-vlm2-TE_{wt} が得られた。TE_{DAP} の発現ベクターを生成するために、pJExpress411-vlm2-TE_{wt} から、プライマー TE_{for} pNHD_{fw} 及び TE_{for} pNHD_{rev} を用いて、TE_{wt} コード配列を PCR 増幅した。PCR 産物を NdeI 及び XhoI で消化し、同様に消化した pNHD プラスミドに T4 DNA リガーゼを使用してライゲートし、プラスミド pNHD-vlm2-TE_{wt} を生成した。次に、プライマー Vlm2_{TE} Amb_{FW} 及び Vlm2_{TE} Amb_{Rev} を使用して部位特異的変異誘発により、セリン 2463 のコドンの代わりにアンバー終止コドンを導入し、pNHD-vlm2-TE_{amber2463} を生成した。

【0425】

pJExpress411-vlm2-TE_{wt} (TE_{wt}) で形質転換された又はpNHD-Vlm2-TE_{amber2463}及びpSF-DAPRS-PylT (TE_{DAP}) で同時形質転換された大腸菌BL21 (DE3) 細胞で、TEドメインを異種発現した。TE_{wt}を発現する培養物を、 $17\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のカナマイシンが補充されたLB培地中で増殖させた。TE_{DAP}を発現するものを、 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のカナマイシン、 $12.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のテトラサイクリン、 0.1 mM の6 (6の100 mM原液を 0.4 M NaOH 中で調製し、培養物に添加し、 5 M HCl を使用して中和した) が補充されたTB培地中で増殖させた。培養物を、 $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0.6$ に達するまで 37°C において、 220 r.p.m で攪拌しながらインキュベートし、その後、 16°C で 30 min にわたってインキュベートし、次いで $100\text{ }\mu\text{M}$ のIPTGで発現を誘導した。培養物を 16°C でさらに16時間インキュベートした後、 5000 g での 20 min にわたる遠心分離により収集した。細胞ペレットを -80°C で保存した。

【0426】

タンパク質の精製のために、TE_{wt}の細胞ペレットを、湿潤細胞1 g当たり5 mLの緩衝液wt-A ($50\text{ mM TRIS (pH 7.4)}$ 、 150 mM NaCl 、 50 mM イミダゾール、 $2\text{ mM } \beta$ -メルカプトエタノール [βME]) + DNase I (Bioshop社) に再懸濁させ、超音波処理によって溶解させた。溶解物を、 40000 g で 20 min の遠心分離によって清澄化した。清澄化した溶解物を、AKTA Primeシステム (GE Healthcare Life Sciences社) で直列に接続された2つの5 mL HiTrap IMAC FF (GE Healthcare Life Sciences社) カラムに適用した。結合したタンパク質を緩衝液wt-B (緩衝液wt-A + 150 mM イミダゾール) で溶離させた。TE_{wt}を含む画分 (SDS-PAGE分析によって決定) をプールし、TEVプロテアーゼと共に1:100 (Te:TEV) の質量/質量比でインキュベートし、 4°C において16時間にわたって緩衝液wt-C ($50\text{ mM TRIS (pH 7.4)}$ 、 10 mM NaCl 、 $2\text{ mM } \beta\text{ME}$) に対して透析した。緩衝液wt-Aで予め平衡化した、直列に接続された2つの5 mL HiTrap IMAC FFカラムに、透析した試料を適用した。切断されたタンパク質をフロースルーから回収し、緩衝液Q-A ($50\text{ mM TRIS (pH 7.4)}$ 、 10 mM NaCl 、 $2\text{ mM } \beta\text{ME}$) で予め平衡化した、直列に接続された2つの5 mL HiTrap Q HPカラムに適用した。 240 mL を超える0~100%の緩衝液Q-B ($50\text{ mM TRIS (pH 7.4)}$ 、 500 mM NaCl 、 $2\text{ mM } \beta\text{ME}$) の勾配によって、タンパク質を溶離させた。TE_{wt}を含む画分を 10 kDa 分子量カットオフAmicon (登録商標) Ultra遠心フィルター (Millipore社) で濃縮し、SEC緩衝液 ($25\text{ mM HEPES (pH 7.4}$ 又は pH 8.0)、 100 mM NaCl 、 0.2 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン [TCEP]) で予め平衡化したSuperdex S-200 16/60 PGカラム (GE-Healthcare社) に注入した。精製されたTE_{wt}を含む画分をプールし、濃縮し、急速冷凍 (flash frozen) した。

【0427】

TE_{DAP}についての細胞再懸濁、溶解、清澄化、及びNi-IMAC精製は、光への長時間の曝露を回避した以外はTe_{wt}について記載したようにして行った。Ni-IMACカラムから溶離させた後、試料にUV光 (365 nm 、 mW cm^{-2} 、 1 min) を照射した。TEV切断及びそれに続くIMACカラムは、1:1のTE:TEV比を使用した以外はTE_{wt}について記載したようにして行った。アニオン交換は、 25 mM HEPES が緩衝液としてTRISに置き換わり、 0.2 mM TCEP が移動相の還元剤として βME に置き換わった以外はTe_{wt}について記載したようにして行った。関連する画分を濃縮し、緩衝液T ($25\text{ mM HEPES (pH 8.0)}$ 、 100 mM NaCl 、 0.2 mM TCEP) で予め平衡化したSuperdex S-75 10/300カラムに注入した。精製TE_{DAP}を含む画分をプールし、濃縮し、さらなる実験に直ちに使用した。精製TE_{wt}の収量は1 L当たり $30\sim60\text{ mg}$ 、精製TE_{DAP}の収量は1 L当たり $0.1\sim0.5\text{ mg}$ であった。

【0428】

結晶学

TE_wt 構造 1 の結晶化条件は、蒸気拡散結晶化試験において、市販のスクリーン (Qia gen社) 及び $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ のタンパク質濃度を使用して見出した。24 ウェルプレートでの初期結晶化ヒットの最適化により、 $3.2\text{ }\mu\text{L}$ の $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TE_wt、 $4.0\text{ }\mu\text{L}$ の 1.65 M DL-リンゴ酸 (pH 9.5) 及び $0.8\text{ }\mu\text{L}$ の $17\% \text{ m/v}$ IPTG を $500\text{ }\mu\text{L}$ の 1.65 M DL-リンゴ酸 (pH 9.5) のリザーバー溶液に対してインキュベートするという、最終結晶化条件が得られた。TE_wt 構造 2 結晶を、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ の $22.4\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 精製 TE_wt 及び $0.5\text{ }\mu\text{L}$ の 1.65 M DL-リンゴ酸 (pH 8.1) を $500\text{ }\mu\text{L}$ の DL-リンゴ酸 (pH 8.1) のリザーバー溶液に対してインキュベートするという同様な条件で成長させた。結晶は 24 時間から 48 時間の間に出現し、約 1 週間で最大サイズに達した。

【0429】

リガンド非結合型 TE_{DAP} の結晶は、 1.65 M DL-リンゴ酸 (pH 8.0) のリザーバー溶液を用いて、TE_wt と同様の条件で成長させた。テトラデプシペプチジル-TE_{DAP} 複合体構造を得るために、TE_{DAP} 結晶は、最大サイズに達したら、デオキシテトラデプシペプチジル-SNAC 8 と共にインキュベートした。リザーバー溶液を、 2.66 M DL-リンゴ酸 (pH 9.5) に交換し、 1 mM デオキシテトラデプシペプチジル-SNAC、 2.66 M DL-リンゴ酸 (pH 9.5)、 100 mM NaCl、 25 mM HEPES (pH 9.2)、 10% DMSO の溶液 $32\text{ }\mu\text{L}$ をドロップに追加した。結晶を室温においてこの条件で 9 日間インキュベートした。

【0430】

ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP} 複合体結晶については、TE_{DAP} ($0.1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) を、緩衝液 T 中のバリノマイシンの $1.1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 懸濁液中で室温において 16 時間インキュベートした。試料を 20000 g で遠心分離し、緩衝液 T で予め平衡化した Superdex S-75 10/300 カラムに適用して、過剰なバリノマイシンを除去した。関連する画分をプールし、複合体形成を LC-ESI-MS (以下を参照) によって評価した。試料を $13.4\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ に濃縮し、TE_wt 結晶とは異なる形態を有する回折品質の結晶が、 $500\text{ }\mu\text{L}$ のリザーバー溶液に対して平衡化された、 $1\text{ }\mu\text{L}$ のドデカデプシペプチジル-TE_{DAP} 複合体 + $1\text{ }\mu\text{L}$ のリザーバー溶液 ($1.30 \sim 1.45\text{ M}$ の DL-リンゴ酸 (pH 8.1)) からなるシッティングドロップにおいて得られた。リガンドの占有率を改善する試みにおいて、これらの結晶のサブセットを、 $555\text{ }\mu\text{M}$ バリノマイシン、 2 M DL-リンゴ酸 (pH 8.1)、 11 mM HEPES (pH 8.0)、 44 mM NaCl、 0.088 mM TCEP を含む $20\text{ }\mu\text{L}$ の溶液の添加により、バリノマイシンと共に 24 時間にわたってさらにインキュベートした。

【0431】

TE_wt 及びドデカデプシペプチジル-TE_{DAP} 結晶を、結晶化ドロップに $10\text{ }\mu\text{L}$ (TE_wt 構造 1 及びドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}) 又は $20\text{ }\mu\text{L}$ (TE_wt 構造 2) の 3.6 M DL-リンゴ酸 (pH 8.1) を添加することによって凍結保護した。バリノマイシンと共にインキュベートしたドデカデプシペプチジル-TE_{DAP} 結晶については、ドロップ溶液を除去し、 $10\text{ }\mu\text{L}$ の 3.6 M DL-リンゴ酸で置き換えた。結晶を少なくとも 2 分間平衡化し、次いで液体窒素中で急速冷却した。テトラデプシペプチジル-TE_{DAP} 複合体結晶をループにして、インキュベーション溶液から直接急速冷却した。TE_wt データは最初に、Centre for Structural Biology, McGill University, Montreal, Canada において、株式会社リガク製の RUH3R 発生器及び R-Axis IV++ 検出器で収集した。TE_wt 及びデプシペプチジル-TE_{DAP} 複合体のより高解像度のデータは、Canadian Light Source (CLS) 08ID-1 ビームライン又は Advanced Photon Source (APS) NE-CAT 24-ID-C ビームラインで Pilatus 検出器を使用して収集した (拡張データ表 1)。

【0432】

TE_wt の構造決定

TE_{wt}構造1結晶からの回折データはインデックス付けし、iMosflm (Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T. Cyclization of backbone-substituted peptide catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001)) 又はDIALS (Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets M. tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225 (2017)) を使用して空間群P 4 3 2に統合した。さらなる空間群の決定及び尺度化は、プログラムPOINTLESS及びSCALA (Cravatt, B.F., Wright, A.T. & Kozarich, J.W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 77, 383-414 (2008)) を使用して行った。PHASER (McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)) を使用した分子置換によって、srfA-C (PDB ID 2VSQ) (Alonzo, D. A., Magarvey, N. A. & Schmeing, T. M. Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PloS one* 10, e0128569, doi:10.1371/journal.pone.0128569 (2015)) のTEドメインのSCULPTOR (Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methyleneedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)) 修正バージョンを検索モデルとして、構造を解析した。プログラムPhenix (Shaw-Reid, C. A. et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of E. coli EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology* 6, 385-400, doi:10.1016/S1074-5521(99)80050-7 (1999)) 及びAUTOBUILD (May, J. J., Wendrich, T. M. & Marahiel, M. A. The dhb operon of Bacillus subtilis encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276, 7209-7217, doi:10.1074/jbc.M009140200 (2001)) を使用して、構造を反復的に精密化し、構築した。反復モデル構築には、Coot (Zhou, Y. et al. Iterative Mechanism of Macrodilide Formation in the Anticancer Compound Conglobatin. *Chemistry & biology* 22, 745-754, doi:10.1016/j.chembiol.2015.05.010 (2015)) を使用した。TopDraw (Robbel, L., Hoyer, K. M. & Marahiel, M. A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *FEBS J* 276, 1641-1653, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06897.x (2009)) を使用して、TE_{wt}構造をインプットとして使用したPDBsum generate (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) からの結果に基づいて、トポロジー図を生成した。

【0433】

ドデカデプシペプチジル-TE_{DAP}複合体結晶から収集した回折データセットを、iMosflm (Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001)) 又はDIALS (Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets M. tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225 (2017)) を使用してP 1又はH 3空間群にインデックス付けした。H 3群に属するほとんどの結晶は双晶形成の証拠を示し、非双晶回折データのみを構造決定に使用した。PHASER (McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)) を使用した分子置換によって、残基2500~2647を欠くTE_{wt}構造を検索モデルとして使用して、P 1及びH 3空間群の両方における構造を解析した。P 1構造は非対称単位に6つの分子を有するのに対し、H 3構造は非対称単位に2つの

分子を含んでいた。全てのデプシペプチジル-TE_{DAP}モデルを精密化し、mF_o-F_cマップを生成してから、デプシペプチド残基をモデルにおいて構築した(図4c、d及び拡張データ図8)。デプシペプチドは、PDB Chemical Component Dictionaryの個々のモノマー(DPP、VAL、2OP、DVA、VAD)から構築した。モノマーライブラリー及びモノマー間の連結の拘束(すなわち、DPP→VAL、VAL→2OP、2OP→DVA、DVA→VAD及びVAD→VAL)を、AceDRG(Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S. D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488, doi:10.1016/j.chembiol.2011.09.018 (2011))を使用して計算し、LIBCHECK(Trauger, J. W., Kohli, R. M. & Walsh, C. T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001))を使用してマージした。次いで、得られた、マージされた辞書を、Coot(Zhou, Y. et al. Iterative Mechanism of Macrodilide Formation in the Anticancer Compound Conglobatin. *Chemistry & biology* 22, 745-754, doi:10.1016/j.chembiol.2015.05.010 (2015))における基質構築並びにREFMAC5(Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets M. tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225, doi:10.1016/j.cell.2017.06.025 (2017))及びphenix.refine(Shaw-Reid, C. A. et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of E. coli EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology* 6, 385-400, doi:10.1016/S1074-5521(99)80050-7 (1999))における精密化に使用した。最終的な統計を、拡張データ表1に示す。

【0434】

デプシペプチジル-TE複合体の形成

最終濃度0.2mg・mL⁻¹のTE_{DAP}又はTE_{wt}を、1.7%又は1%v/v DMSOを含む緩衝液T中、テトラデプシペプチジル-SNAC 7(1.7mM)又はバリノマイシン(50μM)と共に16時間にわたってインキュベートした。反応物を10kDa分子量カットオフAmicon(登録商標)Ultra遠心フィルター(Millipore社)中で濃縮し、20000gでの遠心分離によって清澄化し、緩衝液Tで予め平衡化したSuperdex S-75 10/300カラムに適用して、最終LC-ESI-MS分析の前に過剰なデプシペプチジル-SNAC又はバリノマイシンを除去した。デオキシテトラデプシペプチジル-TE_{DAP}複合体を形成するために、最終濃度8.7mg・mL⁻¹のTE_{DAP}を、25mM HEPES(pH8.6)、100mM NaCl、3.8%v/v DMSO中、デオキシテトラデプシペプチジル-SNAC 8(2.6mM)と共に40時間にわたってインキュベートした。最終LC-ESI-MS分析の前に、試料を100mM重炭酸アンモニウム(pH8.0)で希釈した。全てのインキュベーションは、室温で行った。

【0435】

インタクトなタンパク質のLC-ESI-MS分析

図2c、拡張データ図3b、7cに示す実験については、タンパク質試料を液体クロマトグラフィー(LC)システム(Agilent 1200シリーズ)、続いて、6130 Quadrupoleスペクトロメーターでのインラインエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)に供した。Jupiter 5μC4 300Aカラム、150mm×2.00mm(Phenomenex社)を使用して、LCシステムに、0.1%(v/v)ギ酸を含む水(溶媒A)及び0.1%(v/v)ギ酸を含むアセトニトリル(溶媒B)の勾配(6minで10%~75%及び1,5minで75%~95%)を使用して、タンパク質を流した。タンパク質は、200及び280nmにおけるUV吸光度を監視することによって検出した。タンパク質の質量は、OpenLAB CDSソフトウェア(Agilent Technologies社)を使用して、正イオンモードでのMS取得からのデコンボリューションによって計算した。

【0436】

図4 a、b、拡張データ図6 d～f、7 d、eに示す実験については、タンパク質濃度を緩衝液T中で $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ に調整し、Bruker Amazon Speed ETDイオントラップ質量分析計に連結されたAgilent Technologies 1260 Infinity HPLCシステム上の、95%移動相A（水中0.1%ギ酸）及び5%移動相B（100%アセトニトリル中0.1%ギ酸）で予め平衡化したAgilent PLRP-S（1000 Å 5 μM 、50 $\times$ 2.1 mm ID）カラムに、16 μL を注入した。MSデータは、ExtremeScan質量範囲モードを用いて、正イオン極性、スキャン範囲50～3000 m/z 、蓄積時間1586 μs 、RFレベル96%、トラップドライブ69.8、PSP標的質量922 m/z で、5つ以上のスペクトルを平均して、収集した。外部機器のキャリブレーションは、Agilent ESIチューンミックスを使用して行った。カラムコンパートメントの温度は、運転全体を通して80 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。注入後、初期HPLC条件で、試料コンパートメント切替バルブを廃液位置にして、カラムを5分間洗浄した。次に、5%～100%までの移動相Bの5分間の勾配を行い、続いて100%の移動相Bの均一濃度（isocratic）ステップを8分間行った。タンパク質は、280 nmでのUV吸光度を監視することによって検出した。データは、Bruker DataAnalysisソフトウェア（Bruker社）を使用して分析した。質量スペクトルは、10.5～3分まで積分し、10000～40000 m/z の間のウィンドウを使用してデコンボリューションした。

【0437】

タンデムMS／MS分析

タンパク質は、MES緩衝液を含む4～12% NuPAGE Bis-Trisゲル（Invitrogen社）上で泳動し、InstantBlue（Expedeon社）を使用して短時間染色した。バンドを切り取り、20 mM Tris（pH 7.4）中で保存した。トリプシン消化及びタンデムMS／MS分析は、Kate Heesom（Proteomics Facility、University of Bristol）によって行われた。

【0438】

Vlm TE反応生成物のLC－ESI－MS分析

$0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ （6.5 μM ）の精製TE_{wt}又はTE_{DAP}を、緩衝液T中、テトラデプシペプチジル－SNAC 7（1.7 mM）又はテトラデプシペプチジル－SNAC 7とデオキシテトラデプシペプチジル－SNAC 8（各1.7 mM）の混合物と共にインキュベートした。試料を室温で24時間インキュベートし、次いで1倍容量の、アセトニトリル中0.1%ギ酸でクエンチした。次に、試料を20,000 gで遠心分離し、液体窒素中で急速冷凍し、HPLC分析の前に－80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。HPLC－MS分析については、冷凍試料を室温で解凍し、ボルテックスして、注入前に20,000 gでの遠心分離によって清澄化した。HR－LC－ESI－MSは、Mass Spectroscopy Facility（Department of Chemistry、McGill University）で、Bruker maXis impact QTOF質量分析計に連結されたDionex Ultimate 3000U HPLCシステムにおいて、Agilent XDB-C8（5 μm 、4.6 $\times$ 150 mm）カラムを用いて正のESIモードで行った。イオントラップLC－ESI－MS分析は、Bruker Amazon Speed ETDイオントラップ質量分析計に連結されたAgilent Technologies 1260 Infinity HPLCシステムにおいて、正のESIモードで行った。カラムコンパートメントは、運転全体を通して40 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。開始HPLC条件は、50%移動相A（H₂O中0.1%ギ酸）、50%移動相B（アセトニトリル中0.1%ギ酸）とした。注入（HR－LC－ESI－MSの場合は1 μL 、イオントラップLC－ESI－MSの場合は5 μL ）の後、5分間で50%～98%までの移動相Bの勾配を行い、続いて98%移動相Bの均一濃度ステップを20分間行った。HR－LC－ESI－MSについては、Na⁺フォルメートを使用する最初の分析の開始時に、運転内注入を使用して内部キャリブレーションを行い、得られたキャリブレーションを後続の分析の外部キャリブレーションとして使用した。イオントラップの外部キャリブレーションは、Agilent ESIチューンミックスを使用して行った。データは、Bruker DataAnalysisソフトウェア及びSmartFormulaツール（Bruker社）を使用して分析した。

【 0 4 3 9 】

実施例 1 ～ 9 に関する参考文献

- 1 Holliday, G.L., Mitchell, J.B.O. & Thornton, J.M. Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. *Journal of molecular biology* 390, 560-577 (2009)
- 2 Di Cera, E. Serine proteases. *IUBMB Life* 61, 510-515 (2009)
- 3 Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102, 4501-4523 (2002)
- 4 Long, J.Z. & Cravatt, B.F. The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. *Chem Rev* 111, 6022-6063 (2011)
- 5 Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol* 7 (2016)
- 6 Otto, H.H. & Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem Rev* 97, 133-171 (1997)
- 7 Swatek, K.N. & Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399-422 (2016)
- 8 Yang, W. & Drueckhammer, D.G. Understanding the relative acyl-transfer reactivity of oxoesters and thioesters: computational analysis of transition state delocalization effects. *Journal of the American Chemical Society* 123, 11004-11009 (2001)
- 9 Liu, B., Schofield, C.J. & Wilmouth, R.C. Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24024-24035 (2006)
- 10 Ngo, P.D., Mansoorabadi, S.O. & Frey, P.A. Serine Protease Catalysis: A Computational Study of Tetrahedral Intermediates and Inhibitory Adducts. *J Phys Chem B* 120, 7353-7359 (2016)
- 11 Cleary, J.A., Doherty, W., Evans, P. & Malthouse, J.P.G. Quantifying tetrahedral adduct formation and stabilization in the cysteine and the serine proteases. *Bba-Proteins Proteom* 1854, 1382-1391 (2015)
- 12 Scaglione, J.B. et al. Biochemical and structural characterization of the tautomycetin thioesterase: analysis of a stereoselective polyketide hydrolase. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 5726-5730 (2010)
- 13 Cappadocia, L. & Lima, C.D. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structure, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* 118, 889-918 (2018)
- 14 Plechanovova, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H. & Hay, R.T. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 489, 115-U135 (2012)
- 15 Hay, R.W. & Morris, P.J. Interaction of DL-2,3-Diaminopropionic Acid and Its Methyl Ester with Metal Ions .1. Formation Constants. *J Chem Soc A*, 3562-& (1971)
- 16 Lan, Y. et al. Incorporation of 2,3-Diaminopropionic Acid into Linear Cationic Amphipathic Peptides Produces pH-Sensitive Vectors. *Chembiochem* 11, 1266-1272 (2010)
- 17 Radzicka, A. & Wolfenden, R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. *Journal of the American Chemical Society* 118, 6105-6109 (1996)
- 18 Hoyer, K.M., Mahlert, C. & Marahiel, M.A. The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chemistry & biology* 14, 13-22 (2007)
- 19 Alonzo, D.A., Magarvey, N.A. & Schmeing, T.M. Characterization of cereuli

10

20

30

40

50

de synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PloS one* 10, e0128569 (2015)

20 Magarvey, N.A., Ehling-Schulz, M. & Walsh, C.T. Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. *Journal of the American Chemical Society* 128, 10698-10699 (2006)

21 Shaw-Reid, C.A. et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology* 6, 385-400 (1999)

22 May, J.J., Wendrich, T.M. & Marahiel, M.A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276, 7209-7217 (2001)

23 Zhou, Y. et al. Iterative Mechanism of Macrodiolide Formation in the Anti cancer Compound Conglobatin. *Chemistry & biology* 22, 745-754 (2015)

24 Robbel, L., Hoyer, K.M. & Marahiel, M.A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *FEBS J* 276, 1641-1653 (2009)

25 Jaitzig, J., Li, J., Sussmuth, R.D. & Neubauer, P. Reconstituted biosynthesis of the nonribosomal macrolactone antibiotic valinomycin in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 3, 432-438 (2014)

26 Akey, D.L. et al. Structural basis for macrolactonization by the pikromycin thioesterase. *Nat Chem Biol* 2, 537-542 (2006)

27 Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. & Essen, L.O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *Journal of molecular biology* 359, 876-889 (2006)

28 Tseng, C.C. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41, 13350-13359 (2002)

29 Bruner, S.D. et al. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* 10, 301-310 (2002)

30 Li, J. et al. Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nat Chem* 6, 352-361 (2014)

31 Baker, A.S. & Deiters, A. Optical Control of Protein Function through Unnatural Amino Acid Mutagenesis and Other Optogenetic Approaches. *Acs Chemical Biology* 9, 1398-1407 (2014)

32 Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243 (2014)

33 Nguyen, D.P., Elliott, T., Holt, M., Muir, T.W. & Chin, J.W. Genetically Encoded 1,2-Aminothiols Facilitate Rapid and Site-Specific Protein Labeling via a Bio-orthogonal Cyanobenzothiazole Condensation. *Journal of the American Chemical Society* 133, 11418-11421 (2011)

34 Neumann, H., Peak-Chew, S.Y. & Chin, J.W. Genetically encoding N-epsilon-n-acetyllysine in recombinant proteins. *Nature Chemical Biology* 4, 232-234 (2008)

35 Chin, J.W. Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals. *Annu Rev Biochem* 83, 379-408 (2014)

- 36 Liu, C.C. & Schultz, P.G. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79 79, 413-444 (2010)
- 37 Zhang, M.S. et al. Biosynthesis and genetic encoding of phosphothreonine through parallel selection and deep sequencing. *Nat Methods* 14, 729-736 (2017)
- 38 Virdee, S., Ye, Y., Nguyen, D.P., Komander, D. & Chin, J.W. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nature Chemical Biology* 6, 750-757 (2010)
- 39 Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50564-50572 (2002)
- 40 Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000)
- 41 Zhou, Y., Prediger, P., Dias, L.C., Murphy, A.C. & Leadlay, P.F. Macrolide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 5232-5235 (2015)
- 42 Horsman, M.E., Hari, T.P.A. & Boddy, C.N. Polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase thioesterase selectivity: Logic gate or a victim of fate? *Natural Products Reports* (2015)
- 43 Frueh, D.P. et al. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature* 454, 903-906 (2008)
- 44 Whicher, J.R. et al. Structure and function of the RedJ protein, a thioesterase from the prodiginine biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* 286, 22558-22569 (2011)
- 45 Ekici, O.D., Paetzel, M. & Dalbey, R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci* 17, 2023-2037 (2008)
- 46 Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S.D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488 (2011)
- 47 Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001)
- 48 Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets M. tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225 (2017)
- 49 Cravatt, B.F., Wright, A.T. & Kozarich, J.W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 77, 383-414 (2008)
- 50 McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)
- 51 Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methylenedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)

【 0 4 4 0 】

補足の方法に関する参考文献：

- 31 Baker, A.S. & Deiters, A. Optical Control of Protein Function through Unnatural Amino Acid Mutagenesis and Other Optogenetic Approaches. *Acs Chemical Biology* 9, 1398-1407 (2014)
- 32 Nguyen, D.P. et al. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *Journal of the American*

Chemical Society 136, 2240-2243 (2014)

33 Nguyen, D.P., Elliott, T., Holt, M., Muir, T.W. & Chin, J.W. Genetically Encoded 1,2-Aminothiols Facilitate Rapid and Site-Specific Protein Labeling via a Bio-orthogonal Cyanobenzothiazole Condensation. *Journal of the American Chemical Society* 133, 11418-11421 (2011)

34 Neumann, H., Peak-Chew, S.Y. & Chin, J.W. Genetically encoding N-epsilon-acetyllysine in recombinant proteins. *Nature Chemical Biology* 4, 232-234 (2008)

35 Chin, J.W. Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals. *Annu Rev Biochem* 83, 379-408 (2014)

36 Liu, C.C. & Schultz, P.G. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79 79, 413-444 (2010)

37 Zhang, M.S. et al. Biosynthesis and genetic encoding of phosphothreonine through parallel selection and deep sequencing. *Nat Methods* 14, 729-736 (2017)

38 Virdee, S., Ye, Y., Nguyen, D.P., Komander, D. & Chin, J.W. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nature Chemical Biology* 6, 750-757 (2010)

39 Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *Journal of Biological Chemistry* 277, 50564-50572 (2002)

40 Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* 407, 215-218 (2000)

41 Zhou, Y., Prediger, P., Dias, L.C., Murphy, A.C. & Leadlay, P.F. Macrodilide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 5232-5235 (2015)

42 Horsman, M.E., Hari, T.P.A. & Boddy, C.N. Polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase thioesterase selectivity: Logic gate or a victim of fate? *Natural Products Reports* (2015)

43 Frueh, D.P. et al. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature* 454, 903-906 (2008)

44 Whicher, J.R. et al. Structure and function of the RedJ protein, a thioesterase from the prodiginine biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* 286, 22558-22569 (2011)

45 Ekici, O.D., Paetzel, M. & Dalbey, R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci* 17, 2023-2037 (2008)

46 Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S.D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488 (2011)

47 Trauger, J.W., Kohli, R.M. & Walsh, C.T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001)

48 Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets M. tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225 (2017)

49 Cravatt, B.F., Wright, A.T. & Kozarich, J.W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 77, 383-414 (2008)

50 McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)

10

20

30

40

50

- 51 Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methylenedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)
- 52 Alonzo, D. A., Magarvey, N. A. & Schmeing, T. M. Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PloS one* 10, e0128569, doi:10.1371/journal.pone.0128569 (2015)
- 53 Shaw-Reid, C. A. et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology* 6, 385-400, doi:10.1016/S1074-5521(99)80050-7 (1999)
- 54 May, J. J., Wendrich, T. M. & Marahiel, M. A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276, 7209-7217, doi:10.1074/jbc.M009140200 (2001)
- 55 Zhou, Y. et al. Iterative Mechanism of Macrodiolide Formation in the Anti cancer Compound Conglobatin. *Chemistry & biology* 22, 745-754, doi:10.1016/j.chembiol.2015.05.010 (2015)
- 56 Robbel, L., Hoyer, K. M. & Marahiel, M. A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *FEBS J* 276, 1641-1653, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06897.x (2009)
- 57 Liu, Y., Zheng, T. & Bruner, S. D. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 18, 1482-1488, doi:10.1016/j.chembiol.2011.09.018 (2011)
- 58 Trauger, J. W., Kohli, R. M. & Walsh, C. T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 40, 7092-7098 (2001)
- 59 Aggarwal, A. et al. Development of a Novel Lead that Targets *M. tuberculosis* Polyketide Synthase 13. *Cell* 170, 249-259 e225, doi:10.1016/j.cell.2017.06.025 (2017)
- 60 Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol* 4, 232-234, doi:10.1038/nchembio.73 (2008)
- 61 Rogerson, D. T. et al. Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog. *Nat Chem Biol* 11, 496-503, doi:10.1038/nchembio.1823 (2015)
- 62 Zhang, M. S. et al. Biosynthesis and genetic encoding of phosphothreonine through parallel selection and deep sequencing. *Nat Methods* 14, 729-736, doi:10.1038/nmeth.4302 (2017)
- 63 McGall, G. H. et al. The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119, 5081-5090, doi:DOI 10.1021/ja964427a (1997)
- 64 Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding of photocaged cysteine allows photoactivation of TEV protease in live mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2240-2243, doi:10.1021/ja412191m (2014)
- 65 Pendrak, I., Wittrock, R. & Kingsbury, W. D. Synthesis and Anti-Hsv Activity of Methylenedioxy Mappicine Ketone Analogs. *J Org Chem* 60, 2912-2915, doi:DOI 10.1021/jo00114a050 (1995)
- 66 Mayer, S. C., Ramanjulu, J., Vera, M. D., Pfizenmayer, A. J. & Joullie, M.

10

20

30

40

50

M. Synthesis of New Didemnin B Analogs for Investigations of Structure/Biological Activity Relationships. *J Org Chem* 59, 5192-5205, doi:10.1021/jo00097a022 (1994)

67 Faure, S. et al. Asymmetric intramolecular [2+2] photocycloadditions: alpha- and beta-hydroxy acids as chiral tether groups. *J Org Chem* 67, 1061-1070, doi:10.1021/jo001631e (2002)

68 Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67, 271-281, doi:10.1107/S0907444910048675 (2011)

69 Winter, G. et al. DIALS: implementation and evaluation of a new integration package. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* 74, 85-97, doi:10.1107/S2059798317017235 (2018)

【0441】

本発明の例示的な実施形態を、添付の図面を参照して本明細書中に詳細に開示したが、読者は、本発明がそれらの寸分違わぬ実施形態に限定されないこと、並びに添付の特許請求の範囲及びその均等物によって定義される本発明の範囲から逸脱することなく、当業者が種々の変更及び修正を行い得ることに留意すべきである。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

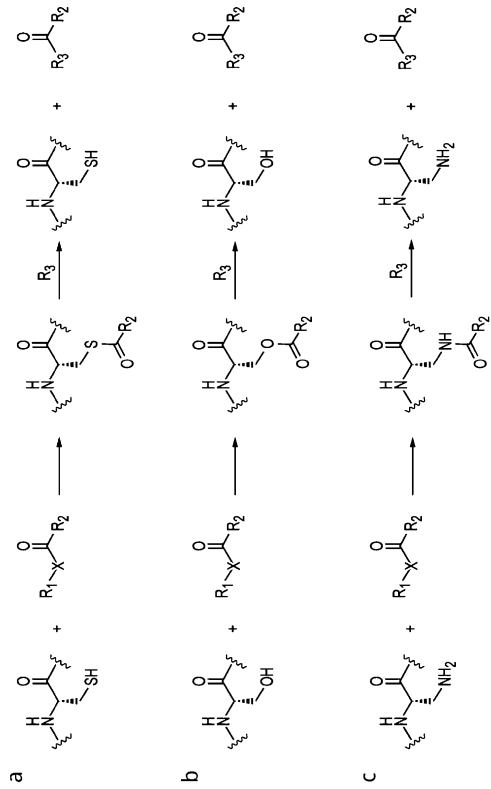


FIG. 1

【図 2】

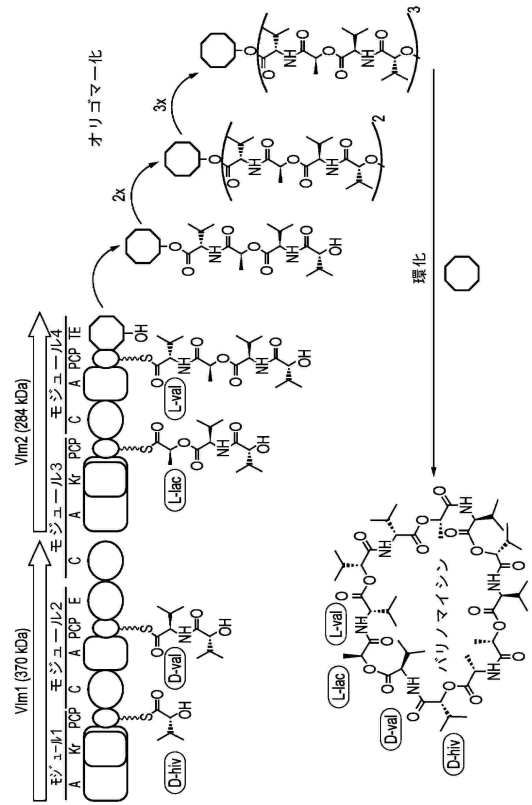
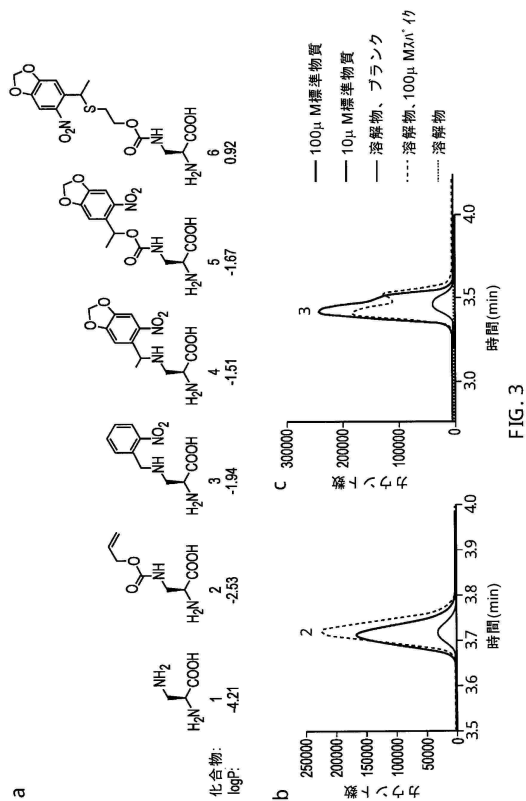
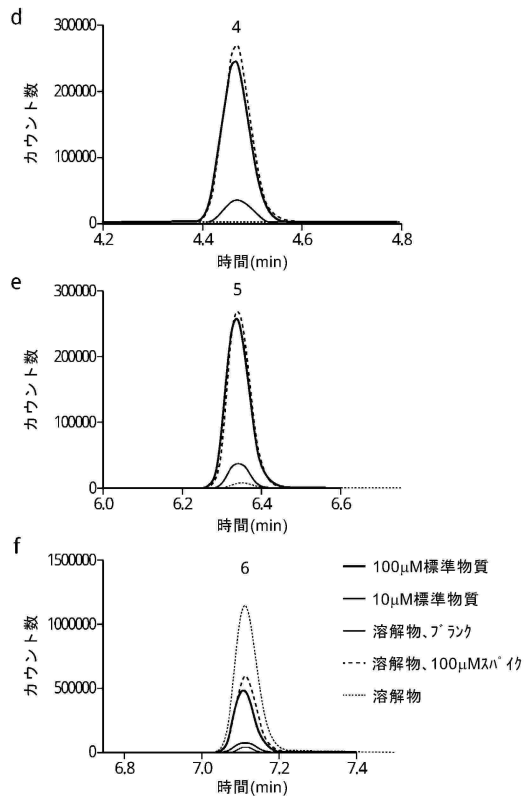


FIG. 2

【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



10

20

30

40

50

【図 6 - 1】

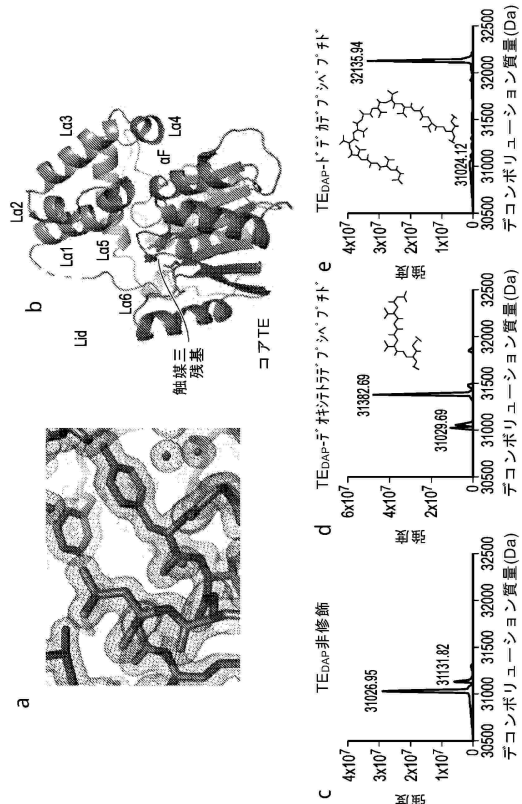


FIG. 6

【図 6 - 2】

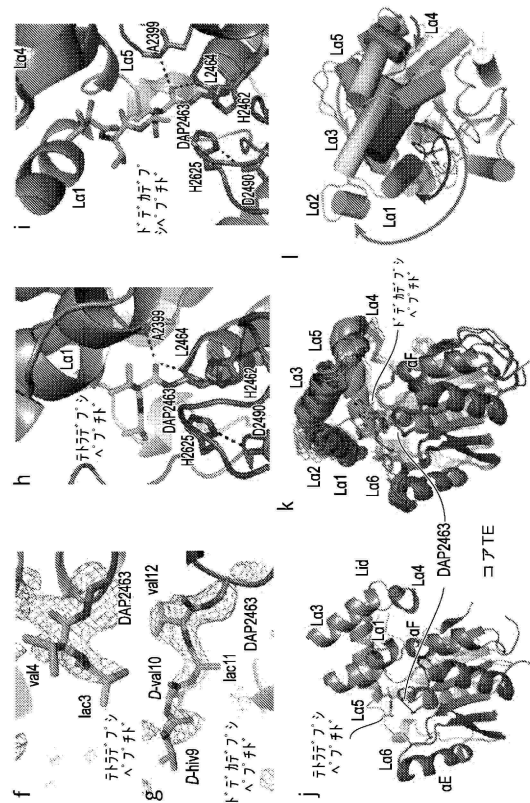


FIG. 6 (続)

【図 7】

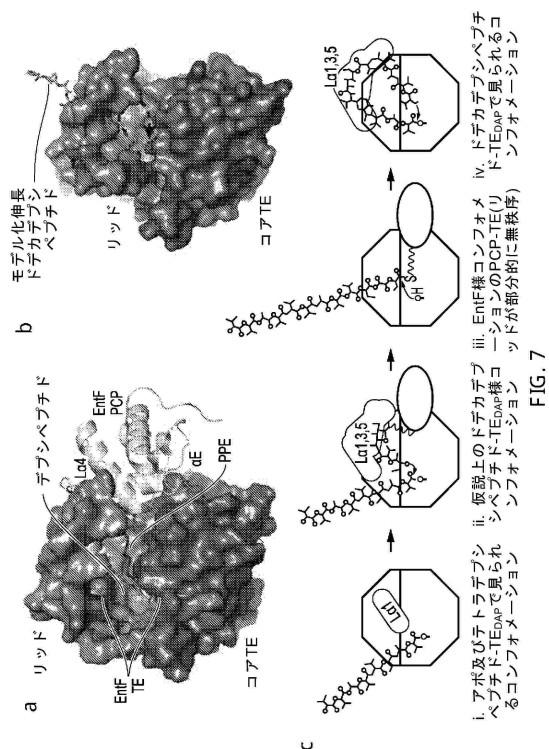


FIG. 7

【図 8 - 1】

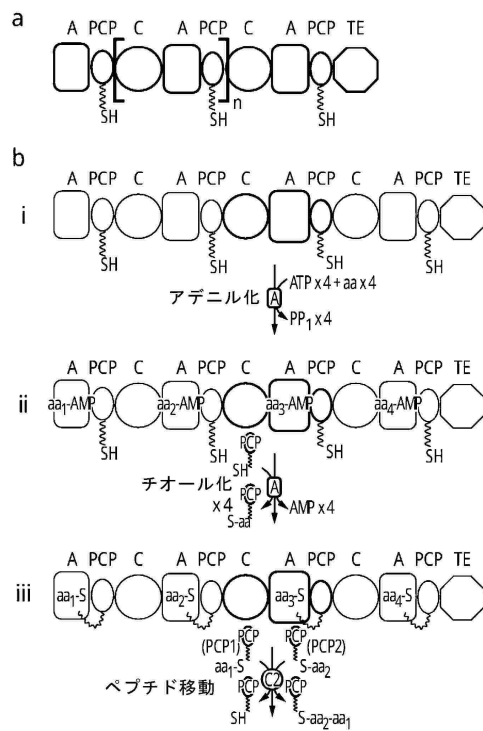
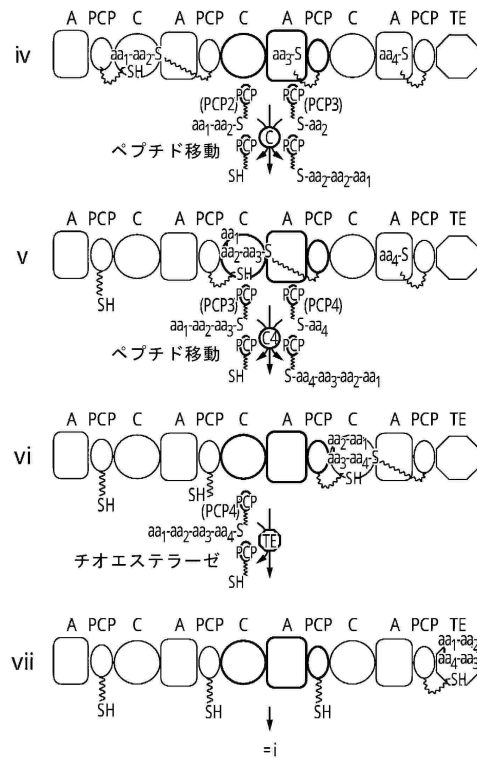
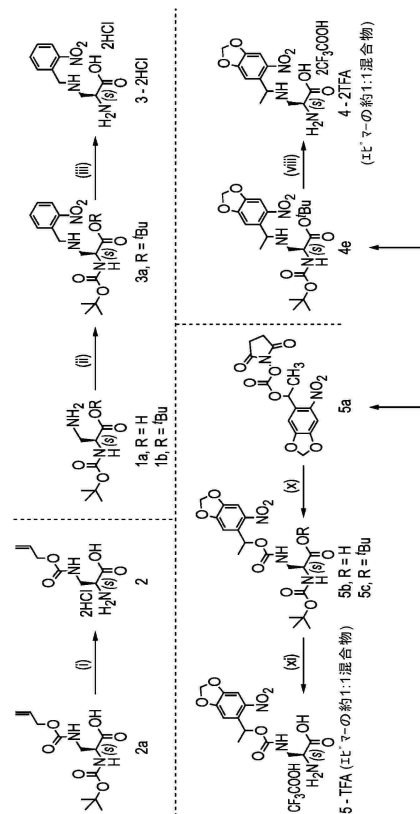


FIG. 8

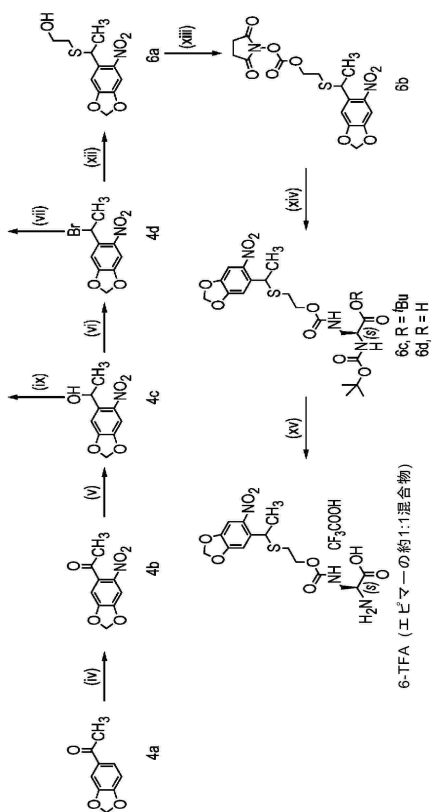
【図 8 - 2】



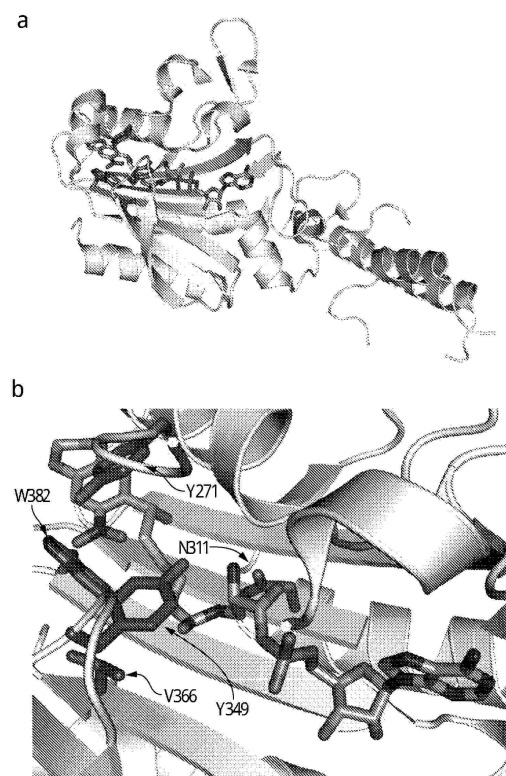
【図 9 - 1】



【図 9 - 2】



【図 10】



10

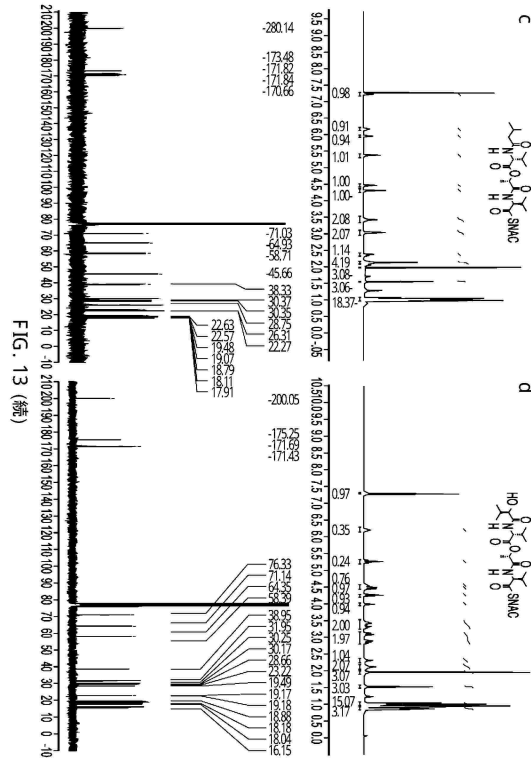
20

30

40

50

【図 13-2】



【図 14-1】

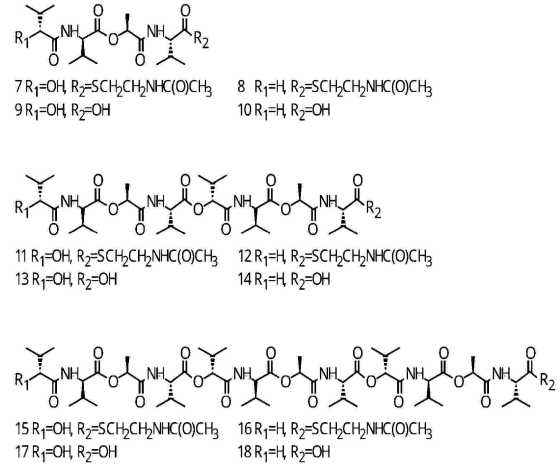


FIG. 14

【図 14-2】

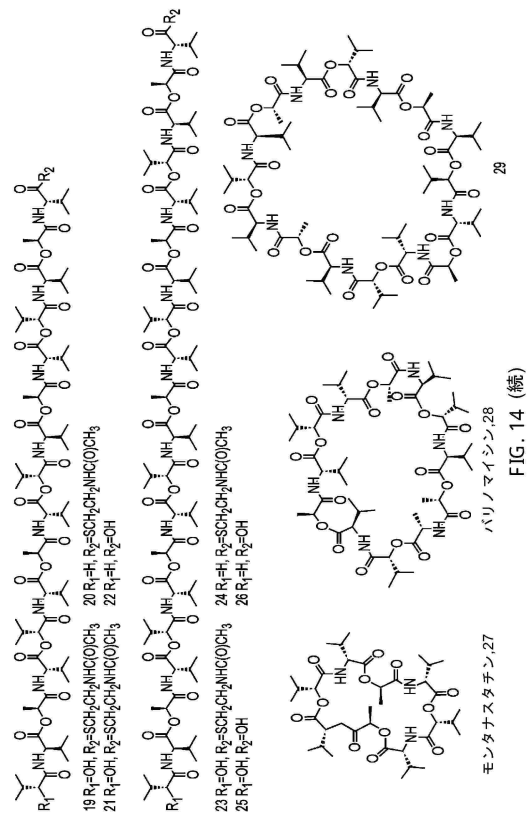


FIG. 14 (続)

【図 15】

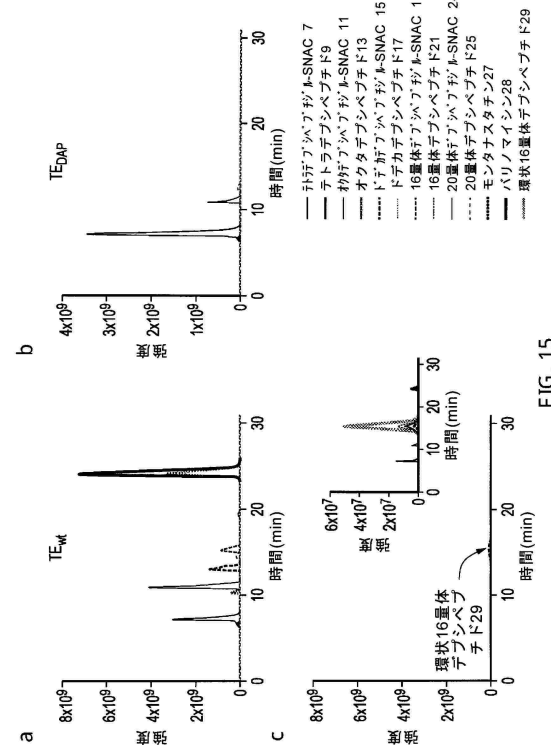


FIG. 15

10

20

30

40

50

【図 16】

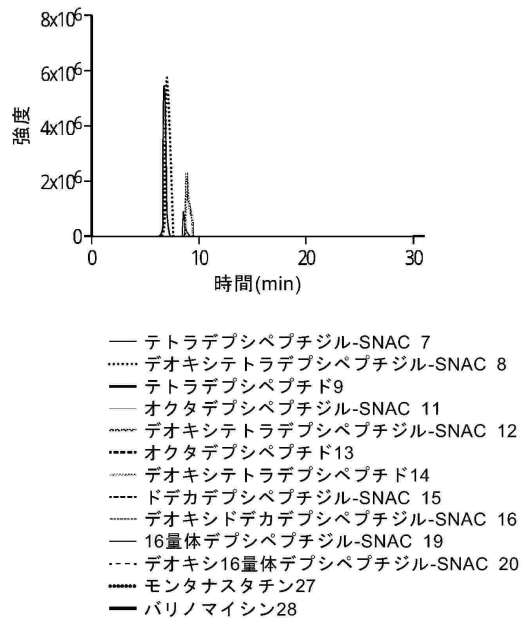


FIG. 16

【図 17】

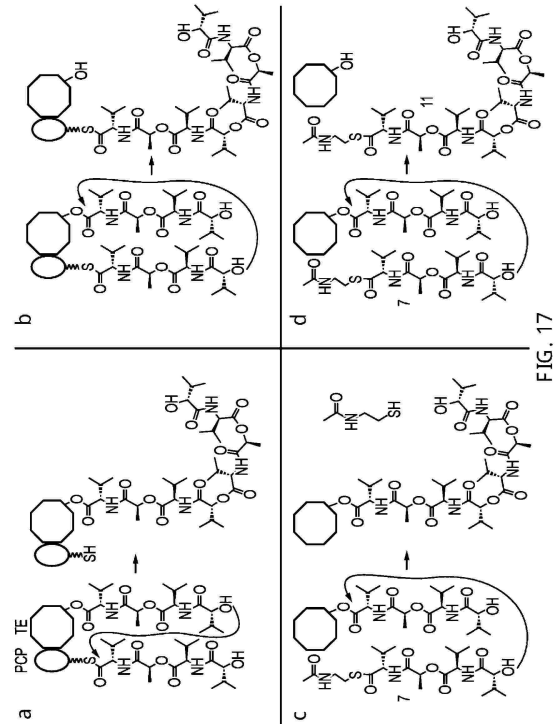


FIG. 17

【図 18】

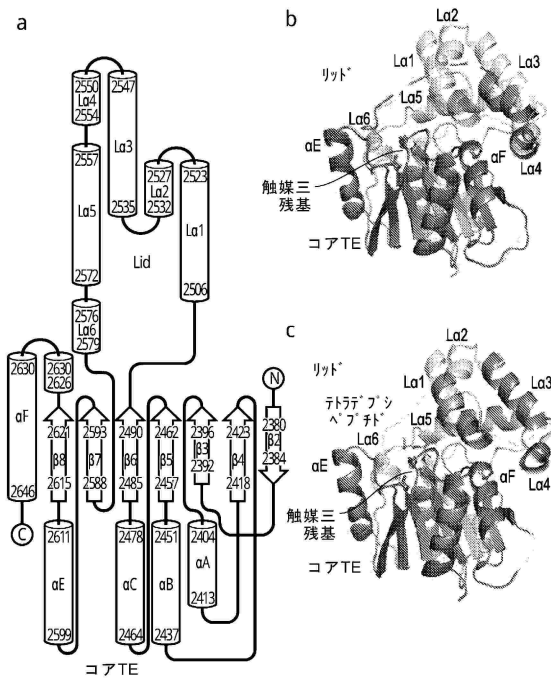


FIG. 18

【図 19】

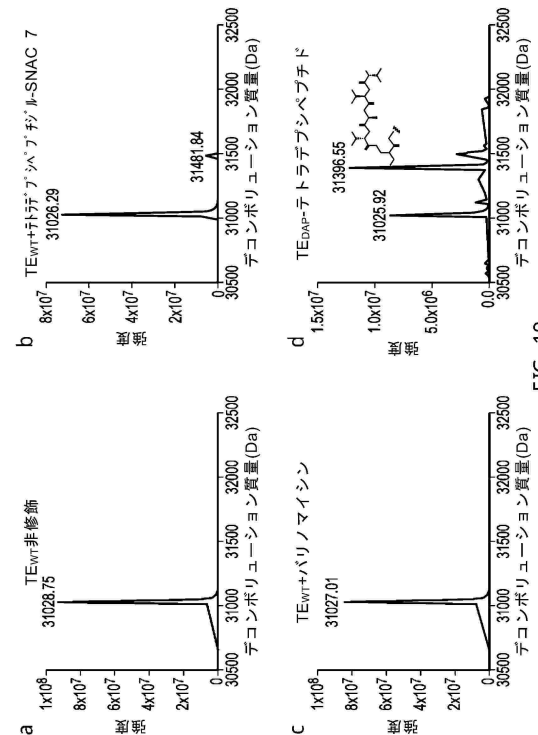


FIG. 19

10

20

30

40

50

【図 20】

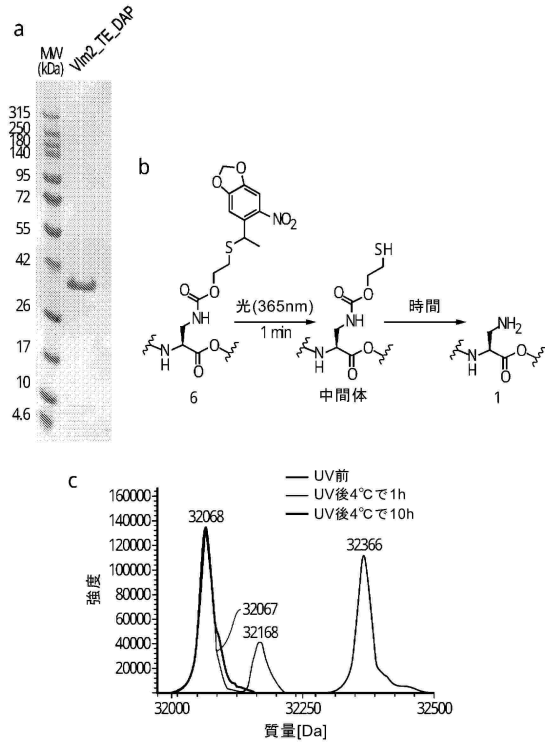


FIG. 20

【図 21】

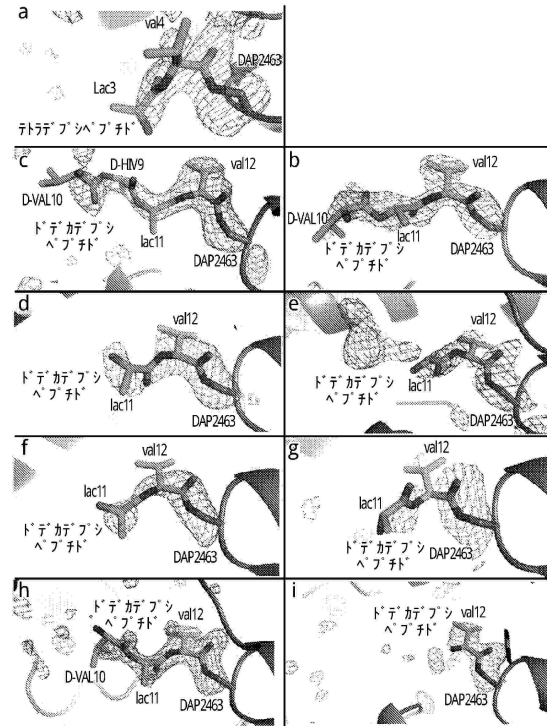


FIG. 21

【図 22】

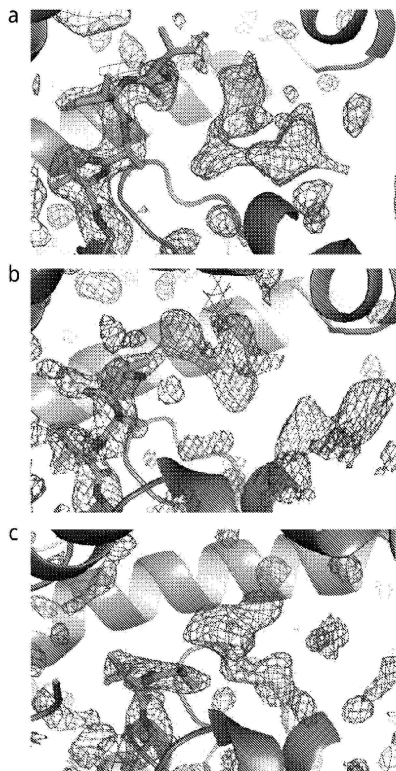


FIG. 22

【図 23 - 1】

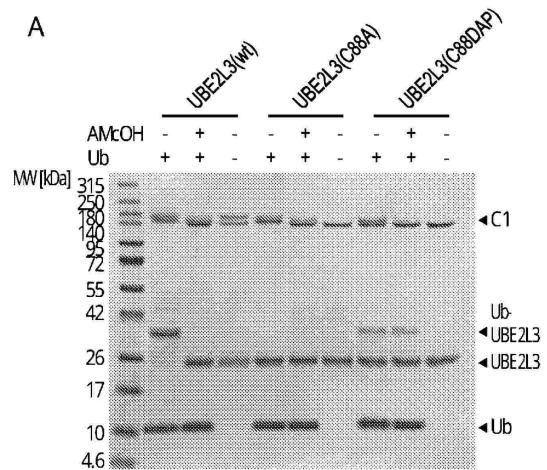


FIG. 23

10

20

30

40

50

【図 23 - 2】

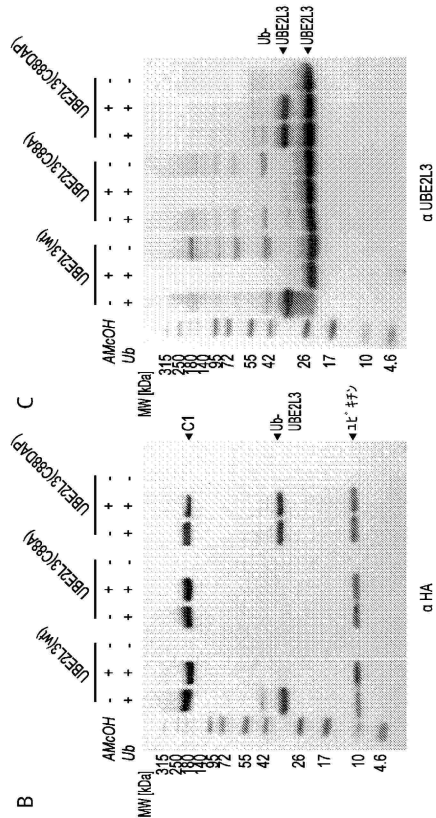


FIG. 23 (続)

【図 24】

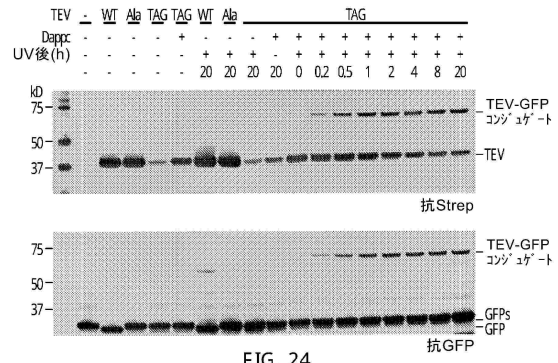


FIG. 24

【図 25】

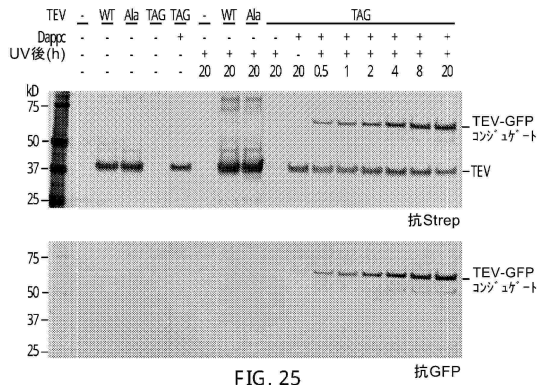


FIG. 25

【配列表】

0007633156000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)	C 1 2 Q	1/37	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	38/43	
A 6 1 P	39/04	(2006.01)	A 6 1 P	39/04	
C 0 7 C	271/22	(2006.01)	C 0 7 C	271/22	
C 0 7 C	229/26	(2006.01)	C 0 7 C	229/26	

弁理士 園元 修一

(74)復代理人 100192441

弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 チン ジェイソン

イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ バイ
オメディカル キャンパス フランシス クリック アベニュー エムアールシー ラボラトリー オブ
モレキュラー バイオロジー

(72)発明者 ユーグニン デゾ ニコラス

イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ バイ
オメディカル キャンパス フランシス クリック アベニュー エムアールシー ラボラトリー オブ
モレキュラー バイオロジー

(72)発明者 マヘシュ モハン

イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ バイ
オメディカル キャンパス フランシス クリック アベニュー エムアールシー ラボラトリー オブ
モレキュラー バイオロジー

(72)発明者 タン シャン

イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ バイ
オメディカル キャンパス フランシス クリック アベニュー エムアールシー ラボラトリー オブ
モレキュラー バイオロジー

(72)発明者 グエン ドゥイ ピー

イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ バイ
オメディカル キャンパス フランシス クリック アベニュー エムアールシー ラボラトリー オブ
モレキュラー バイオロジー

審査官 土橋 敬介

(56)参考文献 特表２０１５－５２９２０８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

C 0 7 C
C 0 7 D
C 0 7 K
C 1 2 N
C 1 2 P
C 1 2 Q
A 6 1 K
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)