

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6581509号
(P6581509)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 17/06 (2006.01) C 1 2 P 17/06

請求項の数 7 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2015-560302 (P2015-560302)	(73) 特許権者	515237164
(86) (22) 出願日	平成26年2月27日 (2014. 2. 27)		ティーウィノット テクノロジーズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-509842 (P2016-509842A)		アイルランド共和国, 2, ダブリン, スウィート 3 ロウアー ハッチ ストリート, ワン アールズフォート センター
(43) 公表日	平成28年4月4日 (2016. 4. 4)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/018944	(74) 代理人	100077838
(87) 国際公開番号	W02014/134281		弁理士 池田 憲保
(87) 国際公開日	平成26年9月4日 (2014. 9. 4)	(74) 代理人	100129023
審査請求日	平成29年1月13日 (2017. 1. 13)		弁理士 佐々木 敬
審判番号	不服2018-2200 (P2018-2200/J1)		
審判請求日	平成30年2月16日 (2018. 2. 16)		
(31) 優先権主張番号	61/770, 766		
(32) 優先日	平成25年2月28日 (2013. 2. 28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
早期審査対象出願		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 化合物を合成する化学工学プロセス及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

テトラヒドロカンナビノール酸 (THCA) 及び C B C A の比率を変化させて作製する方法であって、該方法が、

C B G A とテトラヒドロカンナビノール酸合成酵素 (THCA 合成酵素) とを反応混合物中で反応させる工程を含み、

前記テトラヒドロカンナビノール酸 (THCA) 及びカンナビクロメン酸 (CBCA) の比率を変化させて作製すると共に、前記反応混合物中の非水性溶媒の濃度を 5 % ~ 3 0 % (v / v) の間で調整して前記 THCA 合成酵素の触媒反応速度を修正し、且つ、

前記非水性溶媒がジメチルスルホキシド (DMSO) 溶媒を含んでいる、方法。

10

【請求項 2】

前記 THCA 合成酵素を固体支持体に固定化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 THCA 合成酵素が組み換え THCA 合成酵素であり、前記方法が組み換え THCA 合成酵素を作製することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記組み換え THCA 合成酵素を大規模に作製するステップは前記 THCA 合成酵素を過剰に発現させることを含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 THCA 合成酵素は酵母又は大腸菌である請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

pH 5.0 で、0.1 mg/ml の CBGA を含む反応混合物から得られる THCA の収率は少なくとも 18 g r a m / l i t e r である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記反応混合物の pH は 4.0 ~ 7.0 の範囲である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2013 年 2 月 28 日付けで出願された米国仮特許出願第 61/770,766 号（その内容が引用することにより本明細書の一部をなすものとする）の優先権の利益を主張するものである。

【0002】

本発明はカンナビノイドの生合成に関する。より具体的には本発明は、薬学的及び栄養学的用途に好適な *e x v i v o* でのミリグラム～グラム又はキログラム量のカンナビノイドの製造に植物中のカンナビノイドの合成に關与するプロテインキナーゼ合成酵素を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

カンナビノイドはアサ科の一年生植物であるカンナビス・サティバ (*Cannabis sativa* : アサ) に由来する化合物である。植物は約 60 種のカンナビノイドを含有する。最もよく知られている天然のカンナビノイドはテトラヒドロカンナビノール (THC) であり、緑内障、AIDS 消耗症、神経障害性疼痛を含む広範な病状の治療、多発性硬化症と関連する痙攣、線維筋痛及び化学療法による嘔気の治療に用いられている。さらに、THC はアレルギー、炎症、感染、癲癇、鬱病、片頭痛、双極性障害、不安障害、並びに薬物依存及び離脱症候群の治療において治療効果を示すことが報告されている。THC は制吐薬として特に効果的であり、オピオイド系鎮痛薬及び麻酔薬の使用、高活性抗レトロウイルス療法及び癌化学療法に付随する一般的な副作用である嘔吐を抑えるために投与される。

【0004】

カンナビノイドは薬学的及び栄養学的用途でますます使用されるようになってきている。かかる用途で使用されるカンナビノイド化合物は、ほぼ例外なく天然源、例えば植物組織から得られる。このため従来技術では、種々の溶媒抽出法を用いてカンナビス・サティバ (*C. sativa*) 植物のトリコームからカンナビノイド化合物を得ることが開示されている。かかる方法と関連する幾つかの欠点としては、低い収率、植物の栽培及び維持と関連する高いコスト、並びに植物抽出物の抽出及び精製と関連するコストが挙げられる。植物の安全性も、医薬品グレードのカンナビノイド化合物の製造コストを増大させる重要な考慮事項である。

【0005】

しかしながら、特に化学療法と関連する嘔気及び嘔吐、疼痛を治療するための、消耗症候群を患う AIDS 患者の食欲を刺激する薬剤としての、並びに緑内障の治療のためのカンナビノイド化合物の重要性の増大から、本発明者らはカンナビノイド及びカンナビノイド類似体の大規模製造のための *e x v i v o* 酵素により触媒される半合成プロトコルを開発することとなった。本発明の方法により、カンナビノイド及びそれらの類似体を減少したコストで合成することも可能である。

【発明の概要】

【0006】

上述の概要並びに以下の図面の簡単な説明及び詳細な説明は例示的かつ説明的なものであり、特許請求される本発明の更なる説明を提供することを意図する。他の目的、利点及び新規の特徴は以下の本発明の詳細な説明から当業者に容易に明らかである。

【0007】

10

20

30

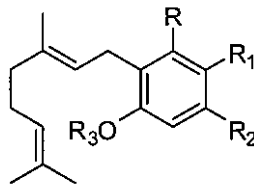
40

50

本発明の方法の態様の１つでは、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体を、

(a) 式 I による化合物：

【化 1】



式 I

を選択することと、

(b) 前記式 I の化合物を前記カンナビノイド又はカンナビノイド類似体へと変換する触媒としてカンナビノイド合成酵素を選択することと、

(c) 前記式 I の化合物と前記カンナビノイド合成酵素とを接触させることと、

(d) 工程 (b) の生成物を単離することと、

によって作製する方法が提供される。本合成戦略に従うと、単離された生成物を脱炭酸することができる。

【0008】

式 I において、R は -OH、ハロゲン、-SH 又は -NR_aR_b 基から選択される。置換基 R₁ 及び R₂ は各々独立して -H、-C(O)R_a、-OR_a、任意に置換された C₁ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルケニレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキニレン、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ アリール、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン及び (C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキニレンからなる群から選択される。

【0009】

幾つかの式 I の化合物については、R₁ 及び R₂ はそれらが結合する炭素原子とともに C₅ ~ C₁₀ 環式環を形成する。一態様では、C₅ ~ C₁₀ 環式環は酸素、硫黄又は窒素から選択される 1 つ又は複数のヘテロ原子を含む。式 I 中の R₃ は H、-C(O)R_a 及び C₁ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキルからなる群から選択され、R_a 及び R_b は各々独立して -H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁ ~ C₁₀) 直鎖若しくは分岐アルキル、又は C₃ ~ C₁₀ シクロアルキルである。しかしながら、テトラヒドロカンナビノール又はカンナビジオールの合成は本発明の方法では可能でない。

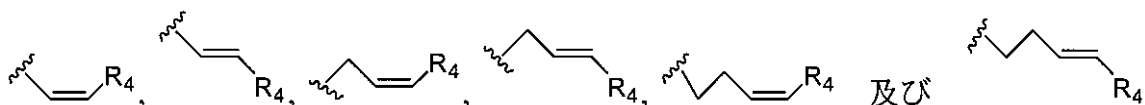
【0010】

この戦略に従って、カンナビノイド合成酵素がカンナビジオール酸合成酵素、テトラヒドロカンナビノール酸合成酵素又はカンナビクロメン酸合成酵素からなる群から選択される。

【0011】

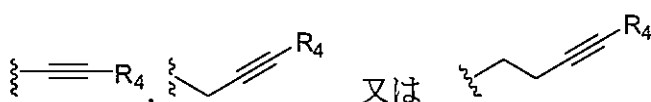
式 I 中の R₂ は直鎖アルキレン、

【化 2】



等の C₂ ~ C₁₀ アルケニレン、又は、

【化 3】



10

20

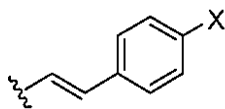
30

40

50

から選択される $C_2 \sim C_{10}$ 直鎖若しくは分岐アルキニレンであり得る。幾つかの式 I の化合物については、 R_2 は、

【化 4】



(式中、X は -OH、-SH 又は -NR_aR_b から選択される) である。

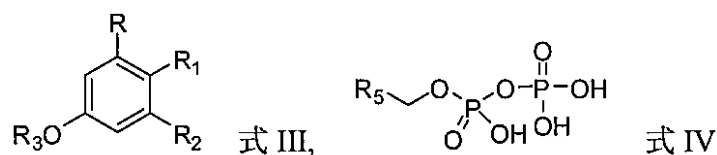
【0012】

本発明の方法の態様の 1 つでは、固体支持体へのカンナビノイド合成酵素の固定化を記載している。上記の方法に従って作製されるカンナビノイド及びカンナビノイド類似体は、単一エナンチオマーとして存在する。これらの化合物のエナンチオマー純度は少なくとも 95% ~ 少なくとも 99% である。

【0013】

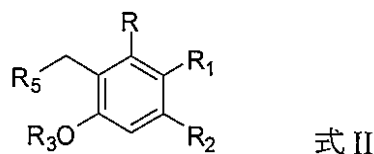
別の実施の形態によれば、式 I I によるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体を、
(a) 式 I I I による化合物と式 I V による化合物とを：

【化 5】



該式 I I I の化合物及び式 I V の化合物の反応を触媒する酵素の存在下で反応させ、式 I I の化合物：

【化 6】



を形成することと、

(b) 前記式 I I の化合物とカンナビノイド合成酵素とを接触させることと、

(c) 工程 (b) の生成物を単離することと、

(d) 任意に (c) の生成物を脱炭酸して、前記カンナビノイド又はカンナビノイド類似体を得ることと、

によって作製する方法が提供される。

【0014】

置換基 R、 R_1 、 R_2 及び R_3 は上記で規定される通りであり、 R_5 は直鎖又は分岐 ($C_1 \sim C_{10}$) アルキレン、直鎖又は分岐 ($C_2 \sim C_{10}$) アルケニレン、直鎖又は分岐 ($C_2 \sim C_{10}$) アルキニレン、-C(O)-($C_1 \sim C_{10}$) アルキレン、-C(O)-($C_2 \sim C_{10}$) アルケニレン及び -C(O)-($C_2 \sim C_{10}$) アルキニレンからなる群から選択される。さらに式 I I、式 I I I 及び式 I V の化合物については、任意のアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、アリールアルキレン又はシクロアルキル基が -OH、ハロゲン、-NR_bR_c、-C(O)R_a、-C(O)NR_bR_c、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、-CN、($C_1 \sim C_4$) アルコキシ、($C_1 \sim C_4$) ハロアルキル及び ($C_1 \sim C_4$) ヒドロキシアリルからなる群から選択される 1 つ又は複数の基で更に置換され、 R_a 、 R_b 及び R_c は各々独立して -H、-OH、-SH、-NH₂、($C_1 \sim C_{10}$) 直鎖若しくは分岐アルキル又は $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキルとすることができる。

【0015】

10

20

30

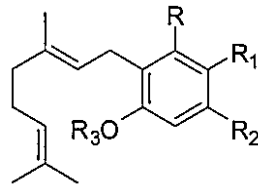
40

50

テトラヒドロカンナビノール、カンナビクロメン、若しくはテトラヒドロカンナビノール及びカンナビクロメンの両方、又はそれらの類似体を、

(a) 式 V による化合物：

【化 7】



式 V

10

を選択することと、

(b) 前記式 V の化合物とテトラヒドロカンナビノール酸合成酵素とを接触させることと、

(c) 式 V の化合物及びテトラヒドロカンナビノール酸合成酵素を含む反応混合物の少なくとも 1 つの特性を変更して、テトラヒドロカンナビノール、カンナビクロメン、若しくはテトラヒドロカンナビノール及びカンナビクロメンの両方、又はそれらの類似体を生成物として得ることと、

によって作製する方法も提供される。

【0016】

式 V の化合物については、R は -OH、ハロゲン、-SH 又は -NR_aR_b 基から選択され、R₁ 及び R₂ は各々独立して -H、-C(O)R_a、-OR_a、任意に置換された C₁ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルケニレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキニレン、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ アリール、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン及び (C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキニレンからなる群から選択され、R₃ は H、-C(O)R_a 又は C₁ ~ C₁₀ 直鎖若しくは分岐アルキルから選択される。幾つかの化合物については、R₁ 及び R₂ はそれらが結合する炭素原子とともに C₅ ~ C₁₀ 環式環を形成し、置換基 R_a 及び R_b は各々独立して -H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁ ~ C₁₀) 直鎖若しくは分岐アルキル又は C₃ ~ C₁₀ シクロアルキルである。

20

30

【0017】

一態様では、反応混合物の少なくとも 1 つの特性の変更は反応混合物の pH を変化させること、例えば上記の方法によって作製されるテトラヒドロカンナビノールとカンナビクロームとの比率を制御するために pH を約 4.0 ~ 約 8.0 単位の範囲に変化させることを含む。

【0018】

本技術はカンナビノイド又はカンナビノイド類似体を作製するシステムも提供する。かかるシステムは、培地及び複数の細胞を収容する発酵装置であって、細胞がカンナビノイド合成酵素を産生及び分泌するように構成される、発酵装置と、反応物を含有するバイオリアクターであって、反応物がカンナビノイド合成酵素と相互作用して第 1 のカンナビノイド及び第 2 のカンナビノイドを形成するように構成される、バイオリアクターと、バイオリアクターの条件を制御するように構成される制御機構とを備える。後者の制御機構は、第 2 のカンナビノイドの形成量に対する第 1 のカンナビノイドの形成量に影響を与えるために使用される。

40

【0019】

システムは、培地から複数の細胞を少なくとも部分的に分離し、分離後にカンナビノイド合成酵素を含有する培地をバイオリアクターに導入するように構成されるフィルターを更に備えていてもよい。一実施の形態では、複数の細胞によって発現される酵素には、酵素をバイオリアクター内のニッケル支持体に結合させるタグが含まれる。任意の式 I の化

50

合物又はカンナビゲロール酸を、酵素であるテトラヒドロカンナビノール酸 (tetrahydrocannabinolic acid) 合成酵素の基質とすることができる。バイオリクター内の条件に応じて、テトラヒドロカンナビノール酸又はカンナビクロメン酸が第1のカンナビノイドとして作製され、第2のカンナビノイドがテトラヒドロカンナビノール酸及びカンナビクロメン酸のもう一方である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】例示的な実施形態によるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体を作製するシステムの概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

定義

本明細書で使用される場合、他に指定のない限り、数量を特定していない単数形 (the singular forms "a," "an," and "the") は複数の指示対象を含む。このため例えば、「細胞 (a cell)」への言及は複数の細胞を含み、「分子 (a molecule)」への言及は1つ又は複数の分子への言及である。

【0022】

本明細書で使用される場合、「約」は当業者に理解され、それが使用される文脈に応じて或る程度異なる。当業者に明らかでない用語が使用される場合、それが使用される文脈から判断すると、「約」は特定の用語の最大で $\pm 10\%$ を意味する。

【0023】

「アルキル」という用語は、指定数の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の飽和炭化水素を指す。例えば、($C_1 \sim C_{10}$) アルキルは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、及びネオヘキシル等を含むことを意味するが、これらに限定されない。アルキル基は非置換であっても、又は本明細書で下記の1つ若しくは複数の置換基で任意に置換されていてもよい。

【0024】

「アルケニル」という用語は、指定数の炭素原子及び少なくとも1つの二重結合を有する直鎖又は分岐鎖の不飽和炭化水素を指す。($C_2 \sim C_{10}$) アルケニル基の例としては、エチレン、プロピレン、1-ブチレン、2-ブチレン、イソブチレン、sec-ブチレン、1-ペンテン、2-ペンテン、イソペンテン、1-ヘキセン、2-ヘキセン、3-ヘキセン、イソヘキセン、1-ヘプテン、2-ヘプテン、3-ヘプテン、イソヘプテン、1-オクテン、2-オクテン、3-オクテン、4-オクテン、及びイソオクテンが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基は非置換であっても、又は本明細書で下記の1つ若しくは複数の置換基で任意に置換されていてもよい。

【0025】

「アルキニル」という用語は、指定数の炭素原子及び少なくとも1つの三重結合を有する直鎖又は分岐鎖の不飽和炭化水素を指す。($C_2 \sim C_{10}$) アルキニル基の例としては、アセチレン、プロピン、1-ブチン、2-ブチン、1-ペンチン、2-ペンチン、1-ヘキシン、2-ヘキシン、3-ヘキシン、1-ヘプチン、2-ヘプチン、3-ヘプチン、1-オクチン、2-オクチン、3-オクチン及び4-オクチンが挙げられるが、これらに限定されない。アルキニル基は非置換であっても、又は本明細書で下記の1つ若しくは複数の置換基で任意に置換されていてもよい。

【0026】

「アルコキシ」という用語は指定数の炭素原子を有する-O-アルキル基を指す。例えば、($C_1 \sim C_6$) アルコキシ基としては、-O-メチル、-O-エチル、-O-プロピル、-O-イソプロピル、-O-ブチル、-O-sec-ブチル、-O-tert-ブチル、-O-ペンチル、-O-イソペンチル、-O-ネオペンチル、-O-ヘキシル、-O-イソヘキシル、及び-O-ネオヘキシルが挙げられる。

【 0 0 2 7 】

「アリール」という用語は 3 員 ~ 1 4 員の単環式、二環式、三環式又は多環式の芳香族炭化水素環系を指す。アリール基の例としては、ナフチル、ピレニル及びアントラシルが挙げられる。アリール基は非置換であっても、又は本明細書で下記の 1 つ若しくは複数の置換基で任意に置換されていてもよい。

【 0 0 2 8 】

「アルキレン」、「アルケニレン」及び「アリーレン」という用語は、単独で又は別の置換基の一部として、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ により例示されるように、それぞれアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、又はヘテロアリール基から誘導される二価ラジカルを意味する。アルキレン、アルケニル又はアリール連結基については、連結基の配向を意味するものではない。

10

【 0 0 2 9 】

「ハロゲン」及び「ハロ」という用語は $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 又は $-I$ を指す。

【 0 0 3 0 】

「ヘテロ原子」という用語は酸素 (O)、窒素 (N)、及び硫黄 (S) を含むことを意味する。

【 0 0 3 1 】

「ヒドロキシル」又は「ヒドロキシ」は $-OH$ 基を指す。

【 0 0 3 2 】

「ヒドロキシアルキル」という用語は、指定数の炭素原子を有し、アルキル基の水素原子の 1 つ又は複数が $-OH$ 基で置き換えられたアルキル基を指す。ヒドロキシアルキル基の例としては、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、及びそれらの分岐型が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 3 】

「シクロアルキル」という用語は、単環式、二環式、三環式又は多環式の 3 員 ~ 1 4 員の飽和した、不飽和の又は芳香族の環系を指す。複素環は任意のヘテロ原子又は炭素原子を介して付着していてもよい。シクロアルキルとしては、上記で規定されるアリール及びヘテロアリール (heteroaryls) が挙げられる。シクロアルキル (cycloalkyl) の代表例としては、シクロエチル、シクロプロピル、シクロイソプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロプロペン、シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、フェニル、ナフチル、アントラシル、ベンゾフラニル、及びベンゾチオフェニルが挙げられるが、これらに限定されない。シクロアルキル基は非置換であっても、又は本明細書で下記の 1 つ若しくは複数の置換基で任意に置換されていてもよい。

30

【 0 0 3 4 】

「ニトリル」又は「シアノ」という用語はほぼ同じ意味で使用する事ができ、ヘテロアリール環、アリール環及びヘテロシクロアルキル環の炭素原子に結合した $-CN$ 基を指す。

【 0 0 3 5 】

「アミン」又は「アミノ」という用語は $-NR_cR_d$ 基 (ここで、 R_c 及び R_d は各々独立して水素、 $(C_1 \sim C_8)$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 \sim C_8)$ ハロアルキル、及び $(C_1 \sim C_6)$ ヒドロキシアルキル基を表す) を指す。

40

【 0 0 3 6 】

「アルキルアリール」という用語は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル鎖の少なくとも 1 つの水素原子が、本明細書で下記の 1 つ又は複数の置換基で任意に置換され得るアリール原子で置き換えられた $C_1 \sim C_8$ アルキル基を指す。アルキルアリール基の例としては、メチルフェニル基、エチルナフチル基、プロピルフェニル基、及びブチルフェニル基が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【 0 0 3 7 】

「アリールアルキレン」は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン基の1つ又は複数の水素原子が ($C_3 \sim C_{14}$) アリール基で置き換えられた二価アルキレンを指す。($C_3 \sim C_{14}$) アリール - ($C_1 \sim C_{10}$) アルキレン基の例としては、1 - フェニルブチレン、フェニル - 2 - ブチレン、1 - フェニル - 2 - メチルプロピレン、フェニルメチレン、フェニルプロピレン、及びナフチルエチレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

「アリールアルケニレン」は、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン基の1つ又は複数の水素原子が ($C_3 \sim C_{14}$) アリール基で置き換えられた二価アルケニレンを指す。

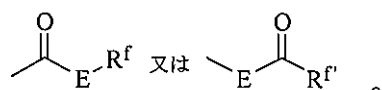
【 0 0 3 9 】

「アリールアルキニレン」という用語は、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン基の1つ又は複数の水素原子が ($C_3 \sim C_{14}$) アリール基で置き換えられた二価アルキニレンを指す。

【 0 0 4 0 】

「カルボキシル」及び「カルボキシレート」という用語は、下記一般式によって表すことができる部分を含む：

【 化 8 】



【 0 0 4 1 】

式中の E は結合又は O であり、 R^f は個別に H、アルキル、アルケニル、アリール又は薬学的に許容可能な塩である。E が O であり、 R^f が上記で規定される通りである場合、この部分は本明細書でカルボキシル基と称され、特に R^f が水素である場合、式は「カルボン酸」を表す。概して、明示的に示される酸素が硫黄で置き換えられる場合、式は「チオカルボニル」基を表す。

【 0 0 4 2 】

他に指定のない限り、「立体異性体」は、化合物の他の立体異性体を実質的に含まないその化合物の1つの立体異性体を意味する。このため、1つの不斉中心を有する立体異性体的に純粋な化合物は、化合物の反対のエナンチオマーを実質的に含まない。2つの不斉中心を有する立体異性体的に純粋な化合物は、化合物の他のジアステレオマーを実質的に含まない。典型的な立体異性体的に純粋な化合物は、約 80 重量% 超の化合物の1つの立体異性体及び約 20 重量% 未満の化合物の他の立体異性体、例えば約 90 重量% 超の化合物の1つの立体異性体及び約 10 重量% 未満の化合物の他の立体異性体、又は約 95 重量% 超の化合物の1つの立体異性体及び約 5 重量% 未満の化合物の他の立体異性体、又は約 97 重量% 超の化合物の1つの立体異性体及び約 3 重量% 未満の化合物の他の立体異性体を含む。

【 0 0 4 3 】

示される構造とその構造に与えられる名称とに食い違いがある場合、示される構造を優先する。さらに、構造又は構造の一部の立体化学が例えば太字又は破線で示されない場合、構造又は構造の一部はその全立体異性体を包含すると解釈される。

【 0 0 4 4 】

本発明は、無細胞環境でのカンナビノイド又はカンナビノイド類似体の酵素触媒合成の方法に焦点を合わせている。カンナビノイド及びカンナビノイド類似体の *ex vivo* 製造のための装置も記載される。「類似体」という用語は、天然のカンナビノイドに構造的に関連するが、化学的及び生物学的特性が天然のカンナビノイドとは異なり得る化合物を指す。本文脈において、類似体 (単数又は複数) は天然のカンナビノイドの1つ又は複数の不要な副作用を示さない可能性がある化合物を指す。類似体は、天然のカンナビノイドの化学的、生物学的又は半合成変換により天然のカンナビノイドから誘導された化合物も指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

本発明に含まれるカンナビノイド化合物の例は、限定されるものではないが、カンナビノール、カンナビジオール、 9 - テトラヒドロカンナビノール、 8 - テトラヒドロカンナビノール、 11 - ヒドロキシ - テトラヒドロカンナビノール、 11 - ヒドロキシ - 9 - テトラヒドロカンナビノール、レボナントラド - ル、 11 - テトラヒドロカンナビノール、テトラヒドロカンナビバリン、ドロナビノール、アマンダミド (amandamide) 及びナビロン、並びに基本的なカンナビノイド構造を有し、合成的に修飾されてカンナビノイド類似体をもたらす天然又は合成分子である。

【 0 0 4 6 】

本技術は、カンナビノイドの生合成に関与する酵素の大規模クローニング及び発現、並びにカンナビノイド及びカンナビノイド類似体の製造への真核生物の発現系の使用にも関する。カンナビノイド合成酵素のクローニング及び発現に適した真核細胞の例としては、限定されるものではないが、大腸菌 (E coli) 、酵母及びバキュロウイルス宿主が挙げられる。本技術の実施形態では、 p i n k ピキア酵母発現系を用いたテトラヒドロカンナビノール酸合成酵素 (T H C A 合成酵素) 、カンナビクロメン酸合成酵素 (C B C A 合成酵素) 及びカンナビジオール酸合成酵素 (C B D A 合成酵素) を含む幾つかのカンナビノイド合成酵素の大規模製造の方法が開示される。したがって、これらの酵素の大規模製造は、 T H C A 合成酵素、 C B C A 合成酵素又は C B D A 合成酵素の遺伝子を含む D N A 構築物で酵母を形質転換し、形質転換酵母細胞を機能的に活性な酵素の発現を促進するのに好適な条件下で培養することによって行うことができる。

【 0 0 4 7 】

T H C A 合成酵素及び C B D A 合成酵素の遺伝子の配列を公的に利用可能なデータベースから得て、それらのタンパク質コード領域を変更してピキア・パストリス (Pichia Pastoris) 酵母細胞におけるタンパク質発現を最適化した。Invitrogenの G e n e A r t (登録商標) プログラムを用いてコドン最適化を行った。

【 0 0 4 8 】

さらに両方の遺伝子を、酵母 分泌配列及び発現タンパク質に H i s タグを組み入れるためのコドンを含むように修飾した。酵母 分泌配列は遺伝子の 5 ' 末端に挿入され、発現タンパク質の細胞外分泌に必要とされる。 H i s タグ用のコドンは遺伝子の 3 ' 末端に存在し、親和性クロマトグラフィーによる発現タンパク質の精製を容易にするために導入される。

【 0 0 4 9 】

これらのキメラ配列、 - C B D A 合成酵素及び - T H C A 合成酵素を p P i n k - H C ベクター (Invitrogen (登録商標)) に挿入し、 T o p 1 0 F 形質転換大腸菌細胞を得るために使用し、この細胞を今後の使用のために寒天スタブとして保管した。酵母細胞の形質転換の前に対象のカンナビノイド合成酵素遺伝子 (G O I) を含有するベクターを、形質転換大腸菌細胞を含有する寒天スタブから単離し、 P m e I 又は S p e I 制限酵素を用いて線状化した。線状化プラスミドを、 P i c h i a P i n k (商標) 酵母発現系 (Invitrogen (登録商標)) を用いてピキア・パストリス p e p B 欠失突然変異細胞に電気穿孔した。制限酵素 P m e I を用いた線状化では挿入断片がピキアゲノムの A O X 1 プロモーター領域に指向され、制限酵素 S p e I では挿入断片が T R P 遺伝子に指向される。

【 0 0 5 0 】

形質転換酵母細胞をアデニン欠乏選択的プレートで増殖させ、色によるスクリーンを使用して陽性形質転換体を特定した。このスクリーニング法に従うと、赤色/ピンク色のコロニーは対象の遺伝子を保有しない形質転換体、及びピキア・パストリスのゲノムに組み込まれた限定数の対象の遺伝子のコピーを保有する形質転換体を示す。一方で白色コロニーは、複数の対象の遺伝子のコピーを有する形質転換体を示す。通例、多量の組み換えタンパク質、例えば培養物 1 L 当たり約 1 . 0 g ~ 約 2 . 0 g のタンパク質を得るためには、 6 コピー ~ 1 0 コピーの対象の遺伝子を有する細胞が所望される。メタノールを形質転

10

20

30

40

50

換酵母細胞に添加することによるTHCA合成酵素又はCBDA合成酵素の誘導時の基質カンナビゲロール酸(CBGA)からTHCA又はCBDA生成物への変換を定量化する酵素アッセイを用いて、20%超の基質から生成物への変換をもたらす酵母細胞の白色コロニーを特定した。

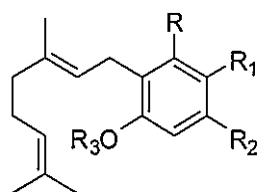
【0051】

したがって、THCA合成酵素遺伝子又はCBDA合成酵素遺伝子を保有する酵母細胞の個々の白色コロニーを、BMGY培地を用いてフラスコ内で別個に培養した後、BMMY培地中での増殖により誘導し、下記に更に記載されるようにTHCA合成酵素又はCBDA合成酵素の発現を誘導した。簡潔に述べると、各々の培養物中の酵素を含有する培地を細胞から分離し、既知の量の基質CBGAを各々の培養フラスコの培地に添加した。インキュベーションの後、各々の培養フラスコを分析して、CBGAから生成物への変換率を定量化した。20%超の変換を示す形質転換体の培養物を、本発明の方法に従うカンナビノイド又はカンナビノイド類似体の商業的合成に用いる。

【0052】

上記のPitchiaPink(商標)酵母発現系を用いて得られるカンナビノイド合成酵素、THCA合成酵素及びCBDA合成酵素を、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体の製造に使用することができる。一実施形態では、式Iの化合物及びカンナビノイド合成酵素を、式Iの化合物をカンナビノイド又はカンナビノイド類似体へと変換する触媒として選択することによってカンナビノイド又はカンナビノイド類似体を作製する方法が提供される。

【化9】



式I

【0053】

式Iにおいて、Rはヒドロキシル(-OH)、ハロゲン、チオール(-SH)又は-NR_aR_b基から選択することができる。置換基R₁及びR₂は各々独立して-H、-C(O)R_a、-OR_a、任意に置換されたC₁~C₁₀直鎖又は分岐アルキレン、任意に置換されたC₂~C₁₀直鎖又は分岐アルケニレン、任意に置換されたC₂~C₁₀直鎖又は分岐アルキニレン、任意に置換されたC₃~C₁₀アリール、任意に置換されたC₃~C₁₀シクロアルキル、(C₃~C₁₀)アリール-(C₁~C₁₀)アルキレン、(C₃~C₁₀)アリール-(C₂~C₁₀)アルケニレン及び(C₃~C₁₀)アリール-(C₁~C₁₀)アルキニレンからなる群から選択される。代替的には、R₁及びR₂はそれらが結合する炭素原子とともにC₅~C₁₀環式環を形成する。式Iによる化合物については、R₃はH、-C(O)R_a及びC₁~C₁₀直鎖又は分岐アルキルからなる群から選択され、R_a及びR_bは各々独立して-H、-OH、(C₁~C₁₀)直鎖若しくは分岐アルキル、-SH、-NH₂又はC₃~C₁₀シクロアルキルである。

【0054】

式Iの化合物とカンナビノイド合成酵素とを接触させることによって得られるカンナビノイド若しくはカンナビノイド類似体は、治療薬として単離、精製及び使用することができる。又はカンナビノイド若しくはカンナビノイド(cannabinoid)類似体を任意の脱炭酸工程に供して、例えばカンナビクロメン酸(CBCA)をカンナビクロメン(CBC)に変換した後、カンナビクロメン(CBC)を医薬品又は栄養剤として使用することができる。

【0055】

幾つかの実施形態では、カンナビノイド合成酵素はカンナビジオール酸合成酵素である。本技術の他の態様については、カンナビノイド合成酵素はテトラヒドロカンナビノール

酸合成酵素又はカンナビクロメン酸合成酵素である。幾つかの式 I の化合物については、 R_1 及び R_2 はそれらが結合する環炭素原子とともに $C_5 \sim C_{10}$ 環式環を形成する。このような式 I の化合物については、環の 1 つ又は複数の炭素原子が酸素、硫黄又は窒素から選択されるヘテロ原子で置換されていてもよい。

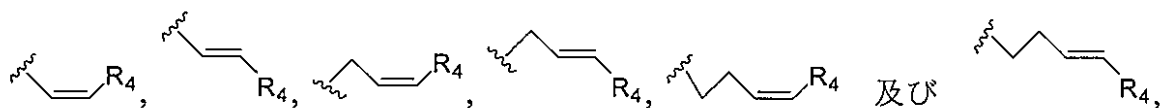
【0056】

式 I による化合物については、 R_2 は直鎖アルキレン又は分岐アルキレンであり得る。直鎖アルキレンの例としては、 CH_3 、 C_2H_5 、 C_3H_7 、 C_4H_9 、 C_5H_{11} 、 C_6H_{13} 、 C_7H_{15} 及び C_8H_{17} が挙げられるが、これらに限定されない。分岐アルキレンの例は、イソプロピル基、sec-ブチル基、イソブチル基、ネオペンチル基、2-メチルヘキシル基、又は 2,3-ジメチルヘキシル基から選択される基である。幾つかの実施形態では、 R_2 は任意に置換された直鎖又は分岐アルキレンとすることができ、ここで 1 つ又は複数の水素原子が、限定されるものではないが塩素、フッ素、臭素、ニトロ、アミノ、ヒドロキシル、フェニル、又はベンジル基から選択される基で置き換えられている。

【0057】

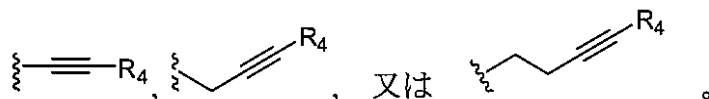
幾つかの式 I の化合物については、 R_2 は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレンであり、

【化 10】



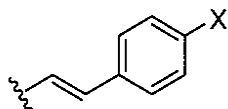
からなる群から選択され、 R_4 は上記の直鎖又は分岐アルキレンである。 R_2 が $C_2 \sim C_{10}$ 直鎖又は分岐アルケニレンである場合、 R_2 は、

【化 11】



であり得る。代替的には、式 I 中の R_2 は、

【化 12】



であり、置換基 X は $-OH$ 、 $-SH$ 又は $-NR_aR_b$ から選択される基であり、基 R_a 及び R_b は上記で規定される通りである。

【0058】

天然のカンナビノイドの多くが植物においてそれらのカルボン酸誘導体として産生される。しかしながら、それらの精神刺激活性はカンナビノイド酸を含有する植物組織に熱を加えること、又は植物材料を使用前に乾燥させることで起こる脱炭酸により増強される。本発明の方法を用いて合成されるカンナビノイド及びカンナビノイド類似体は、 R_1 置換基としてカルボン酸 ($-COOH$) 基を有していてもよく、かかる化合物を医薬品又は栄養剤として使用する前に任意の脱炭酸工程に供してもよい。かかるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体の例は、 R が $-OH$ であり、 R_1 が $-COOH$ であり、 R_2 が C_5H_{11} であり、 R_3 が $-H$ である式 I の種とカンナビノイド合成酵素とを接触させることによって得られる化合物である。

【0059】

カンナビノイド又はカンナビノイド類似体の合成、単離及び精製は、カンナビノイド合成酵素を固体支持体に固定化すること、又は合成酵素をリボソームに封入することで改善することができる。合成の一態様では、酵素を固体支持体に固定化する。かかる固定化は

固定化酵素の再循環及び再利用を可能にし、医薬品グレードのカンナビノイド又はカンナビノイド類似体の製造と関連するコストを顕著に低減するため有利である。酵素の固定化は酵素触媒の容易な使用及び回収、所望の生成物の容易な精製、最終生成物のエナンチオマー過剰率 (e e) の維持、並びに生成物の収率の全体的な改善も可能にする。通例、特許請求される方法によるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体のエナンチオマー純度は約 90 % e e ~ 約 100 % e e であり、例えば本発明の方法を用いて作製されるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体は、約 91 % e e、約 92 % e e、約 93 % e e、約 94 % e e、約 95 % e e、約 96 % e e、約 97 % e e、約 98 % e e 及び約 99 % e e のエナンチオマー純度を有し得る。

【0060】

通例、固定化される酵素は固体支持体に吸収させる、支持体に吸着させる、支持体に共有結合する、又はイオン相互作用により固体支持体に固定化することができる。一実施形態では、カンナビノイド合成酵素を固体支持体に共有結合させる。酵素を固体支持体に連結するのに好適な戦略は生化学分野で既知であり、適切に官能化された支持体とアミノ酸基の側鎖との共有結合、又は支持体を酵素から分離するための適切に官能化されたリンカー若しくはスペーサーを用いた共有結合によるものが含まれる。「リンカー」という用語は、支持体を酵素から分離する任意の基を指す。したがって、リンカーは共有結合により支持体の表面上の基の一端に繋がれ、もう一端の酵素に付着する基である。例示的なリンカーとしては、エチレングリコールの (C₁ ~ C₁₀) アルキレンリンカーポリマー、例えば - (OCH₂ - CH₂)_n - O - 基 (ここで、n は 0 ~ 10 の整数である)、- (C₁ ~ C₁₀) アルキレン - NH - 、- (C₁ ~ C₁₀) アルキレンシロキシ、又は - (C₁ ~ C₁₀) アルキレン - C (O) - が挙げられる。

【0061】

酵素の固定化に好適な支持体としては、限定されるものではないが、アンバーライト (Amberlite) 樹脂、デュオライト樹脂、Eupergit (登録商標) C、DEAE-Sephadex 等のアクリル樹脂が挙げられ、ポリビニルアルコールを用いて作製されるゲルを本技術のカンナビノイド合成酵素を固定化する支持体として使用することができる。

【0062】

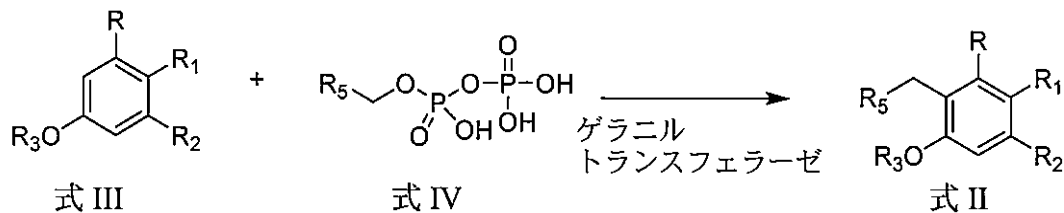
カンナビノイドは種々の生理学的特性を示し、痛みを軽減し、食欲を刺激することが知られており、アレルギー、炎症、感染、癲癇、鬱病、片頭痛、双極性障害、不安障害及び緑内障等の様々な疾患状態を治療する候補治療薬として試験されている。カンナビノイドが示す生理的効果は、主にカンナビノイド受容体、例えば CB₁、CB₂ 及び CB₃ 受容体を刺激又は不活性化するその能力によるものである。受容体活性の調節は結合相互作用及びカンナビノイド受容体活性部位内のリガンドの配向に応じて異なり、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体に付着した置換基の性質及び配向が、かかる化合物が示す薬学的特性に影響を与えることとなる。

【0063】

一実施形態では、中央コアに付着した構造的に異なる多様な置換基を有するカンナビノイドを製造する方法が提供される。かかる化合物は、種々の薬学的に有益な特性を示すことが期待される。構造多様性は適切に置換された式 I I の化合物と式 I V の化合物とを、GPPオリベトレートゲラニルトランスフェラーゼ (ポリケチド合成酵素) 等の酵素の存在下で接触させ、式 I I の化合物を得ることによって導入される。スキーム 1 に、本実施形態に従う式 I I の化合物を合成するプロトコルを構造的に示す。

【化 13】

スキーム 1



10

【0064】

式 I I I 及び式 I V 中の R、R₁、R₂、R₃ 及び R₅ の置換基の性質及びタイプに応じて、本発明の方法は、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体の製造のための前駆体又はシントンとしての中央フェニルコアの周囲に異なる置換基を有する式 I I の化合物の合成を可能にする。したがって本方法によると、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体は、式 I I の化合物とカンナビノイド合成酵素、例えば T H C A 合成酵素、C B C A 合成酵素又は C B D A 合成酵素とを接触させた後、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体を得るために得られる生成物を単離及び脱炭酸することによって得ることができる。

【0065】

式 I I I において、R はヒドロキシル (-OH)、ハロゲン、チオール (-SH) 又は -NR_aR_b 基から選択することができる。置換基 R₁ 及び R₂ は各々独立して -H、-C(O)R_a、-OR_a、任意に置換された直鎖又は分岐 (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、任意に置換された直鎖又は分岐 (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン、任意に置換された直鎖又は分岐 (C₂ ~ C₁₀) アルキニレン、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ アリール、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン及び (C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキニレンからなる群から選択される。

20

【0066】

幾つかの実施形態では、R₁ 及び R₂ はそれらが結合する炭素原子とともに C₅ ~ C₁₀ 環式環を形成し、R₃ は H、-C(O)R_a 及び C₁ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキルからなる群から選択される。

30

【0067】

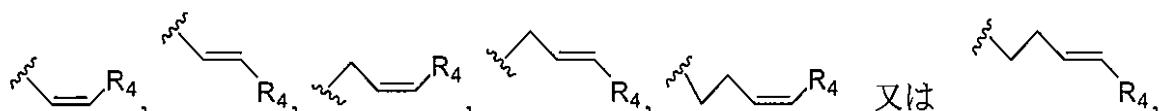
式 I V 中の R₅ は直鎖又は分岐 (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、直鎖又は分岐 (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン、直鎖又は分岐 (C₂ ~ C₁₀) アルキニレン、-C(O)-(C₁ ~ C₁₀) アルキレン、-C(O)-(C₂ ~ C₁₀) アルケニレン及び -C(O)-(C₂ ~ C₁₀) アルキニレンとすることができる。式 I I、式 I I I 及び式 I V の化合物については、任意のアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、アリールアルキレン又はシクロアルキル基が -OH、ハロゲン、-NR_bR_c、-C(O)R_a、-C(O)NR_bR_c、(C₁ ~ C₁₀) アルキル、-CN、(C₁ ~ C₄) アルコキシ、(C₁ ~ C₄) ハロアルキル及び (C₁ ~ C₄) ヒドロキシアルキルからなる群から選択される 1 つ又は複数の基で更に置換されていてもよく、R_a、R_b 及び R_c は各々独立して -H、-OH、又は (C₁ ~ C₁₀) 直鎖若しくは分岐アルキル、-SH、-NH₂、又は C₃ ~ C₁₀ シクロアルキルから選択される。

40

【0068】

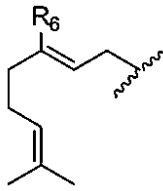
一実施形態によると、式 I V 中の R₅ は、

【化 14】



50

から選択される ($C_2 \sim C_{10}$) アルケニレンであってもよく、 R_4 は CH_3 、 C_2H_5 、 C_3H_7 、 C_4H_9 、 C_5H_{11} 、 C_6H_{13} 、 C_7H_{15} 及び C_8H_{17} からなる群から選択される直鎖アルキレンである。幾つかの式 I V の化合物については、 R_5 は、
【化 15】



10

であり、 R_6 基は ($C_1 \sim C_{10}$) アルキレン、($C_2 \sim C_{10}$) アルケニレン、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 NO_2 、 F 、 Cl 、 Br 、 $-NH_2$ 又は $-NHR_a$ から選択され、 R_a は上記で規定される通りである。

【0069】

酵素はそれらが触媒する化学反応のタイプ、並びにこれらの反応に関与する基質の性質及びタイプに対して非常に特異的である。酵素は高レベルの立体特異性、位置特異性及び化学選択性も示す。したがって本発明者らにより認められた時点で、酵素である THCA 合成酵素が環化反応を触媒する条件に応じて同じ基質カンナビゲロール酸 (CBGA) を用いて 2 つの異なる生成物、テトラヒドロカンナビノール酸 (THCA) 及びカンナビクロメン酸 (CBCA) を生成することができることは予期されていなかった。

20

【0070】

したがって、THCA と CBCA 生成物との分配比率に対する温度、pH、溶媒、イオン強度及びインキュベーション時間の影響を研究した。一実施形態では、生成物の分配比率に対する溶媒の影響を評価した。カンナビノイドは親油性 (lipophilic) であり、水性溶媒に殆ど可溶化しない。水性溶媒におけるカンナビノイドの低い溶解性のため、*ex vivo* 酵素により触媒されるカンナビノイド及びカンナビノイド類似体の合成法の開発が妨げられていた。本発明者らは驚くべきことに、THCA 合成酵素が緩衝液及び非水性溶媒、例えばジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF)、イソプロピルアルコール及びシクロデキストリンを含有する溶媒混合物において、混合物中の非水性溶媒の濃度が 40% (v/v) 未満に維持される場合にその触媒活性を保持する
ことを見出した。

30

【0071】

例えば、非水性溶媒の濃度が約 20% である場合に酵素触媒反応は最も効果的であった。触媒反応速度は非水性溶媒の濃度が増大するにつれ僅かに減少する。このため 20% DMSO は、緩衝液単独での触媒反応よりおよそ 2.5 倍速いという最も高い触媒反応速度をもたらした。表 1 に触媒活性の速度に対する非水性溶媒の濃度の影響を示す。

【0072】

表 1 に更に示されるように、非水性溶媒の濃度は生成物として生成する THCA と CBCA との比率を変化させ得る。このため、10% DMSO を溶媒として使用する場合、10:1 という THCA : CBCA 分配比率が観察されるため、緩衝液における DMSO の濃度が 20% 未満である場合により高レベルの THCA が得られる。

40

【0073】

【表 1】

表 1

DMSO	倍速	THCA : CBCA
0 %	1 ×	
10 %	1.2 ×	10 : 1
20 %	2.5 ×	5 : 1
25 %	—	1 : 1
30 %	0.3 ×	

10

【0074】

100 mM リン酸ナトリウム緩衝液へのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等の洗浄剤の添加は、基質 CBGA から生成物への変換率に影響を与えなかったことが観察された。対照的に、シクロデキストリンを含有する 100 mM クエン酸緩衝液への SDS の添加は、反応を触媒する THCA 合成酵素の能力を消失させた。これらの反応条件下では僅か 8 % の基質しか生成物へと変換されず、THCA の形成がこれらの反応条件下での生成物として有利であった。

20

【0075】

カンナビゲロール酸 (CBGA) は、天然のカンナビノイドの生合成における種々のカンナビノイド合成酵素の共通の基質として働く。例えば以前の研究では、酵素である THCA 合成酵素、CBDA 合成酵素及び CBCA 合成酵素が、テトラヒドロカンナビノール酸、カンナビジオール酸及びカンナビクロメン酸のそれぞれの生合成において各々の CBGA を基質として使用することが示唆されている。

【0076】

このため、THCA 合成酵素活性の最適 pH の評価を目的とする研究において、本発明者らは驚くべきことに、触媒反応が行われる pH に応じて、酵素である THCA 合成酵素が基質 CBGA から THCA 又は CBCA への変換を触媒することに気付いた。この観察結果は、単一の酵素である THCA 合成酵素が植物において 2 つの異なるカンナビノイド生成物の形成に関与し得るために予期せぬものであった。

30

【0077】

表 3 に生成物の比率、すなわち THCA 合成酵素を基質である CBGA と接触させた場合に生成する THCA と CBCA 化合物との比率に対する pH の影響を特定することを目的とするものであった pH 研究の結果を示す。本研究における反応混合物の pH は 4.0 ~ 8.0 の pH 範囲であった。THCA 合成酵素が 8.0 を超える pH で触媒的に不活性であるため、より高い pH 値は試験しなかった。

【0078】

表 3 に示されるように、THCA は 6.0 未満の pH 値で優先的に合成される。実際に、触媒反応が pH 4.0 で行われる場合に THCA が主要生成物である。反応混合物の pH を増大させることで生成物の分配比率が変化し、およそ 30 % の CBCA が pH 5.0 で生成物として生成し、およそ 15 % の CBCA が pH 値 6.0 で生成物として生成した。反応混合物の pH の更なる増大、例えば pH 7.0 までの反応混合物の pH の増大により、THCA 合成酵素により触媒される CBGA の変換の生成物として専ら CBCA が生じた。さらに、pH の任意の更なる増大は THCA 合成酵素の触媒活性を低減又は消去し、pH 8.0 の反応混合物については生成物は観察されなかった。

40

【0079】

50

【表 2】

表 3

pH	THCA	CBCA
4	100	微量
5	70	30
6	85	15
7	0	100
8	0	0

10

【0080】

したがって一実施形態では、本発明はテトラヒドロカンナビノール、カンナビクローム、又はテトラヒドロカンナビノール及びカンナビクロームの両方、又はそれらの類似体を、式 V の化合物を反応物として選択し、式 V の化合物をテトラヒドロカンナビノール酸合成酵素（THCA 合成酵素）と接触させ、テトラヒドロカンナビノール、カンナビクローム、又はテトラヒドロカンナビノール及びカンナビクロームの両方、又はそれらの類似体が生成物として得られるように反応混合物の少なくとも 1 つの特性を変更することによって作製する方法を提供する。

20

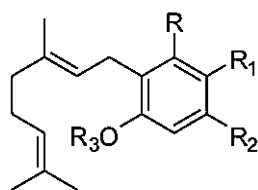
【0081】

式 V において、R は -OH、ハロゲン、-SH 又は -NR_aR_b 基から選択される。置換基 R₁ 及び R₂ は各々独立して -H、-C(O)R_a、-OR_a、任意に置換された C₁ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルケニレン、任意に置換された C₂ ~ C₁₀ 直鎖又は分岐アルキニレン、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ アリール、任意に置換された C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキレン、(C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₂ ~ C₁₀) アルケニレン及び (C₃ ~ C₁₀) アリール - (C₁ ~ C₁₀) アルキニレンからなる群から選択される。

30

【0082】

【化 16】



式 V

【0083】

幾つかの実施形態については、R₁ 及び R₂ はそれらが結合する環炭素原子とともに C₅ ~ C₁₀ 環状環を形成し、ここで 1 つ又は複数の炭素原子が任意に酸素、硫黄、窒素又は -NR_a 基から選択される 1 つ又は複数のヘテロ原子で置き換えられていてもよい。式 V 中の R₃ は H、-C(O)R_a 又は (C₁ ~ C₁₀) 直鎖若しくは分岐アルキルから選択される基であってもよく、置換基 R_a 及び R_b は各々独立して -H、-OH、-SH、NH₂、(C₁ ~ C₁₀) 直鎖若しくは分岐アルキル、又は C₃ ~ C₁₀ シクロアルキル部分から選択される。

40

【0084】

酵素活性及び触媒反応に影響を与えることが知られる任意の物理的特性は、生成物 THCA と CBCA との比率を変化させるように調節することができる。したがって一実施形

50

態では、反応混合物のpHを変化させ、生成物として酵素的に生成するTHCAとCBCAとの比率を調節した。本合成方法に従うと、約4.0～約6.0の範囲のより低いpHでの触媒反応は生成物としてのTHCAの形成に有利であり、約6.5～約7.5の範囲の中性pHでの触媒反応は生成物としてのCBCAの形成に有利であった。

【0085】

このため、本発明者らは、反応混合物のpHを制御することによって触媒反応の生成物としてのTHCA又はCBCAの形成を制御することが可能であることを示した。

【0086】

反応溶媒の組成、イオン強度、温度、圧力、反応媒体の粘度及び試薬の濃度等の他の物理的特性も生成物の比率を変化させ得る。実際に、これらの物理的パラメーターの多くはバイオリアクターを用いたカンナビノイド又はカンナビノイド類似体の大規模製造における触媒反応の調節に重要な役割を果たす。

【0087】

このため、一実施形態では、第2のカンナビノイド又はその類似体の形成量に対する第1のカンナビノイド又はその類似体の形成量に影響を与える条件を制御することによって、カンナビノイド又はカンナビノイド類似体を作製するシステム100が提供される。図1に概略的に示されるシステム100は発酵装置2、フィルター18、バイオリアクター10及び制御機構20を備えることができる。図1に表示されるシステムの説明を下記に提示する。

【0088】

発酵装置2は細胞培養培地4及び複数の細胞6を収容する。細胞6はカンナビノイド合成酵素8を産生及び分泌するように構成される。カンナビノイド合成酵素8の製造用の発酵装置2に使用される細胞6は、カンナビノイド合成酵素タンパク質をコードする核酸配列又は遺伝子を含むように遺伝子操作した任意の真核細胞であり得る。幾つかの実施形態では、カンナビノイド合成酵素タンパク質をコードする核酸配列は、酵母分泌配列をその5'末端に含み、6残基ヒスチジンタグをその3'末端に組み込むように修飾される。酵母分泌配列の付加は、カンナビノイド合成酵素タンパク質の真核細胞増殖に用いる培地への分泌を可能にする。カンナビノイド合成酵素8の細胞外分泌は、フィルター18を用いた発酵装置2とバイオリアクター10との間での酵素の分離及び輸送を容易にするため有利である。発酵装置2におけるカンナビノイド合成酵素8の作製に続いて、上清（例えば培地4、細胞6及びカンナビノイド合成酵素8）をパス24に沿ってフィルター18へと輸送する。パス24は上清の輸送に好適な管又は任意の他の経路であり得る。

【0089】

フィルター18は上清を濾過し、発現された酵素を含有する培地4から細胞6を少なくとも部分的に分離することができる。通例、フィルター18は全細胞6の少なくとも80%を培地4から分離する。幾つかの実施形態については、フィルター18は全細胞6の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%を、培地4をバイオリアクター10に導入する前にこの培地4から分離する。濾過の後、細胞6はパス26に沿って発酵装置2へと再び輸送される。一実施形態では、フィルター18は、カンナビノイド合成酵素8を精製するための複数のフィルター及びリザーバを備える濾過及び精製システムであり得る。

【0090】

フィルター18を通過した後、カンナビノイド合成酵素8はパス28に沿ってバイオリアクター10に流入し、入口30を介してバイオリアクター10に入る。バイオリアクター10は、基質CBGA又は上記の式Iの化合物に従う他の基質等の反応物の入口32も備える。このため図1に示されるように、バイオリアクター10はカンナビノイド合成酵素8と相互作用して第1のカンナビノイド14を形成するように構成される反応物12を含有する。バイオリアクター10は第2のカンナビノイド16の合成環境も提供し得る。

第2のカンナビノイド16は、第1のカンナビノイド14と同じタイプのカンナビノイド合成酵素8及び基質を用いて作製することができる。例えば、第1のカンナビノイド14及び第2のカンナビノイド16の両方を反応物12としてC B G A、カンナビノイド合成酵素8としてT H C A合成酵素を用いて作製することができる。本実施形態では、第1のカンナビノイド14はT H C Aであり、第2のカンナビノイド16はC B C Aであり得る。代替的な実施形態では、第2のカンナビノイド16は、第1のカンナビノイド14の合成に使用されるものとは異なる基質又はカンナビノイド合成酵素を用いて合成することができる。

【0091】

バイオリアクター10は、二価金属イオンを含浸させた固体支持体又は表面を二価金属イオンで官能化した支持体を有するカラムバイオリアクターであり得る。通例、セファロース、アガロース又は他の生体高分子をニッケル、コバルト、マグネシウム及びマンガン等の二価金属イオンを結合する支持体として使用する。かかる支持体は、発現されたカンナビノイド合成酵素8上に存在するヒスチジントグに対して強い親和性を有し、合成酵素を隔離し、カンナビノイド合成を阻害又は妨害し得る他の不必要なタンパク質及び残屑から分離するために使用することができる。

【0092】

カンナビノイドの合成に使用されるバイオリアクター10は、薬学的に有用なカンナビノイドの商業的製造を可能にするバッチ及び連続合成プロセス用に構成される。一実施形態では、バイオリアクター10は培地4の組成、酵素及び基質の濃度がプロセスの開始時に固定され、触媒反応中に変化しないバッチ合成用に構成される。合成は、バイオリアクター10の培地中の所望の生成物の濃度が所定の値に達した又は基質の濃度が、例えば基質から生成物への検出可能な触媒変換が存在しないレベルまで所定のレベルを下回った時点で終了する。

【0093】

したがって一実施形態では、Hisタグ付きカンナビノイド合成酵素8は既知の量の基質、例えばカンナビゲロール酸(C B G A)又は式I、式II若しくは式Vの化合物をバイオリアクター10に導入する前にバイオリアクターカラム内のニッケル含有樹脂支持体に隔離される。代替的な実施形態では、カンナビゲロール酸(C B G A)又は式I、式II若しくは式Vの化合物は、カンナビノイド合成酵素8を含有する培地4をバイオリアクター10に導入する前にニッケル樹脂支持体を有するバイオリアクター10内に存在し得る。いずれの場合も、既知の量の酵素と基質である既知の量の式I、式II若しくは式Vの化合物又はC B G Aとを接触させ、生成物としてカンナビノイド又はカンナビノイド類似体、例えば第1のカンナビノイド14又は第2のカンナビノイド16を合成する。

【0094】

バイオリアクター10内の反応の進行は定期的又は連続的にモニタリングすることができる。例えば、光学モニタリングシステムを利用して、時間に応じたバイオリアクター10内の培地4中の生成物の濃度を検出してもよい。代替的には、基質の濃度の低下をモニタリングして合成の終了を知らせることができる。このようにして作製されたカンナビノイド生成物は、標準的な溶媒抽出又はクロマトグラフィー精製法を用いて培地から容易に回収することができる。モニタリングシステムは、下記に更に説明されるように制御機構20の一部であっても又はそれと対話するものであってもよい。

【0095】

バッチプロセスモードの代替手段は、規定量の基質及び培地4を連続的にバイオリアクター10に添加し、カンナビノイド生成物を含有する等量の培地4を同時にバイオリアクター10から取り出すことで、一定の生成物形成速度を維持する連続プロセスモードである。培地4は入口32を介してバイオリアクター10に入り、出口34を介してバイオリアクター10から出ることができる。基質、酵素及び生成物形成速度の最大化に関わる他の因子の濃度を調節する方法は当該技術分野で既知である。

【0096】

バイオリアクター 10 の条件は制御機構 20 を用いて制御することができる。制御機構 20 はバイオリアクター 10 に連結させてもよく、又は代替的にはバイオリアクター 10 とワイヤレス又は遠隔で対話するものであってもよい。制御機構 20 はバイオリアクター 10 の少なくとも 1 つの条件を制御し、それにより第 2 のカンナビノイド 16 の形成量に対する第 1 のカンナビノイド 14 の形成量に影響を与えることができる。例えば一実施形態では、カンナビノイド合成酵素 8 は T H C A 合成酵素であり、遺伝子組み換えピキア・パストリス酵母細胞により産生される。上記のように、この酵素とカンナビゲロール酸とを接触させることで T H C A 又は C B C A の両方の作製が可能となる。C B C A に対する T H C A の産生量（例えば T H C A と C B C A との比率）に影響を与える一条件は、バイオリアクター 10 内の培地 4 の p H である。温度、圧力及び流量等のバイオリアクター 10 内の他の条件も、バイオリアクター 10 内で産生される第 1 のカンナビノイド 14（例えば T H C A）及び第 2 のカンナビノイド 16（例えば C B C A）の相対量に影響を与え得る。一実施形態では、条件（例えば p H、温度、圧力及び／又は流量）の変化は、第 2 のカンナビノイド 16 と比べてより多量の第 1 のカンナビノイド 14 の形成から、第 1 のカンナビノイド 14 と比べてより多量の第 2 のカンナビノイド 16 の形成へのシフトを引き起し得る。

10

【0097】

別の実施形態では、制御機構 20 を酸素レベル、攪拌、p H 及び供給速度等の発酵装置 2 の条件を制御するために使用することもできる。制御機構 20 は、発酵装置 2、フィルター 18 及びバイオリアクター 10 への材料の（例えば制御ポンプによる）出入りを制御することもできる。

20

【0098】

制御機構 20 はプロセッサ及び記憶装置を有する処理回路を備えていてもよい。プロセッサは汎用プロセッサ、特定用途向け集積回路（A S I C）、1 つ又は複数のフィールドプログラマブルゲートアレイ（F P G A）、処理要素群、又は他の好適な電子処理要素として実装され得る。記憶装置（例えばメモリ、メモリユニット、ストレージ装置等）は、本願に記載の様々なプロセス及び機能を完成させる又は容易にする、例えばバイオリアクター 10 の p H、温度及び圧力を制御する、又はバイオリアクター 10 に出入りする培地 4 の流量を変更するためのデータ及び／又はコンピュータコードを保存する 1 つ又は複数の装置（例えば R A M、R O M、フラッシュメモリ、ハードディスクストレージ等）である。記憶装置は揮発性メモリ又は不揮発性メモリであっても又はそれを含んでいてもよい。記憶装置はデータベース要素、オブジェクトコード要素、スクリプト要素、又は本願に記載の様々な動作及び情報構造を支持する任意の他のタイプの情報構造を含み得る。一実施形態によると、記憶装置はプロセッサに処理回路を介した通信によって接続し、本明細書に記載の 1 つ又は複数のプロセスを（例えば処理回路及び／又はプロセッサによって）実行するコンピュータコードを含む。

30

【0099】

本開示は様々な操作を達成する、例えばバイオリアクター 10 の条件を制御するための任意の機械可読媒体上の方法、システム及びプログラム製品を企図する。本開示の実施形態は、この又は別の目的で組み込まれる既存のコンピュータプロセッサ又は適切なシステムの専用コンピュータプロセッサを用いて、又はハードワイヤードシステムによって実行することができる。本開示の範囲内の実施形態としては、機械可読媒体に保存されている機械により実行可能な指示又はデータ構造を実行する又は有する機械可読媒体を含むプログラム製品が挙げられる。かかる機械可読媒体は、汎用若しくは専用コンピュータ又はプロセッサを有する他の機械がアクセスすることができる任意の利用可能な媒体であり得る。例としては、かかる機械可読媒体は R A M、R O M、E P R O M、E E P R O M、C D - R O M 又は他の光ディスクストレージ、磁気ディスクストレージ、他の磁気ストレージ装置、半導体ストレージ装置、又は所望のプログラムコードを機械により実行可能な指示若しくはデータ構造の形態で実行若しくは保存するのに使用することができ、汎用若しくは専用コンピュータ若しくはプロセッサを有する他の機械がアクセスすることができる任

40

50

意の他の媒体を含み得る。情報がネットワーク又は別の通信接続（ハードワイヤード、ワイヤレス、又はハードワイヤード若しくはワイヤレスの組合せ）を通じて機械に転送又は提供された場合、機械は機械可読媒体の接続を適切に表示する。このため、任意のかかる接続は機械可読媒体と適切に称される。上記の組合せも機械可読媒体の範囲に含まれる。機械により実行可能な指示としては、例えば汎用コンピュータ、専用コンピュータ又は専用処理機械に或る特定の機能又は機能群を実行させる指示及びデータが挙げられる。

【0100】

制御機構20は、バイオリアクター10の条件を制御するためにユーザーと制御機構20との対話を可能にするキーボード22及びディスプレイ36等の付加的な装置を更に備えていてもよい。例えば、ディスプレイはユーザーがバイオリアクター10のpH、温度、圧力及び流量の変化をモニタリングする、又はカンナビノイド若しくはカンナビノイド類似体を作製するシステムの任意の他の条件をモニタリングするのを可能にするスクリーンを備えていてもよい。

10

【0101】

様々な例示的な実施形態に示されるカンナビノイド又はカンナビノイド類似体を作製するシステムの構築及び配置は例示的なものにすぎない。ごく少数の実施形態を本開示で詳細に記載したが、多くの修正（例えば様々な要素のサイズ、寸法、構造、形状及び割合、パラメーターの値、材料の使用、色、配向等の変更）が可能である。例えば、要素の位置を入れ替えても又は別の形で変更してもよく、個別の要素の性質若しくは数又は位置を交換又は変更してもよい。したがって、かかる修正は全て本開示の範囲に含まれることが意図される。さらに、任意のプロセス又は方法工程の順序又は配列を代替的な実施形態に従って変更又は並び替えることができる。本開示の範囲から逸脱することなく他の置換、修正、変更及び省略を例示的な実施形態の設計、操作条件及び配置に対して行うことができる。

20

【0102】

本技術を以下の実施例によって更に説明するが、これらの実施例は特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0103】

A. 高収率酵母形質転換体からのタンパク質の分子クローニング、スクリーニング及び発現

30

1. 制限消化

THCA プラスミドDNA又はCBDA プラスミドDNAを、プラスミドをPme I又はSpe I制限酵素によって37 で適切な時間消化することによって線状化した。次いで、3M酢酸ナトリウムの10倍希釈溶液及び2.5容量の90%エタノールを用いてDNAをエタノール沈殿した。沈殿後にDNAを12000rpmで10分間遠心分離することによってペレット化した。ペレットを80µLの80%エタノールで洗浄し、加熱遠心分離を用いて遠心分離して乾固した。この洗浄及び遠心分離工程を繰り返し、それにより得られたDNAを10µLの滅菌水に再懸濁し、-20 で使用時まで凍結した。

40

【0104】

2. エレクトロコンピテント酵母細胞の調製

エレクトロコンピテントPichia Pink (pPink)細胞を、10mLのYPD培地に遺伝子組み換えAde2、pep4ノックアウトpPink酵母株2のグリセロールストックを接種することによって作製した。これらの細胞を、270rpmで回転する振盪機を用いて培養物のOD₆₀₀が対数期増殖を示す1.3単位の値に達するまで125mL容のバッフル底フラスコにおいて27 で一晩増殖させた。次いで、この培養物を100mLのYPD培地に添加し、同じ条件下で一晩インキュベートした。OD₆₀₀を1時間毎に確認し、12時間のインキュベーション期間後に1.3単位の値に達した。

【0105】

50

この時点で、培養物を500 mL容の遠心分離管に移し、4 及び5200 rpmで5分間回転させた。上清をデカントし、250 mLの滅菌氷冷水を添加して、細胞を再懸濁した。この洗浄及び遠心分離プロトコルを2回繰り返して、YPD培地の完全な除去を確実にした。50 mLの滅菌氷冷水を用いて最終洗浄を行い、細胞を懸濁し、続いて細胞を5200 rpmで再ペレット化し、上清をデカントにより除去した。

【0106】

細胞ペレットに10 mLの滅菌氷冷1 Mソルビトールを添加した。次いで、ソルビトール - 細胞混合物を15 mL容の滅菌円錐管に移し、5200 rpmで遠心分離した。300 µLの滅菌氷冷1 Mソルビトールを用いた細胞ペレットの2回目の洗浄を行った後、これらの細胞をエレクトロポレーションに使用した。

10

【0107】

3. エレクトロポレーション

予め凍結しておいた線状化THCA プラスミドDNA又はCBDA プラスミドDNAを氷上で解凍し、80 µLのエレクトロコンピtent pPink細胞を管に添加した。次いで、この混合物を0.2 cmエレクトロポレーションキューベットに移し、氷上で5分間インキュベートした。キューベットに1640 V、200 及び25 µF、総パルス時間およそ4 msでパルスした。パルスの直後に、1 mLのY P D S培地をキューベットに添加し、全混合物をピペティングにより十分に混合した。次いで、キューベットを振盪することなく27 のインキュベーターに2時間入れ、続いて300 µLを新鮮PADプレートに画線培養した(streaked)。これらのプレートを27 でおおよそ7日~10日間インキュベートし、細胞増殖を促進した。

20

【0108】

4. スクリーニング及びタンパク質発現

色によるスクリーンを使用して、陽性酵母細胞形質転換体を特定した。白色コロニーは対象の遺伝子の陽性発現の指標であり、赤色コロニーは発現を示さない。したがって、白色コロニーをPADプレートから選択し、新鮮PADプレートに再び画線培養して、これを3日~5日間インキュベートして、個々のコロニーの増殖を促進した。次いで、単一コロニーを使用して125 mL容のバッフル底フラスコに入った10 mLのBMGY培地に播種し、これを振盪(270 rpm)しながら27 で一晩インキュベートした。600 nmでの光学密度(OD)(OD₆₀₀)を培養物の10倍希釈サンプルについて定期的に測定した。

30

【0109】

接種材料培養物が1.2単位~1.5単位のOD₆₀₀を達成した時点でインキュベーションを停止した。次いで、接種材料を50 mL容の円錐管に移し、5200 rpmで5分間遠心分離し、細胞をペレット化した。上清をデカントした後、1 mLの新鮮BMMY培地をペレットに添加し、続いて管を、滅菌空気交換を可能にする空気孔テープで覆い、27 の振盪インキュベーターに入れた。

【0110】

24時間後に100 µLの細胞サンプルを取り出し、これに100 µLの40%メタノールを添加して、酵素産生を誘導した。次いで、このメタノールサンプルを12000 rpmで5分間遠心分離し、上清及びペレットをT1サンプルとして保存した。第2の培養物サンプルを48時間のインキュベーション期間後に得て、上記のようにメタノールで処理した。遠心分離後に上清及びペレットをT2サンプルとして保存した。72時間の時点で全インキュベーション混合物を適切な容量の40%メタノールで処理した。72時間のインキュベーション期間後に培養物のメタノール処理により得られた上清及びペレットをT3と標識する。T3上清をAmicon 30 kDタンパク質フィルターを通して回転させ、SDS-PAGEゲルを用いてタンパク質について分析した。

40

【0111】

商業的量のTHCA合成酵素又はCBDA合成酵素を、発酵装置を用いて培養物の容量をスケールアップすることによって得た。このため、酵母接種材料を初めに125 mL容

50

のバッフル底フラスコ内の10 mLのBMGY培地を酵母の単一白色コロニーと接触させることによって調製した。このスターター培養物を270 rpmで振盪しながら27で一晩インキュベートし、OD₆₀₀が1.2単位~1.5単位の培養物を得た。このスターター培養物を用いて1 L容のバッフル底フラスコ内の90 mLのBMGY培地に播種した。この培養物のOD₆₀₀が1.2単位~1.5単位に達した時点で、接種材料を500 mL容の遠心分離ボトルに移し、酵母細胞を5200 rpmで5分間ペレット化した。

【0112】

5. 酵素変換

THCA合成酵素の触媒活性を、25 µlのT3サンプルに由来する無細胞上清を、10% DMSOを含むpH 4.8の200 µlの100 mMクエン酸緩衝液中の25 µlの1 mg/mL CBGAストックとともに30 で2時間インキュベートすることによって測定した。反応混合物中のCBGAの最終濃度は0.1 mg/mLであった。最終pHは5.0である。表4に、形質転換pPink酵母細胞、すなわち線状化THCA合成酵素プラスミドを用いて形質転換されたpPink酵母細胞の独立コロニーから得られたTHCA合成酵素の触媒活性に関するデータを示す。20%超の基質CBGAが生成物THCAへと変換された培養物サンプルをスケールアップに選択した。

【0113】

【表 3】

表 4

サンプルID	0. 1mg/mlのCBGAを含有する反応物 におけるCBGAからTHCAへの%変換
Spe THC#3	20. 6
Spe THC#4	28. 7
Spe THC#22	20. 6
Spe THC#23	18. 7
Pme THC#5	32. 5
Pme THC(2)#1	29. 1
Pme THC(2)#2A	27. 2
Pme THC(2)#25	31. 6
Pme THC(2)#36	27. 7
Pme THC(2)#41	32. 5
Pme THC(2)#42	27. 6
Pme THC(2)#46	40. 7
Pme THC(2)#51	26. 8
Pme THC(3)#1	55. 2
Pme THC(3)#11	35. 0
Pme THC(3)#17	69. 9
Pme THC(3)#19	36. 8
Pme THC(3)#20	34. 3

【0114】

6. 多コピーGOI挿入断片を*in vitro*で生成するクローニング戦略

上記のように、6コピー～10コピーの対象の遺伝子を有する形質転換細胞を、異種タンパク質の作製を潜在的に高めるために使用することができる。代替酵母発現系を使用して、対象の遺伝子の複数のコピーを有する形質転換細胞を得た。Invitrogenの多コピーピキア発現キットを用いて、酵母細胞をプラスミドの複数のコピーで形質転換させる新たなプラスミドを構築した。

【0115】

簡潔に述べると、pAO815ベクターを使用して対象の遺伝子をクローニングした。このため、*-CBDA*合成酵素及び*-THCA*合成酵素の遺伝子をEcoRI及びBamHI制限酵素を用いてpPink-HCプラスミドから切り取った。*-CBDA*合成酵素遺伝子又は*-THCA*合成酵素遺伝子を含有する100ngのpPink-

H C ベクターを 1 μ l の E c o R I 緩衝液、1 u l の各制限酵素 (1 0 単位 / u l) 及び 1 u l の B S A とともに 2 0 u l の総反応容量、3 7 °C で 2 時間インキュベートした。別個に、1 0 0 n g の p A O 8 1 5 ベクターを上記のプロトコルを用いて E c o R I 及び B a m H I 酵素で消化した。

【 0 1 1 6 】

次いで、消化混合物を 0 . 8 % アガロースゲルにロードし、D N A フラグメントを 9 5 V で 1 時間の電気泳動により互いに分離した。T H C A 合成酵素又は C B D A 合成酵素の遺伝子に対応するバンドを、Invitrogen のゲル抽出キットを用いてゲルから抽出した。これらの遺伝子フラグメントを T 4 D N A リガーゼを用い、NEB (登録商標) のライゲーションプロトコルに従って線状化 p A O 8 1 5 ベクターにライゲートした。

10

【 0 1 1 7 】

ライゲーションに続いて、対象の遺伝子を含有する環状ベクターを 1 5 0 0 V 、 2 0 0 及び 2 5 μ F で 4 m s のエレクトロポレーションにより大腸菌 T o p 1 0 F ⁻ 細胞に形質転換した。次いで、形質転換細胞を 2 5 0 u l の S O C 培地 (Invitrogen の O n e S h o t (登録商標) T o p 1 0 E l e c t r o c o m p (商標) 大腸菌を添加した) と混合し、L B - A m p 1 0 0 プレートに 3 7 °C で一晩プレーティングした。

【 0 1 1 8 】

インキュベーション後に、P C R 実行用の 5 ' A O X 1 及び 3 ' A O X 1 プライマーによるコロニー P C R プロトコルを用いて陽性コロニーを特定した。対象の遺伝子を含有する陽性コロニーを液体 L B - A m p 1 0 0 培地中、3 7 °C で一晩増殖させた。翌日、Invitrogen の f a s t p r e p キットを用いてプラスミドミニプレップを行い、更なる増幅の前にプラスミドの濃度を 0 . 8 % アガロースゲルで分析した。

20

【 0 1 1 9 】

- T H C A 合成酵素及び - C B D A 合成酵素の遺伝子が p A O 8 1 5 に挿入された後、組み換えプラスミドを 2 つのバッチに分ける。第 1 のバッチを対象の遺伝子の第 2 のコピーが挿入されるベクターとして使用した。p A O 8 1 5 組み換えプラスミドの第 2 のバッチは、- T H C A 合成酵素又は - C B D A 合成酵素の遺伝子の抽出に使用した。したがって、ベクターとして使用される p A O 8 1 5 組み換えプラスミドを、初めに B a m H I 制限酵素で NEB の単一消化プロトコルに従って消化した。同時に、p A O 8 1 5 組み換えプラスミドの第 2 のバッチを B g l I I 及び B a m H I 制限酵素で消化した。

30

【 0 1 2 0 】

第 1 及び第 2 の消化混合物を、0 . 8 % アガロースゲルを用いて精製し、続いて精製した線状化ベクター及び - T H C A 合成酵素又は - C B D A 合成酵素の遺伝子配列をゲルから抽出した。次いで、各々の遺伝子配列を NEB の T 4 D N A リガーゼプロトコルに従って線状化ベクターにライゲートし、遺伝子を含有するベクターを使用して大腸菌 T o p 1 0 F ⁻ 細胞をエレクトロポレーションにより形質転換した。形質転換細胞を 3 7 °C で一晩インキュベートした後、正確な遺伝子挿入断片についてスクリーニングした。上記のプロトコルを数回繰り返し、多コピー挿入断片プラスミドを得る。遺伝子挿入断片の配列同一性を確認した後、多コピープラスミドを H i s 4 配列領域で制限酵素消化により線状化し、コンピテントピキア・パストリス株 G 1 1 5 (h i s 4 、 M u t +) 細胞の形質転換に使用した。形質転換細胞をスクリーニングのために H i s ⁻ プレート上で増殖させた。スクリーニングを H i s ⁻ プレートで行い、ピキア・パストリスゲノムの H i s 部位でのプラスミドの組込みを確認した。陽性コロニーをタンパク質のメタノール誘導で選び、分泌タンパク質の活性を上記のプロトコルを用いてアッセイした。

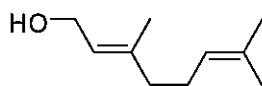
40

【 0 1 2 1 】

化学合成

A . ゲラニオール (3 , 7 - ジメチルオクタ - 2 , 6 - ジエン - 1 - オール) の合成

【化 17】



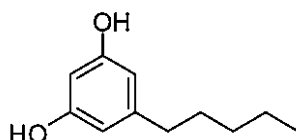
ゲラニオールをパルマローザ油の蒸留によって得た。パルマローザ油 (New Directions Aromatics) を減圧下で蒸留し、139 ~ 145、25 mm Hg の減圧下で蒸留される画分をプールして純粋なゲラニオールを得た。

【0122】

B. オリベトールの合成

10

【化 18】



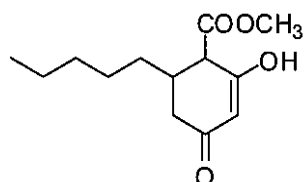
オリベトールを公表されている手法 (Focella, A, et al., J. Org. Chem., Vol. 42, No. 21, (1977), p. 3456-3457) を用いて合成した。

【0123】

1. メチル 6 - N - ペンチル - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - シクロヘキサ - 2 - エン - 1 - カルボキシレート

20

【化 19】



230 mL の無水メタノール中のナトリウムメトキシド (32.4 g、0.60 mol) 及びマロン酸ジメチル (90 g、0.68 mol) の攪拌溶液に、75 g (0.48 mol) の 90% 3 - ノネン - 2 - オンを少量ずつ添加した。次いで、反応混合物を N_2 下で 3 時間還流させ、室温まで冷却した。溶媒を減圧下で蒸留し、残渣を 350 mL の水に溶解した。白色結晶とほぼ透明な溶液とのスラリーを 80 mL のクロロホルムで 3 回抽出した。水層を濃 HCl で pH 4 まで酸性化し、形成される白色沈殿物を一晩静置した後、濾過した。結晶を高真空下、50 で 5 時間乾燥させ、106.5 g (0.4416 mol) (92%) のメチル 6 - n - ペンチル - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - シクロヘキサ - 2 - エン - 1 - カルボキシレート (融点 96 ~ 98) を得た。生成物を、石油エーテル：酢酸エチル (9 : 1) の混合物を用いて再結晶化し、94 g の純粋なメチル 6 - n - ペンチル - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - シクロヘキサ - 2 - エン - 1 - カルボキシレート (融点 98 ~ 100) を得た。

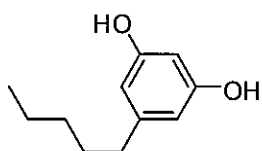
30

40

【0124】

2. 1 - N - ペンチル - 3, 5 - ジヒドロキシベンゼン (オリベトール)

【化 20】



115 mL のジメチルホルムアミドに溶解したメチル 6 - N - ペンチル - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - シクロヘキサ - 2 - エン - 1 - カルボキシレート (58.4 g、0.2

50

4 mol) の攪拌氷冷溶液に、60 mL のジメチルホルムアミドに溶解した 37.9 g (0.23 mol) の臭素を滴加した。添加(およそ 90 分)の終了後に反応混合物を 80 までゆっくりと加熱すると、二酸化炭素の発生が非常に激しくなった。

【0125】

反応をガス発生が止まるまでこの温度に維持し、続いて反応物を 160 まで更に加熱し、この温度におよそ 10 時間保持した。加熱後に反応物を冷却し、溶媒 DMF を減圧下で除去した。これにより得られた残渣を水(80 mL)で処理し、250 mL のエーテルで 2 回抽出した。合わせたエーテル層を水で洗浄した後、2 × 80 mL の亜硫酸水素ナトリウムの 10% 溶液、2 × 80 mL の酢酸の 10% 溶液、続いて水で再び洗浄した。

【0126】

無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧下で除去し、46.8 g の粘性の油を得た。油を減圧下で蒸留し、30.3 g (0.168 mol) (69.3%) のオリベートルを生成物として得た。HPLC 分析により 97.5% の純度が示された。

【0127】

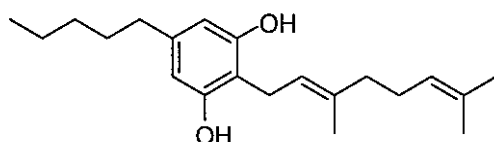
C. CBG の合成

CBG を Taura et al., (1996), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 21, p. 17411-17416 に開示のプロトコルに従って合成した。

【0128】

1. 2 - [(2E) - 3, 7 - ジメチルオクタ - 2, 6 - ジエニル] - 5 - ペンチル - ベンゼン - 1, 3 -ジオール (カンナビゲロール (CBG)) の合成

【化21】



グラニオール(3 g、0.0194 mol)及びオリベートル(2 g、0.0111 mol)を、80 mg の p - トルエンスルホン酸を触媒として含有する 400 mL のクロロホルムに溶解し、反応混合物を暗所、室温で 12 時間攪拌した。12 時間後に反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム(400 mL)、続いて H₂O (400 mL) で洗浄した。クロロホルム層を減圧下、40 で濃縮し、得られた残渣を、ベンゼン(1000 mL)を溶離液として用いた 2.0 cm × 25 cm シリカゲルカラムでのクロマトグラフにかけ、1.4 g (0.00442 mol) (39.9%) の CBG を生成物として得た。

【0129】

代替的には、粗 CBG を以下のようにして精製した。250 mL 容のビーカーに 7.25 g の粗 CBG 及び 50 mL のベンゼンを添加した。フラスコをかき混ぜて CBG を溶解し、50 g のシリカゲルを攪拌子とともに添加した。溶液を一晚攪拌した後、44 cm × 2.75 cm カラムに注ぎ入れた。カラムを 300 mL のベンゼンで溶出した。溶離液のおよそ 70 mL の画分を CBG についてアッセイした。CBG を含有する画分 1、2 及び 3 (約 230 mL) を合わせ、溶媒を加圧下で除去し、次の合成工程での使用に好適な純度を有する 80% 超の CBG を含む残渣を 6.464 g 得た。

【0130】

一実施形態では、7.25 g の粗 CBG 残渣とシリカゲル(50 mL)のスラリーとを 250 mL 容のビーカー内で混合することによって粗 CBG を精製した。この混合物を 1 時間ゆっくりとかき混ぜた後、細目濾紙を用いて真空濾過した。濾過ケ - キを 250 mL のベンゼンで透明な濾液が得られるまで洗浄した。濾液から溶媒を減圧下で除去し、80% 超の CBG を含む残渣を 6.567 g 得た。

【0131】

2. CBG 酸 (CBGA) の合成

A. 炭酸メチルマグネシウム (MMC) の合成

炭酸メチルマグネシウム (MMC) を Balasubrahmanyam et al., (1973), Organic Synthesis, Collective Volume V, John Wiley & Sons, Inc., p. 439-444 に開示のプロトコルに従って合成した。

【0132】

乾燥した 2 L 容の三口フラスコに機械的攪拌器、凝縮器及び 1 L 容の均圧添加漏斗を取り付け、その最上部にガス導入管を取り付けた。清浄な乾燥マグネシウムリボン (40.0 g、1.65 mol) をフラスコに入れ、システムを窒素でフラッシングした後、無水メタノール (600 mL) を添加した。反応混合物を外部から冷却することによって水素ガスの発生を制御した。水素の発生が止まった後、緩徐な窒素流をシステムに通過させ、凝縮器を全縮 - 分取蒸留ヘッドに交換した。窒素フローを停止し、メタノールの大部分を減圧下で溶液から蒸留した。マグネシウムメトキシドのペースト状の懸濁液の攪拌が実際的でなくなった時点で蒸留を停止した。システムを、窒素を用いて再度フラッシングし、蒸留ヘッドの出口を、鉱油を含有する小トラップに取り付け、それにより反応システムから流出するガスの容量を推定することができた。

10

【0133】

無水ジメチルホルムアミド (DMF) (700 mL) を反応フラスコに添加し、得られる懸濁液を激しく攪拌しながら、無水二酸化炭素流を添加漏斗に接続したガス導入管により反応容器に通した。二酸化炭素の溶解は懸濁マグネシウムメトキシドの発熱反応を伴っていた。CO₂ が吸収されなくなった時点で、無色の溶液を蒸留される液体の温度が 140 に達するまで緩徐な CO₂ ガス流下で加熱し、残留メタノールが反応混合物から除去されたことが示された。反応混合物を、不活性雰囲気下で混合物を室温まで冷却するのを助ける緩徐な窒素流を用いてフラッシングした。これにより 536 mg MMC / mL の DMF を含む溶液が得られた。

20

【0134】

B. CBG - A の形成

6 - カルボン酸 - 2 - [(2E) - 3, 7 - ジメチルオクタ - 2, 6 - ジエニル] - 5 - ペンチル - ベンゼン - 1, 3 - ジオール、カンナビゲロール酸 (CBGA) を以下のようにして調製した。10 mL 容の三角フラスコに 1 mL の MMC の DMF 溶液を添加した。この溶液に 2 - [(2E) - 3, 7 - ジメチルオクタ - 2, 6 - ジエニル] - 5 - ペンチル - ベンゼン - 1, 3 - ジオール (120 mg、0.379 mmol) を添加した。フラスコを 120 で 1 時間加熱した後、反応混合物を 100 mL のクロロホルム：メタノール (2 : 1) 溶液に溶解した。この溶液の pH を希 HCl で pH 2.0 に調整した後、50 mL の H₂O を用いて分配した。

30

【0135】

有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を蒸発により除去した。粗反応物の HPLC 分析により CBG から CBG - A への約 40 % の変換が示された。

【0136】

代替的には、3.16 g (10 mmol) の CBG (又は任意の他の中性カンナビノイド)、8.63 g (100 mmol) のマグネシウムメチレート及び 44 g (1 mol) のドライアイス圧力適合容器に密封した。容器を 50 に加熱し、温度をその値に 3 時間保持した。加熱の後、容器を室温まで冷却し、ゆっくりと通気した。反応混合物を 100 mL のクロロホルム：メタノール (2 : 1) 溶媒に溶解した。この溶液の pH を希 HCl により pH 2.0 に調整した後、この溶液を 50 mL の H₂O を用いて分配した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を蒸発により除去した。粗反応混合物の HPLC 分析により、このプロトコルを用いた CBG から CBG - A への約 85 % の変換が示された。

40

【0137】

粗 CBG - A を、2.0 cm x 25 cm シリカゲルカラムを用いたクロマトグラフィーにより精製した。生成物を n - ヘキサン：酢酸エチル (2 : 1) (1000 mL) の混合物を用いて溶出し、45 mg (0.125 mmol) (37.5 %) の所望の生成物を得

50

た。

【0138】

代替的には、超高純度CBGAを、粗生成物を媒体としてLH-20親油性樹脂を用いたクロマトグラフにかけることによって得た。400gのLH-20 Sephadex樹脂を、初めに2LのDCM：クロロホルム（4：1）溶媒を用いて膨潤させた。膨潤させた樹脂を44×2.75cmカラムに重力充填した。最小量のDCM：クロロホルム（4：1）溶媒に溶解した2.1gの粗CBGAをカラムにロードし、1.7Lの同じ溶媒で溶出した。100mLの画分を回収した。未反応のCBGを、この溶媒系を用いて黄色／橙色溶液として溶出した。約1.7Lのこの溶媒を通過させると黄色／橙色画分は観察されなくなり、溶出溶媒を結合したCBGAを溶出する100％アセトンに変更した。

10

【0139】

CBGAを含有する画分をプールし、溶媒を除去して0.52gのCBGAを得た（約90％の回収率）。アセトンで溶出する前にカラムに通すDCM：クロロホルム（4：1）溶媒の容量を増大させることで、99.5％超の純度を有するCBGAを得た。

【0140】

CBGVの合成

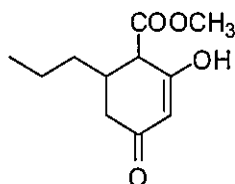
CBGVを以下のようにして合成した。

【0141】

A. メチル6-N-プロピル-2-ヒドロキシ-4-オキソ-シクロヘキサ-2-エン-1-カルボキシレート：

20

【化22】



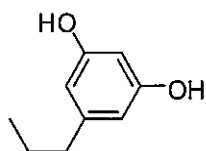
簡潔に述べると、3-ヘブテン-2-オン（30.1g、0.25mol）を、マロン酸ジエチル（52.016g、0.323mol）及びナトリウムメトキシド（16.206g、0.3mol）の乾燥メタノール（125mLの乾燥MeOH）溶液に滴加した。真空オープン内、45℃で一晩乾燥させると、粗生成物は46.315gと秤量された。粗生成物を石油エーテル（300mL）に溶解した。攪拌後に任意の非溶解材料を溶液から濾過し、その後酢酸エチル（30mL）を添加し、CBGVを沈殿させた。沈殿物を濾過し、真空オープン内、44℃で一晩乾燥させた。合計33.569g（0.157mol）（52.3％）の所望の生成物が回収された。

30

【0142】

B. 1-N-プロピル-3,5-ジヒドロキシベンゼン

【化23】



40

メチル6-N-プロピル-2-ヒドロキシ-4-オキソ-シクロヘキサ-2-エン-1-カルボキシレートを出発物質として使用した以外は、オリベトールの合成のための上記と同様の手法を用いて表題の化合物を製造した。簡潔に述べると、メチル6-N-プロピル-2-ヒドロキシ-4-オキソ-シクロヘキサ-2-エン-1-カルボキシレートの攪拌氷冷DMF溶液に臭素のDMF溶液を添加した。臭素の添加の後、反応混合物を80℃に加熱した。加熱に伴って二酸化炭素ガスの生成及び放出が起こった。ガス発生が止まった後、反応物の温度を160℃まで増大させ、加熱を10時間継続した。次いで、反応物

50

を冷却し、DMFを減圧下で除去した。粗混合物を水で希釈し、ジエチルエーテルを用いた溶媒抽出に供した。エーテルを除去し、残留する油を蒸留することによって表題の化合物を得た。

【0143】

C. 2 - [(2 E) - 3 , 7 - ジメチルオクタ - 2 , 6 - ジエニル] - 5 - プロピル - ベンゼン - 1 , 3 - ジオール (C B G V)

C B G Vの合成は、p - トルエンスルホン酸をゲラニオール及び1 - N - プロピル - 3 , 5 - ジヒドロキシベンゼンのクロロホルム溶液に添加することによって進行した。反応物を暗所、室温で12時間撹拌した後、水を添加して粗生成物をクロロホルム層に分配した。次いで、クロロホルム層を飽和重炭酸ナトリウムで洗浄し、乾燥させ、有機溶媒を除去した後、C B Gの合成について上記したように精製した。

10

【0144】

D. 6 - カルボン酸 - 2 - [(2 E) - 3 , 7 - ジメチルオクタ - 2 , 6 - ジエニル] - 5 - プロピル - ベンゼン - 1 , 3 - ジオール (C B G V A)

6 - カルボン酸 - 2 - [(2 E) - 3 , 7 - ジメチルオクタ - 2 , 6 - ジエニル] - 5 - プロピル - ベンゼン - 1 , 3 - ジオール、カンナビゲロール酸 (C B G V A) を以下のようにして調製した。炭酸メチルマグネシウム (M M C) を上記のようにして調製した。フラスコ内のM M CのDMF溶液に、2 - [(2 E) - 3 , 7 - ジメチルオクタ - 2 , 6 - ジエニル] - 5 - プロピル (propyl) - ベンゼン - 1 , 3 - ジオールを添加した。フラスコを120℃で1時間加熱した後、反応混合物をクロロホルム：メタノールの2：1混合物に溶解した。この溶液のpHを希HClでpH2.0に調整し、反応混合物を、H₂Oを用いて抽出した。

20

【0145】

有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を蒸発により除去して、表題の化合物C B G V Aを粗生成物として得た。

【0146】

カンナビノイドの大規模酵素生成

100mlの10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5 . 0) を、酸素ガススパージャー及び撹拌器を備えるガラス反応容器に入れた。この溶液に35g/lの2 - ヒドロキシプロピル - β - シクロデキストリン (H P β C D ; K l e p t o s e (登録商標) H P B)、スルホブチルエーテル - シクロデキストリンナトリウム塩 (S B E C D ; C a p t i s o l (登録商標))、又は無作為にメチル化したβ - シクロデキストリン (R M C D) を添加した。C Dを5gと少量で添加し、完全に溶解させた。

30

【0147】

2.5gのカンナビノイド合成酵素基質、例えばC B G A若しくはC B G V - A、又は式I、式II若しくは式Vの化合物を緩衝シクロデキストリン溶液に添加した。C Dと基質とのモル比は約4：1であった。60mgの精製合成酵素を溶液に添加し、反応混合物を30℃で8時間インキュベートした。反応の進行をHPLCによって定期的にモニタリングし、酵素アッセイを用いて過酸化水素の発生を検出及び定量化した。

40

【0148】

8時間後に、90%超のC B G A基質がT H C A及びC B C Aに変換された。T H C AとC B C Aとの比率は5.0の酸性pHでおよそ10：1であった。C B C 異性体の比率は5：1であった。

【0149】

水溶液を95%EtOHで10倍に希釈した。これによりシクロデキストリンが沈殿し、カンナビノイドが溶液中に残る。シクロデキストリンを真空濾過し、1Lの90%EtOHで洗浄し、乾燥させて今後の反応における再利用を可能にする。カンナビノイドを含有するエタノール溶液の濃縮、その後のDCM：クロロホルム (chloroform) (4：1) 溶媒への残渣の懸濁により、約25gの橙黄色の粗残渣が得られた。

【0150】

50

カンナビノイドの大規模精製

本技術の方法を用いて合成したカンナビノイドの精製は、LH-20親油性樹脂を用いたクロマトグラフィーにより達成された。簡潔に述べると、4000gの樹脂を、20LのDCM：クロロホルム（4：1）を用いて膨潤させた。膨潤させた樹脂を44×27.5cmカラムに重力充填した。膨潤させた樹脂の容量は約1350mLであった。カラムに最小量の溶媒に溶解した25gの粗残渣をロードした後、4LのDCM：クロロホルム（4：1）溶媒で洗浄してCBGを溶出させた。カンナビノイド酸はこの溶出中にカラムから溶出しなかった。

【0151】

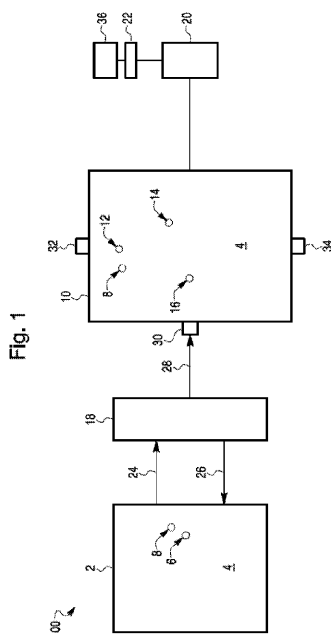
1：1 0：1のDCM：アセトン溶媒による勾配溶出を用いてカンナビノイド酸を溶出した。各勾配工程に1カラム容量（4L）の溶媒を用いた。CBCAが初めに溶出し、続いてCBGA、その後THCAが溶出した。各々のカンナビノイドの純度は99.5%超であった。

【0152】

純粋なカンナビノイドを、酸形態を真空下、90℃で加熱することによってそれらの中性又は「活性」形態へと更に加工することができる。脱炭酸により中性カンナビノイドが定量的に得られた。必要に応じて再結晶化を行い、医薬品グレードのカンナビノイドを得ることができる。

10

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 ヴィニッキ, ロバート

アイルランド共和国, 2, ダブリン, スウィート 3 ロウアー ハッチ ストリート, ワン アールズフォート センター, フル スペクトラム ラボラトリーズ リミテッド内

(72)発明者 ドンスキー, マーク

アイルランド共和国, 2, ダブリン, スウィート 3 ロウアー ハッチ ストリート, ワン アールズフォート センター, フル スペクトラム ラボラトリーズ リミテッド内

合議体

審判長 田村 聖子

審判官 中島 庸子

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特表2009-514890号公報

特表2009-514890号公報

生物物理, 2005年, Vol. 45, No. 4, p. 178-184

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12P

C Aplus / REGISTRY (STN)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)