(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-532146
(P2012-532146A)
(43)公表日　平成24年12月13日(2012.12.13)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07C 229/48	(2006.01)	C07C 229/48	CSP	4B024
C07C 227/04	(2006.01)	C07C 227/04		4B050
C12P 41/00	(2006.01)	C12P 41/00	ZNAJ	4B063
C12Q 1/44	(2006.01)	C12Q 1/44		4B064
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A	4H006

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-518620 (P2012-518620)
(86)(22)出願日　平成22年7月2日(2010.7.2)
(85)翻訳文提出日　平成24年2月1日(2012.2.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/040900
(87)国際公開番号　WO2011/003063
(87)国際公開日　平成23年1月6日(2011.1.6)
(31)優先権主張番号　61/222,767
(32)優先日　平成21年7月2日(2009.7.2)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/222,772
(32)優先日　平成21年7月2日(2009.7.2)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/223,023
(32)優先日　平成21年7月4日(2009.7.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　399131150
ドクター・レディーズ・ラボラトリーズ・リミテッド
インド国、アンドーラ・プラデシュ、ハイドラバード、５００　０１６、アメールペット　７－１－２７
(71)出願人　506017137
ドクター　レディズ　ラボラトリーズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニュージャージー　０８８０７，　ブリッジウォーター，　サマセット　コーポレート　ブールバード　２００，　７ティーエイチ　フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体の分割のための酵素および方法

(57)【要約】
アミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体およびその塩の調製および単離、鏡像異性体を分割する方法ならびにラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる組成物および／または酵素を特定する方法。本発明の態様は、１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割する方法を含む。その実施形態は：１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を提供するステップと；前記１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を細胞構成要素に暴露するステップを含む。

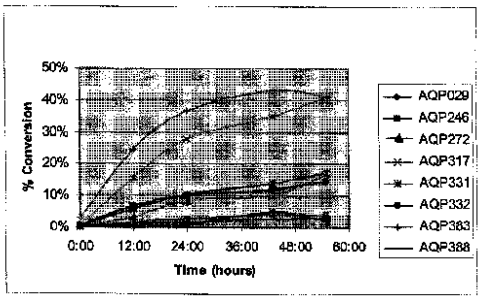
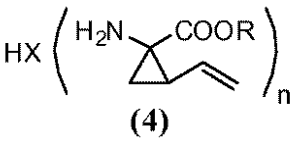


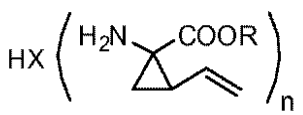
Fig.1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（４）の化合物
【化１３】

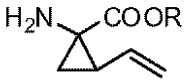


(4)

（式中、Ｒはアルキル基であり、ｎは１～３の整数であり、ＨＸは、リン酸、硫酸、β，β－ジメチルグルタル酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、マレイン酸、リンゴ酸、コハク酸、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸または４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸である）。
【請求項２】
Ｒがメチルまたはエチルである、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
Ｒがメチルであり、ＨＸがリン酸である、請求項１に記載の化合物。
【請求項４】
Ｒがエチルであり、ＨＸがリン酸である、請求項１に記載の化合物。
【請求項５】
式（３）の化合物を酸ＨＸと反応させるステップを含む式（４）の化合物を製造するための方法
【化１４】



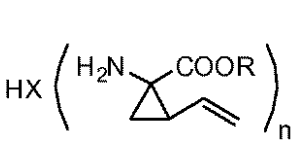
(4)



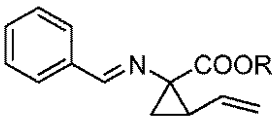
(3)

（式中、Ｒはアルキル基であり、ｎは１～３の整数であり、ＨＸは、リン酸、硫酸、β，β－ジメチルグルタル酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、マレイン酸、リンゴ酸、コハク酸、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸または４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸である）。
【請求項６】
反応させるステップを有機溶媒中で実施する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
反応させるステップを、ＭＴＢＥ、酢酸エチル、ジクロロメタン、酢酸イソプロピルまたはトルエンを含む溶媒中で実施する、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
反応させるステップを、水溶性共溶媒と組み合わせてＭＴＢＥ、酢酸エチル、ジクロロメタン、酢酸イソプロピル、またはトルエンを含む溶媒中で実施する、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記式（４）の化合物を濾過により単離する、請求項５に記載の方法。
【請求項１０】
式（５）のイミノエステル中間体を酸ＨＸで加水分解するステップを含む式（４）の化合物を製造する方法

【化１５】



(4)



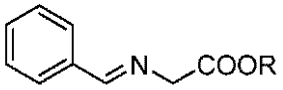
(5)

（式中、Ｒはアルキル基であり、ｎは１～３の整数であり、ＨＸは、リン酸、硫酸、β，β－ジメチルグルタル酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、マレイン酸、リンゴ酸、コハク酸、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸または４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸である）。

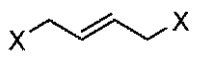
【請求項１１】

前記式（５）のイミノエステル中間体を、式（７）のトランス－１，４－ジハロブタ－２－エンを用いた（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシンアルキルエステル（６）のジアルキル化によって得る、請求項１０に記載の方法。

【化１６】



(6)



(7)

【請求項１２】

ジアルキル化に続いて、前記式（５）のイミノエステル中間体を単離せずに加水分解する、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

ＨＸがリン酸である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１４】

前記式（４）の化合物を濾過により単離する、請求項１０に記載のプロセス。

【請求項１５】

さらなる緩衝剤を用いずに生物学的分割プロセスにおいて式（４）の化合物を使用するステップを含む、ヒドロラーゼ触媒による生物学的分割のための方法。

【請求項１６】

ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる酵素を特定する方法であって：

ａ）ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を提供するステップと；

ｂ）細胞構成要素を前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物に暴露するステップと；

ｃ）前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を、鏡像異性体比の変化について試験するステップと；

ｄ）前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物に対して分割活性を有する酵素を単離するステップと；

ｅ）前記酵素を特定するステップと

を含む方法。

【請求項１７】

前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物が塩の形態である、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物がリン酸塩、ナトリウム塩、硝酸塩またはカルシウム塩である、請求項１６に記載の方法。

【請求項１９】

暴露が流体接触である、請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
細胞構成要素を、動物、植物、細菌、古細菌、菌類、海洋生物、海藻、Ｆｏｒｍｏｓａ ｓｐ．、Ｐｓｙｃｈｒｏｓｅｒｐｅｎｓ ｓｐ．、Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｓｐ．、Ｗｉｎｏｇｒａｄｓｋｙｅｌｌａ ｓｐ．、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓ、Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ ａｔｌａｎｔｉｃｕｓおよびＬｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ａｅｑｕｏｒｅａ、Ａｑｕａｍａｒｉｎａ，ｓｐ．、ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３から得る、請求項１６に記載の方法。
【請求項２１】
１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割する方法であって：
ａ）１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を提供するステップと；
ｂ）１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルの前記ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を細胞構成要素に暴露するステップと
を含む方法。
【請求項２２】
細胞構成要素を、動物、植物、細菌、古細菌、菌類、海洋生物、海藻、Ｆｏｒｍｏｓａ ｓｐ．、Ｐｓｙｃｈｒｏｓｅｒｐｅｎｓ ｓｐ．、Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｓｐ．、Ｗｉｎｏｇｒａｄｓｋｙｅｌｌａ ｓｐ．、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓ、Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ ａｔｌａｎｔｉｃｕｓ、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ａｅｑｕｏｒｅａ、Ａｑｕａｍａｒｉｎａ ｓｐ．、ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３から得る、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
細胞構成要素が、図２の配列を有するタンパク質を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
細胞構成要素が、図３の配列を有するタンパク質を含む、請求項２０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本願は、サイズが１０，９５２バイトであり、「ＣＰＳ３＿４－００９＿ＳｅｑｕｅｎｃｅＬｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」という名前の、ＡＳＣＩＩ文章として２０１０年７月１日に作成された、本明細書とともに電子的に提出された配列表を含む。これは、その全体が本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
緒言
本発明の態様は、アミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体およびその塩の調製および単離、鏡像異性体を分割する方法、およびラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる組成物および／または酵素を特定する方法に関する。複数の態様では、アミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体の塩を、追加的な緩衝能力を必要とすることなく、ヒドロラーゼ触媒による生物学的分割プロセスで使用して、鏡像異性体的に富化された１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体を製造する。
【背景技術】
【０００３】
多くの化合物の化学合成は、所望の鏡像異性体を選択的に製造するのに失敗しており、したがって、さらに加工する前に、分離または分割しなければならないラセミ混合物または鏡像異性体混合物がもたらされる。アミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体は、Ｃ型肝炎ウイルスＮＳ３プロテアーゼの阻害剤の調製のための主要中間体であると教示さ

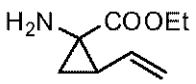
れている。非特許文献１を参照されたい。

【０００４】

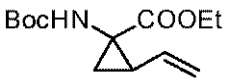
Ｂｅａｕｌｉｅｕらの論文は、ベンズアルデヒドとグリシン酸エチル塩酸塩を縮合し、次いで、トランス－１，４－ジブロモブタ－２－エンと反応させてラセミ型アミノビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステル（１）を形成させるステップを含む、そうした誘導体を製造するアプローチを教示している。次いでこの化合物上のアミン官能基を、窒素原子上でのＢＯＣ基（すなわち、－Ｃ（Ｏ）ＯＣ（ＣＨ$_3$）$_3$基）の付加によって保護する。保護された化合物（２）を酵素的分割に供し、任意選択でトシラート塩に転換させる。Ｂｅａｕｌｉｅｕらは、アミノエステル（１）の溶液を扱う場合、溶媒を減圧下、室温で除去すべきであると教示している。

【０００５】

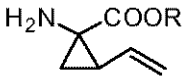
【化１】



(1)



(2)



(3)

保護されていない化合物を用いた直接分割法は、そうした誘導体へのより簡単で効率的な経路を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｐ．Ｌ．Ｂｅａｕｌｉｅｕら、「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ （１Ｒ，２Ｓ）－１－Ａｍｉｎｏ－２－ｖｉｎｙｌｃｙｃｌｏｐｒｏｐａｎｅｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ Ａｃｉｄ Ｖｉｎｙｌ－ＡＣＣＡ） Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ： Ｋｅｙ Ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｃ Ｖｉｒｕｓ ＮＳ３ Ｐｒｏｔｅａｓｅ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、７０巻（１５号）、５８６９～５８７９頁、２００５年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

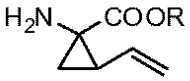
【０００７】

要旨

鏡像異性体的に富化されたアミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体を製造するための代替的アプローチを見出した。具体的には、１つのアプローチは、アミノエステル（３）のヒドロラーゼ触媒による生物学的分割を含む。

【０００８】

【化２】

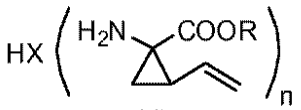


(3)

大量のアミノエステル（３）を得るために、酵素的分割の前に、溶媒および反応混合物から前記化合物を分離するのに蒸留を考慮するかもしれない。しかし、溶媒からのアミノエステル（３）の室温での真空分離は、効率的な大規模生産には適していない。さらに、最近、１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エステル、例えば（３）（Ｒはメチルまたはエチルである）は比較的低い熱安定性を有し、加速速度熱量計（ＡＲＣ）により、５０℃で発熱を示すことが発見されている。これらの要素は、大規模生産で使用するのに一般に望ましい加工上の選択肢を限定することになる。

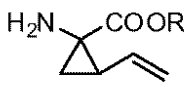
【０００９】
本発明の出願人らは、効率的な大規模生産を可能にするいくつかの新規な塩を発見した。驚くべきことに、これらの塩は、エナンチオが豊富なアミノエステル（３）のための実行可能な製造プロセスを可能にする特定の利点を有することが分かった。これらの利点は、以下の１つまたは複数を含む：塩の融点（代表的に＞１００℃）を超える温度に対する高い熱安定性；高価なＢＯＣ無水物反応物の回避；取扱いおよび貯蔵をより簡単にする改善された化合物形態（遊離アミンまたはＢＯＣ保護アミンが油状形態であるのに対して、固体である）；多大な時間を必要とする低温真空分離ステップの回避；低熱安定性化合物の温度を高める蒸留ステップの回避；次の生物学的分割ステップにおける、追加の緩衝剤を必要としない塩の直接使用への適切性。

【課題を解決するための手段】
【００１０】
一態様では、本発明は、式（４）の化合物
【００１１】
【化３】



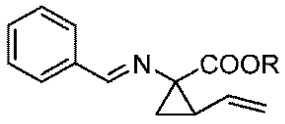
(4)

（式中、Ｒはアルキル基であり、ｎは１～３の整数であり、ＨＸは、リン酸、硫酸、β，β－ジメチルグルタル酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、マレイン酸、リンゴ酸、コハク酸、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸、４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸などの酸である）
を含む。
【００１２】
一態様では、本発明は、式（３）の化合物
【００１３】
【化４】



(3)

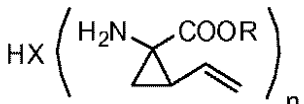
を上で規定した酸ＨＸと反応させることによって、上記化合物（４）を作製する方法を含む。
【００１４】
本発明の他の態様は、上記塩化合物（４）を、溶媒中で適切な（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシンアルキルエステルをトランス－１，４－ジハロブタ－２－エンでジアルキル化し、式（５）の中間体イミノエステルを酸ＨＸで加水分解し、得られた塩を濾過などにより単離することによって作製する方法を含む。
【００１５】
【化５】



(5)

本発明の他の態様は、ヒドロラーゼ触媒による生物学的分割プロセスにおいて、追加の

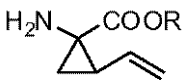
緩衝剤を必要とすることなく上記塩化合物（４）を使用することを含む。
【００１６】
本発明の他の態様は、ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる酵素を特定する方法を含む。その方法の実施形態は：ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を提供するステップと；細胞構成要素をラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物に暴露するステップと；ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を、鏡像異性体比の変化について試験するステップと；ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物に対して分割活性を有する酵素を単離するステップと；前記酵素を特定するステップとを含む。
【００１７】
本発明の態様は、１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割する方法を含む。その実施形態は：１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を提供するステップと；前記１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を細胞構成要素に暴露するステップを含む。
【図面の簡単な説明】
【００１８】
【図１】図１は、アキラル高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いて測定した、様々な酵素を用いた、５０ｇ／Ｌの１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルの加水分解速度を示すグラフである。
【図２】図２は、Ｌｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ　ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓから誘導され、鏡像異性体的に富化されたアミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体を製造するのに有用なタンパク質の配列表である。
【図３】図３は、Ｃｒｏｃｉｂａｃｔｅｒ　ａｔｌａｎｔｉｃｕｓから誘導され、鏡像異性体的に富化されたアミノビニルシクロプロパンカルボン酸誘導体を製造するのに有用なタンパク質の配列表である。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
第１の実施形態によれば、本発明は、式（４）の化合物
【００２０】
【化６】



(4)

（式中、Ｒはアルキル基である）
を含む。複数の実施形態では、Ｒは１～約２０個の炭素原子もしくは１～約６個の炭素原子を有するか、またはＲはメチルもしくはエチルである。特定の実施形態では、Ｒが２個超の炭素原子を有する場合、Ｒはｎ－アルキル基である。ＨＸは、リン酸、硫酸、β，β－ジメチルグルタル酸、クエン酸、ホウ酸、酢酸、マレイン酸、リンゴ酸、コハク酸、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸、４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸などの酸であり、ｎは約１～３の整数である。
【００２１】
塩は、式ＨＸの酸と式（３）の化合物
【００２２】

【化７】



(3)

を含む溶液を反応させることによって作製できる。

【００２３】

遊離アミノエステル（３）の濃度は、少なくとも約２０ｇ／Ｌ、少なくとも約５０ｇ／Ｌまたは少なくとも約７５ｇ／Ｌであってよく、一般に約２００ｇ／Ｌ未満または約１００ｇ／Ｌ未満であってよい。加える酸の量は、アミノエステルのモル当たり約０．３～２モル当量、約０．５～１．５モル当量または約１モル当量である。

【００２４】

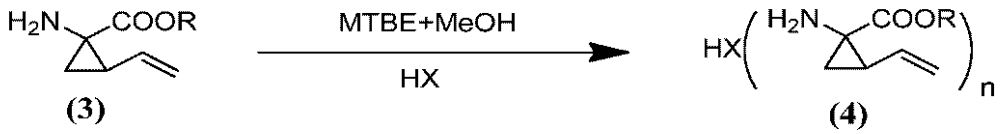
塩の形成は有機溶媒中でなされる。適切な溶媒は、その中で遊離塩基（すなわち、遊離アミノエステル）が良好な溶解性をもつが、その塩は低い溶解性をもつ溶媒である。有用な溶媒には、これらに限定されないが、メチルｔ－ブチルエーテル（ＭＴＢＥ）などのエーテル、酢酸エチルおよび酢酸イソプロピルなどのエステル、ジクロロメタンなどのハロゲン化炭化水素およびトルエンなどの炭化水素が含まれる。塩の形成は、溶媒と水溶性共溶媒（例えば、メタノール、エタノール、アセトンなど）との組合せを用いて実施することができる。共溶媒の量は一般に溶媒の全量に対して約５～２０％である。

【００２５】

したがって、複数の実施形態によれば、化合物（４）は以下のスキーム１のようにして作製することができる：

【００２６】

【化８】



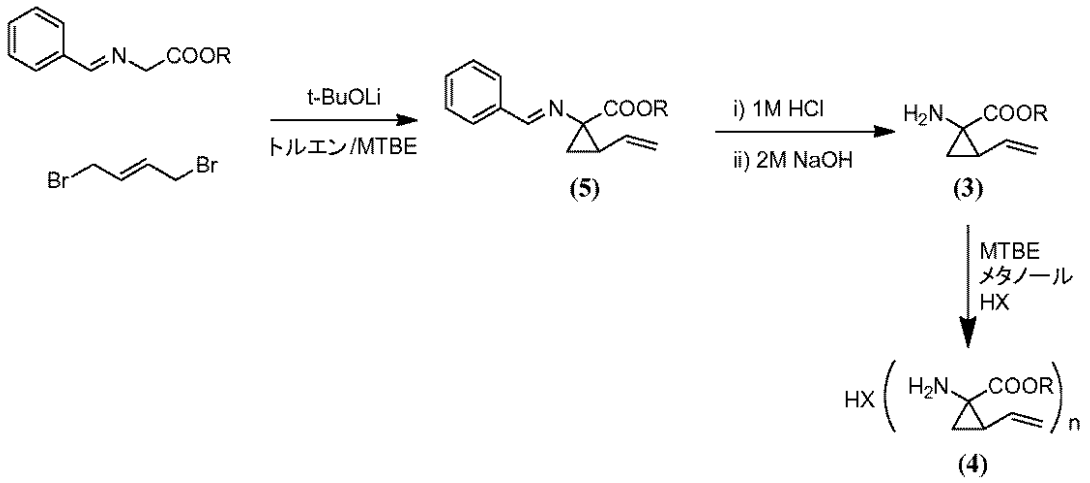
(3) (4)

スキーム　１

１つのアプローチによれば、（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシンアルキルエステルおよびトランス－１，４－ジハロブタ－２－エンから出発して、化合物（４）を、溶媒中で適切な（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシンアルキルエステルをトランス－１，４－ジハロブタ－２－エンでジアルキル化し、酸を用いて中間体イミノエステルを加水分解し（ただし、所望のＨＸ以外の酸を使用する場合、その加水分解ステップの後、ｐＨを約８～９に調節する）、溶媒抽出し、低級アルコールおよび酸ＨＸを添加し；遠心分離、濾過、デカンテーションなどによって塩を単離することによって作製することができる。このアプローチを、具体的な特定の試薬を示す以下のスキーム２に例示する。

【００２７】

【化９】



スキーム ２

ジアルキル化ステップは塩基によって促進される。有用な塩基には、これらに限定されないが、水酸化カリウム、ナトリウムｔ－ブトキシド、カリウムｔ－ブトキシド、リチウムｔ－ブトキシド、リチウムヘキサメチルシラザン、ナトリウムヘキサメチルシラザンおよびカリウムヘキサメチルシラザンなどが含まれる。トランス－１，４－ジハロブタ－２－エンはトランス－１，４－ジブロモブタ－２－エンであってよい。

【００２８】

ジアルキル化ステップは代表的に適切な溶媒中で行う。そうした溶媒の非限定的な例はトルエン、ＭＴＢＥ、ヘキサンおよびテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）である。有用な溶媒の例は、５０～７０容量％のＭＴＢＥを含むトルエンとＭＴＢＥとの混合物である。

【００２９】

トランス－１，４－ジブロモブタ－２－エンのモル当たりのリチウムｔ－ブトキシドまたは他の塩基の有用な量は、約２．１～２．６モル当量であり、トランス－１，４－ジブロモブタ－２－エンのモル当たりの（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシンアルキルエステルの有用な量は、約１．０５～１．５モル当量である。

【００３０】

次いでジアルキル化ステップから得られたイミノエステル（５）の溶液を加水分解する。１つのアプローチによれば、加水分解ステップは、これらに限定されないが、０．１Ｍ～１２Ｍまたは２Ｍ～６Ｍの濃度のＨＣｌ水溶液を含む塩酸、硫酸、硝酸またはリン酸などの適切な酸を用いることを含む。

【００３１】

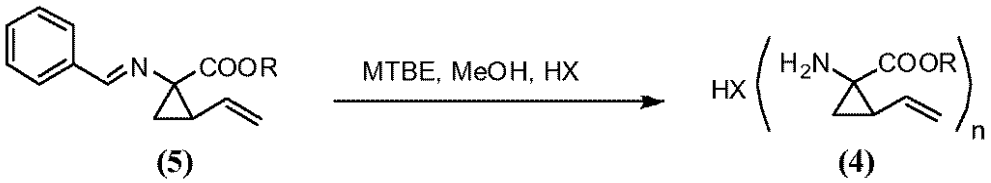
加水分解後、有機相を廃棄し、塩基を加えてｐＨを約８～９に上げる。適切な塩基には、これらに限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウムおよび重炭酸ナトリウムが含まれる。次いでアミノエステルを、ＭＴＢＥなどの適切な有機溶媒に抽出することができる。このアプローチ（所望のＨＸ以外の酸を用いる）では、次いで、上記した手順にしたがって酸ＨＸを加えて塩を形成させる。

【００３２】

スキーム３に例示する代替のアプローチによれば、ＨＸを用いて５の加水分解を直接行って対応する塩を形成させることができる。このアプローチにおいて、アミノエステルのモル当たりの加える酸ＨＸの量は、約０．３～２モル当量もしくは約０．５～１．５モル当量の範囲または約１モル当量である。

【００３３】

【化１０】

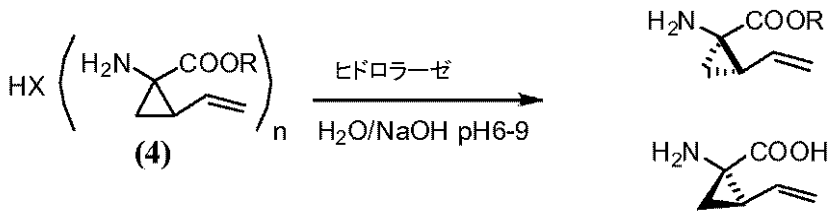


スキーム　3

次いで塩を、遠心分離、濾過、デカンテーションなどによって、熱的に安定であり、その後の反応で扱うのに容易である固体として単離する。スキーム４で示すように、化合物（４）を、ラセミ種の酵素的分割において用いて、所望の単一鏡像異性体を優先的に得ることができる。

【００３４】

【化１１】



スキーム　4

これらの塩は、塩を水に溶解し、塩基を加えてｐＨを６～９の範囲に調節し、ヒドロラーゼ酵素を加えることによって、ヒドロラーゼ触媒による酵素的分割において直接使用することができる。追加の緩衝剤は必要でない。生物体であって、適切な酵素をそれから得ることができる生物体の例には、Ｆｏｒｍｏｓａ　ｓｐ．、Ｐｓｙｃｈｒｏｓｅｒｐｅｎｓ　ｓｐ．、Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｓｐ．、Ｗｉｎｏｇｒａｄｓｋｙｅｌｌａ　ｓｐ．、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ　ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓ、Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ　ａｔｌａｎｔｉｃｕｓ、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ　ａｅｑｕｏｒｅａおよびＡｑｕａｍａｒｉｎａ，ｓｐ．　が含まれる。

【００３５】

さらなる態様では、本発明は、ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる組成物および／または酵素を特定する方法に関する。

【００３６】

複数の実施形態では、スキーム５に概略的に示すように、１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を分割することができる組成物および／または酵素を特定する方法を提供する。

【００３７】

【化１２】



スキーム　5

特定の実施形態では、ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を、１つまたは複数の生物体から細胞構成要素へ暴露させることができる。他の実施形態では、ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を試験して、その混合物の鏡像異性体比または分割に変化があるかどうかを判定することができる。

【００３８】

代替の実施形態では、分割活性を有する１つもしくは複数の酵素を単離または特定するために、分割活性を有することが示されている細胞構成要素を、分画または分離し、分割活性についてさらに試験することができる。追加の実施形態では、分割活性を有する１つもしくは複数の酵素は、酵素に加えて非限定的な例を挙げると、ペプチドまたはＲＮＡであってよい。本発明の特定の実施形態では、分割活性を有する１つもしくは複数の酵素をコード化する遺伝子を、当該分野で標準的な手法を用いて特定しクローン化することができる。例えば、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（ｅｄｓ）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、１．８４～１．８８、２００１年を参照されたい。

【００３９】

本明細書で用いる分割は、鏡像異性体のペアの一方の他方に対するレベル（鏡像異性体比）の変化に関する。したがって、分割は、一方の鏡像異性体を改変させて、それをもはや鏡像異性体ペアの一部でないようにするか、または一方の鏡像異性体を他方の鏡像異性体に転換させることによってもたらされる。分割の１つの非限定的な例は、エステルを切断して１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸を形成させることを含む。

【００４０】

本明細書で用いる、鏡像異性体的に富化された混合物は、鏡像異性体比が１：１以外である鏡像異性体のペアを含む混合物を指す。

【００４１】

本発明の複数の実施形態では、ラセミ混合物または鏡像異性体的に富化された混合物は、鏡像異性体ペアの２つの種を含む任意の組成物または溶液を含むことができる。さらなる実施形態では、鏡像異性体ペアの１つまたは複数の基を、例えばＢＯＣ基で保護することができる。他の実施形態では、鏡像異性体ペアの分子は、塩の一部であっても一部として存在してもよい。その塩の非限定的な例はリン酸塩、ナトリウム塩、硝酸塩またはカルシウム塩である。さらなる実施形態では、鏡像異性体ペアの分子は、遊離アミンの形態であってよい。特定の実施形態では、鏡像異性体ペアを含む混合物または溶液は、任意の溶媒または溶液を含むことができる。溶媒または溶液の例には、これらに限定されないが、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水および／またはポリソルベート界面活性剤（例えば、ＴＷＥＥＮ（登録商標）製品）を含む溶液が含まれる。

【００４２】

本発明の特定の実施形態では、ラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物を細胞構成要素に暴露することは、混合物と細胞構成要素を互いに接触させ、それによって細胞構成要素が少なくとも部分的に混合物を分割できるようにする任意の方法または手法を含むことができる。暴露の方法の例は、これらに限定されないが、流体接触および物理的接触を含む。

【００４３】

細胞構成要素への暴露は、統計的に有意な鏡像異性体比の変化が認められるまたは判定されるのに必要な任意の時間行うことができる。暴露時間の例は、これらに限定されないが、約０．１時間～約７２時間、約１時間～約４８時間、約８時間～約３０時間、約３０時間および約１２時間を含む。

【００４４】

暴露はまた任意の温度で行うことができる。複数の実施形態では、暴露を、おおよそ、生物体の通常の生存環境（細胞構成要素がそれから得られる）の温度で行う。暴露を行うことができる温度の例は、これらに限定されないが、約１℃～約９９℃、約１０℃～約５０℃および約３０℃を含む。

【００４５】

細胞構成要素への暴露は任意のｐＨ値で行うことができる。暴露を行うことができるｐＨ値の例は、これらに限定されないが、約ｐＨ１～約ｐＨ１２、約ｐＨ３～約ｐＨ１１、約ｐＨ６～約ｐＨ９、約ｐＨ９および約ｐＨ７を含む。

【００４６】
本発明の特定の実施形態では、細胞構成要素は、これらに限定されないが、細胞抽出物、細胞ペースト、細胞溶解物、無細胞抽出物、凍結乾燥された無細胞抽出物、凍結乾燥された細胞抽出物、凍結乾燥された細胞ペースト、凍結乾燥された細胞溶解物、超音波処理された細胞、単離されたタンパク質および／またはその組合せおよび／または画分および／またはフラグメントを含むことができる。
【００４７】
細胞構成要素は、任意の生物体または生物体の組合せ由来のものであってよい。生物体であって、細胞構成要素がそれから得られる生物体の例は、これらに限定されないが、動物、植物、細菌、古細菌、菌類、海洋生物、海藻、Ｆｏｒｍｏｓａ ｓｐ．、Ｐｓｙｃｈｒｏｓｅｒｐｅｎｓ ｓｐ．、Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｓｐ．、Ｗｉｎｏｇｒａｄｓｋｙｅｌｌａ ｓｐ．、Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓ、Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ ａｔｌａｎｔｉｃｕｓおよびＬｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ａｅｑｕｏｒｅａ、Ａｑｕａｍａｒｉｎａ，ｓｐ．、ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３を含む。
【００４８】
ＡＱＰ３１７は、ブダペスト条約に基づいて、２００７年3月9日付けのＮＣＩＭＢ４１４７５として工業用、食品用および海洋細菌の国立コレクション（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ，Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｍａｒｉｎｅ Ｂａｃｔｅｒｉａ（「ＮＣＩＭＢ」））、Ａｂｅｒｄｅｅｎ、Ｓｃｏｔｌａｎｄで供託されたものであり、ＡＱＰ３８３は、２００７年3月9日付けのＮＣＩＭＢ４１４７６としてＮＣＩＭＢで供託されたものである。
【００４９】
Ｌｅｅｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓは、ブダペスト条約に基づいて、２０１０年にＮＣＩＭＢで供託されたものである。Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ ａｔｌａｎｔｉｃｕｓは、ブダペスト条約に基づいて、２０１０年にＮＣＩＭＢで供託されたものである。Ｌｅｅｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ａｑｕｏｒｅａは、ブダペスト条約に基づいて、２０１０年にＮＣＩＭＢで供託されたものである。
【００５０】
本発明の代替の実施形態では、細胞構成要素はさらに分画または分離することができる。分画または分離の方法は、これらに限定されないが、様々な形態のクロマトグラフィー法、サイズ排除法、ゲル電気泳動法、等電点および沈殿分離法を含む。細胞構成要素は、硫酸アンモニウム沈殿法で分画することができる。
【００５１】
他の実施形態では、分割活性を有する酵素を、約３０％～４０％またはそれを超える硫酸アンモニウム濃度で優先的に沈殿させることができ、かつ／または約５０％～６０％またはそれを超える硫酸アンモニウム濃度で優先的に沈殿させることができる。
【００５２】
以下の実施例で、特定の具体的な態様および実施形態をさらに例示する。これらの実施例は例示を目的としたのに過ぎず、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきでは全くない。
【実施例】
【００５３】
（実施例１）
１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルの合成。
【００５４】
ＭＴＢＥ（１．５Ｌ）中のトランス－１，４－ジブロモ－２－ブテン（３４０．６ｇ、１．３３ｍｏｌ）の撹拌溶液に、リチウムｔｅｒｔ－ブトキシド（３１８ｇ、３．３２５ｍｏｌ）を加える。得られた懸濁液を１５℃未満に冷却し、反応温度を確実に１５～２０℃に保持しながら、トルエン（８７５ｍＬ）中の（Ｅ）－Ｎ－フェニルメチレングリシン

メチルエステル（３１０ｇ、１．７５ｍｏｌ）の溶液を６０分間かけて徐々に加える。２０～２５℃でさらに2時間撹拌した後、ＮａＣｌ溶液（２０重量％、２Ｌ）を加えて反応をクエンチする。有機相を１Ｍ　ＨＣｌ溶液（１．７５Ｌ、１．７５ｍｏｌ）と混合し、２０℃で2時間激しく撹拌する。その塊から一定分量を取って中間体イミンがすべて加水分解されていることを確認する。次いで相を分離し、水相を５００ｍｌ　ＭＴＢＥで洗浄する。次いで水相を１３℃に冷却し、ｐＨをＮａＯＨ溶液（６Ｍ、２００ｍＬ）で約９に調節する。次いで混合物をＭＴＢＥ（５Ｌ）で抽出し、１８６ｇの１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルを含む溶液を得る。

【００５５】

（実施例２）

１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルリン酸塩の合成。

【００５６】

オーバーヘッドスターラーを備えた丸底フラスコに、ＭＴＢＥ（１１０ｍＬ）中の１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステル（７ｇ）の溶液を入れる。次いでメタノール（１０ｍＬ）を加え、混合物を室温で撹拌する。オルトリン酸（３．５ｍＬ）を滴下し、沈殿物を形成させる。添加が完了した後、撹拌をさらに６０分間続行する。次いでリン酸塩を濾過により回収し、真空下で乾燥する。リン酸塩を１１．７２ｇ（約９８％）のベージュ色粉末として得る。

【００５７】

^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（Ｄ$_{4}$－ＭｅＯＨ）：　δ　５．８２－５．７０　（ｍ，１Ｈ），５．４２　（ｄｄ，Ｊ＝１７＆１，１Ｈ），５．２２　（ｄｄ，Ｊ＝１０＆１，１Ｈ），３．８６　（ｓ，３Ｈ），２．４９　（ｑ，Ｊ＝９，１Ｈ），１．８５－１．８０（ｍ，１Ｈ），１．８０－１．７３（ｍ，１Ｈ）。

【００５８】

（実施例３）

１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルリン酸塩の合成。

【００５９】

グラスライン製反応器中で、実施例１に記載した合成手順によって、ＭＴＢＥ（５６６Ｋｇ）中のほぼ１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステル（７０Ｋｇ）の溶液を調製する。溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し濾過した後、メタノール（４０Ｋｇ）を加える。１５℃未満の温度で８０％リン酸（６０Ｋｇ）を４０分間かけて徐々に加える。この間に沈殿物が形成する。添加が完了したら、スラリーを１０℃未満で少なくともさらに１時間撹拌する。固体を濾過により収集し、ＭＴＢＥで洗浄し、フィルターから貯蔵容器へ、代表的に２３％ＭＴＢＥ含量を有する湿潤した灰白色濾過ケーキとして排出する。約１３８．５ｋｇの湿潤濾過ケーキを単離する。これは、無溶媒ベースで約１０６．５ｋｇ（約９０％収率）の１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルホスフェートに相当する。

【００６０】

（実施例４）

１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩の合成。

【００６１】

丸底フラスコに、ＭＴＢＥ（１００ｍＬ）中の１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステル（８．５ｇ）の溶液を入れる。次いでメタノール（１２ｍＬ）を加え、混合物を室温で撹拌する。オルトリン酸（６ｍＬ）を滴下すると、沈殿物の形成が始まる。添加が完了した後、撹拌をさらに2時間続行する。濾過によりリン酸塩を回収し、ＭＴＢＥで洗浄し、真空下で乾燥する。約９．４ｇ（７０％収率）の灰白色固体を得る。

【００６２】

^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（Ｄ$_{4}$－ＭｅＯＨ）：　δ　５．８１－５．６７（ｍ，１Ｈ），５．３８　（ｄｄ，Ｊ＝１６＆１，１Ｈ），５．１９（ｄｄ，Ｊ＝１１＆１，１Ｈ），４．２８

（ｑ，Ｊ＝７，２Ｈ），２．４３（ｑ，Ｊ＝９，１Ｈ），１．８０－１．６８（ｍ，２Ｈ），１．３１（ｔ，Ｊ＝７，３Ｈ）。

【００６３】

（実施例５）

Ｎ－フェニルメチレングリシンメチルエステルからの１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルリン酸塩の合成。

【００６４】

ＭＴＢＥ（５０ｍＬ）中にスラリー化したリチウムｔ－ブトキシド（３１．８ｇ）に、ＭＴＢＥ（１００ｍＬ）に溶解したトランス－１，４－ジブロモ－２－ブテン（３４ｇ）を加える。次いでこの撹拌した反応混合物に、トルエン（９０ｇ）中のＮ－フェニルメチレングリシンメチルエステル（３１ｇ）の溶液を加える。添加の間、温度を１５℃未満に保持し、続いて反応物を周囲温度で２時間撹拌する。ＮａＣｌ溶液（２０重量％、２００ｍＬ）を加えて反応物をクエンチする。水相を廃棄し、有機相に約１５容量％のメタノールを加える。溶液を５℃未満に冷却し、１モル当量の８５％リン酸を徐々に加えてリン酸塩を沈澱させる。混合物を６０分間撹拌し、沈殿物を濾過により回収し、ＭＴＢＥで洗浄する。ＨＰＬＣで約９７％の純度を有する、３２．３ｇの量の１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルリン酸塩（トランス－１，４－ジブロモ－２－ブテンに基づいて８５％収率）を得る。

【００６５】

（実施例６）

１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩のエステラーゼ触媒による生物学的分割。

【００６６】

２０ｍＬのステムブロック管（ｓｔｅｍ　ｂｌｏｃｋ　ｔｕｂｅ）に、脱イオン水（４ｍＬ）に溶解した１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩（０．５ｇ、２ｍｍｏｌ）を入れる。１Ｍ　ＮａＯＨ溶液（２ｍＬ）を滴下して溶液のｐＨを８に調節する。混合物を２５℃で連続的に撹拌し、凍結乾燥したＡＱＰ３１７（Ｆｏｒｍｏｓａ　ａｌｇａｅ）（２００ｍｇ）を加える。撹拌を２５℃で４１時間続行し、次いでＨＰＬＣ分析により転換率が約５０％に達したことを判定する。ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）分析により、残留エステルの鏡像異性体過剰率が９９％に達していることが示される。

【００６７】

（実施例７）

エステラーゼ活性のための一次スクリーニング。

【００６８】

基質、１－アミノ－２－ビニル－シクロプロパンカルボン酸メチルエステル（２００μＬ、リン酸緩衝生理食塩水中に１０ｇ／Ｌ）を、ウェル当たり１ｍｇの凍結乾燥された細胞ペーストを含むスクリーニングプレートに塗布する。３０℃で終夜インキュベーションした後、反応物をＨＰＬＣ移動相中にサンプリングし、アミノ酸の形成を分析する。疑わしいヒットのさらなる分析を、キラルＧＣによりＣｈｉｒａｓｉｌ　Ｄｅｘ　ＣＢカラム、８３０ＫＰａ（２０ｐ．ｓ．ｉ．）のヘリウムキャリアガスで、１００℃のオーブン温度（等温）で、トリフルオロアセテートとしての残留エステルの分析により実施する。２３０の海洋微生物のスクリーニングにより、残留エステル鏡像異性体過剰率９０％を超える１２のヒットが確認された微生物を特定する。

【００６９】

（実施例８）

Ａｑｕａｐｈａｒｍ（商標）生物体スクリーニング。

【００７０】

凍結乾燥された生物体調製品（Ａｑｕａｐｈａｒｍ　Ｂｉｏｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｌｔｄ．から入手）の１２のヒットが確認されたもののうちの８つからなる約４ｍｇのサブセ

ットを、リン酸緩衝生理食塩水＋０．１容量％のＴｗｅｅｎ８０（ｐＨ７）中、またはリン酸緩衝液ｐＨ９中、１ｍＬの１０ｇ／Ｌの１－アミノ－２－ビニル－シクロプロパンカルボン酸メチルエステルと一緒に、ガラス製のシンチレーションバイアル瓶に量り込む。これらの混合物を３０℃、３００ｒｐｍで３０時間インキュベートする。反応後の残留エステルをＧＣによりトリフルオロ酢酸誘導体として分析する。結果を表１に示す。すべての試料は、ｐＨ９よりｐＨ７でより活性である。

【００７１】

一次培養プレートからの回収を試みて、ＡＱＰ２５０は不可能であることが判明する。類似した形態を有し同じ供給源から単離された、Ｐｓｙｈｃｒｏｓｅｒｐｅｎｓ　ｓｐと特定されておりＡＱＰ３８３と指定した他の生物体を代替品として使用する。アッセイすると、これも所望の活性を有することが実証される。

【００７２】

【表１】

表1

生物体	残留エステルの鏡像異性体過剰率						
	pH 7				pH 9		
	3 時間	23 時間	46 時間	96 時間	3 時間	23 時間	
AQP029		15%	ND	ND		2%	*Shewanella baltica*
AQP246	0%	11%	ND	ND	-3%	1%	*Shewanella baltica*
AQP237	0%	9%	ND	ND	-2%	0%	
AQP250	2%	32%	ND	ND	-1%	2%	
AQP272	0%	7%	14.6%	55.8%	-1%	5%	*Winogradskyella thalassocola*
AQP317	2%	25%	60.4%	93.5%	1%	22%	*Formosa algae*
AQP331	2%	17%	39.1%	92.0%	-10%	10%	*Winogradskyella thalassocola*
AQP332	1%	ND	ND	ND	-2%	ND	*Aquamarina* sp.

（実施例９）

５０ｇ／Ｌの基質濃度での活性。

【００７３】

２００ｍｇの凍結乾燥された細胞ペーストと２５０ｍｇのメチル－１－アミノ－２－ビニル－シクロプロパンカルボキシレートリン酸塩を含む反応物を合計５ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水中に調製し、アキラルＨＰＬＣを用いて経時的にその転換をモニターする。２つの生物体、ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３は、アキラルＨＰＬＣで判断して、他の確認済みヒットと比較して著しく高い活性度を示し、これらの濃度で基質を完全に分割している。結果を図１にプロットする。

【００７４】

（実施例１０）

１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩のＡｌｃａｌａｓｅ触媒による生物学的分割

脱イオン水（４５ｍＬ）中の１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩（２ｇ、７．９ｍｍｏｌ）をジャケット付き容器に入れ、２Ｍ水酸化ナトリウム溶液（５ｍＬ）を加えることでｐＨを８に調節する。混合物を３５℃で連続的に撹拌し、Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓから販売されているＡｌｃａｌａｓｅ（登録商標）酵素溶液（６ｍＬ）を加える。混合物を連続的に撹拌し、ｐＨを８．１５に保持する。一定分量（１００μＬ）を定期的に取る。ＧＣ分析はｅ．ｅ．（鏡像体過剰率）＝５．７％（ｔ＝２４時間）、ｅ．ｅ．＝１４．３％（ｔ＝４８時間）およびｅ．ｅ．＝２１．４％（ｔ＝７２時間）を示す。７２時間後でも有意の転換は起こっておらず、反応は停止している。反応はスキーム５で表される。

【００７５】

（実施例１１）

Ｆｏｒｍｏｓａ ａｌｇａｅ ＡＱＰ３１７の無細胞抽出物の調製。

【００７６】

ＡＱＰ３１７、Ｆｏｒｍｏｓａ ａｌｇａｅの無細胞抽出物を、５００ｍＬ培養液から（ｅｘ ｏｆ）の５００ｍｇの凍結乾燥された細胞ペーストを５０ｍＬのＰＢＳに再懸濁させて調製する。細胞懸濁液を、１５μｍの振幅、４℃で、１０秒間オン１５秒間オフで３０分間、超音波処理する。残渣を４℃、１０，０００Ｇで１０分間遠心分離により除去する。

【００７７】

無細胞抽出物を一連の硫酸アンモニウム沈澱法に供し、沈殿物を４℃、１０，０００Ｇで２０分間遠心分離により回収する。Ｒ．Ｍ．Ｃ．Ｄａｗｓｏｎら、ｅｄｓ．、Ｄａｔａ ｆｏｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ、５３７～５３９頁、１９８６年を参照されたい。各ペレットを５ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水（Ｓｉｇｍａ Ｐ４４１７）に再懸濁する。タンパク質含量を、ＰｉｅｒｃｅからのＣｏｏｍａｓｓｉｅ Ｐｌｕｓ試薬を用いてアッセイする。同様の実験をＰｓｙｃｈｒｏｓｅｒｐｅｎｓ ＡＱＰ３８３を用いて実施する。活性は３０～４０％で降下することが示される。

【００７８】

（実施例１２）

生体内変換アッセイ。

【００７９】

活性を、リン酸緩衝生理食塩水中に１０ｍＭの１－アミノ２－ビニルシクロプロパンカルボン酸エチルエステルリン酸塩を含む１ｍＬシンチレーションバイアル瓶でアッセイする。２．５時間後に反応物をサンプリングし、ＨＰＬＣ移動相に１：５で希釈し次いで分析する。次いで転換率を、存在する酵素活性単位数を算出するために用いる。結果を表２に示す。

【００８０】

（実施例１３）

分割活性の単離。

【００８１】

ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３の無細胞抽出物を標準的な手法を用いて分画する。種々の画分を、１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸のエステルのラセミ混合物または一部鏡像異性体的に富化された混合物に暴露し、３０℃で３０時間インキュベートする。次いで異なる画分を、上記に説明したような鏡像異性体比の変化について試験する。分割活性を有する画分を、ゲル電気泳動によりさらに分画および／または分離する。さらなる画分およびゲル単離物を分割活性について試験する。分割活性を有する単一化合物をエステラーゼとして単離し特定する。単離したエステラーゼを、カルボキシルおよび／もしくはアミノペプチド配列決定またはタンパク質質量分析にかける。次いで配列情報を用いて、エステラーゼをコードする遺伝子の単離のための推定プライマー対を作り出すか、または全遺伝子の合成ができるようにする。ＡＱＰ３１７およびＡＱＰ３８３、Ｌｅ

ｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ｂｌａｎｄｅｎｓｉｓ、Ｃｒｏｃｅｉｂａｃｔｅｒ ａｔｌａｎｔｉｃｕｓならびにＬｅｕｗｅｎｈｏｅｋｉｅｌｌａ ａｑｕｏｒｅａのＤＮＡ抽出物を作製し、ＰＣＲを、推定プライマー対を用いて実施する。ＰＣＲ産生物を分析し、エステラーゼをコード化する配列を単離し、ベクター中にクローン化し、次いで配列決定する。

【００８２】

（実施例１４）

クローン化したポリペプチドの活性の実証

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、当業者に公知の標準的な手法を用いて、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ発現系にクローン化する。

【００８３】

組み換えエステラーゼの培養物を２５℃で成長させ、２４時間の成長後に誘発させ、誘発後に間隔を置いて１ｍＬ試料を取り、マイクロ遠心分離にかける。ペレットを１ｍＬ、２０ｇ／Ｌの１－アミノ－２－ビニルシクロプロパンカルボン酸メチルエステルリン酸塩ｐＨ７に再懸濁させ、２５℃でインキュベートする。１４４時間反応させた後、残留エステルをＭＴＢＥで抽出し、トリフルオロ酢酸無水物で誘導化し、ガスクロマトグラフィーで分析する。残留エステルは８７％の鏡像異性体過剰率を有する。

【００８４】

表２

画分	全細胞	全超音波処理物	超音波処理物 S/N	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70+ S/N
容量(mL)	50	50	50	5	5	5	5	5	5	50
タンパク質 (mg/mL)	10	0.71	0.71	0.17	0.13	0.11	0.15	3.51	1.44	0.09
総タンパク質 (mg)			35.5	0.8	0.6	0.5	0.7	17.6	7.2	4.6
タンパク質収率 (%)				2	2	2	2	49	20	13
累積タンパク質収率 (%)				2	4	6	8	57	77	90
転換率 *	17	15	21	1	1	1	1	10	6	5
アッセイした容量(mL)	0.5	0.5	0.5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.5
容量活性 **	0.0229	0.0194	0.0277	0.0165	0.0123	0.0089	0.0101	0.1288	0.0809	0.0070
合計単位	1.15	0.97	1.39	0.08	0.06	0.04	0.05	0.64	0.40	0.35
活性収率(%)				6	4	3	4	46	29	25
累積活性収率(%)				6	10	14	17	64	93	118

* ２．５時間でのパーセント

** 単位はμmol／分／mLである

【図２－１】

Fig. 2

Met Lys Asn Ile Lys Asn Leu Ile Thr Ala Val Phe Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Val Ala Ala Gln Ala Gln Thr Glu Ala Tyr Val Arg Glu His Tyr Asp
20 25 30

Lys Lys Glu Val Lys Ile Lys Met Arg Asp Gly Val Met Leu His Thr
35 40 45

Thr Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Lys Ser Gln Glu Tyr Pro Ile Leu Met
50 55 60

Met Arg Thr Pro Tyr Ser Cys Ala Pro Tyr Gly Glu Glu Asn Phe Lys
65 70 75 80

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Gln Phe Met Val Glu Glu Gly Asn Ile Phe
85 90 95

Val Gln Gln Asp Val Arg Gly Arg Trp Asn Ser Glu Gly Val Tyr Asp
100 105 110

Asn Met Arg Ala Tyr Ile Pro Asn Lys Lys Gly Lys Gln Val Asp Glu
115 120 125

Ala Ser Asp Thr Tyr Asp Thr Ile Asp Trp Leu Val Lys Asn Val Asp
130 135 140

Asn Asn Asn Gly Asn Val Gly Thr Trp Gly Ile Ser Tyr Pro Gly Phe
145 150 155 160

Tyr Ala Thr Tyr Ser Leu Leu Ser Glu His Pro Ala Leu Lys Ala Val
165 170 175

Ser Pro Gln Ala Cys Ile Ser Asp Phe Phe Phe Asp Asp Phe His His
180 185 190

【図２－２】

Asn Gly Ala Phe Leu Glu Ser Tyr Trp Arg Ala Ile Ser Leu Phe Gly
195 200 205

Tyr Met Lys Asp Glu Pro Val Thr Lys Pro Trp Tyr Ala Phe Pro Asp
210 215 220

Leu Pro Ser Gln Asp Gln Tyr Gln Phe Phe Leu Asp Ala Gly Pro Leu
225 230 235 240

Thr Asn Leu Asp Ala Tyr Tyr Lys Glu Asp Asn Val Phe Trp Gln Gln
245 250 255

Ile Lys Asp His Pro Asn Tyr Asp Glu Phe Trp Arg Ser Arg Gly Ile
260 265 270

Ile Gln His Leu Asn Asp Ile Lys Pro Ala Val Met Val Val Gly Gly
275 280 285

Leu Phe Asp Ala Glu Asp Leu Tyr Gly Pro Phe Asn Thr Tyr Arg Lys
290 295 300

Ile Glu Glu Thr Ser Asp Asn Tyr Asn Ile Leu Val Tyr Gly Pro Trp
305 310 315 320

Ser His Gly Asp Trp Ala Arg Ser Ser Glu Arg Gln Ala Ile Gly Asn
325 330 335

Val Tyr Phe Gly Asp Asn Leu Ser Arg Asp Phe Gln Gln Asn Tyr Glu
340 345 350

Thr Val Phe Phe Asn His Phe Leu Lys Asn Asp Gly Glu Gly Thr Ile
355 360 365

Asp Phe Pro Glu Ala Ser Met Tyr Asp Ser Gly Ser Arg Glu Trp Asp
370 375 380

Ser Tyr Ala Gln Trp Pro Pro Lys Ala Ala Glu Thr Lys Ser Phe Tyr
385 390 395 400

【図２－３】

Leu Gly Ala Asp Gln Lys Leu Thr Glu Asn Ala Ile Ala Asp Tyr Ala
405 410 415

Asn Ala Phe Val Ser Asp Pro Ser Lys Pro Val Pro Tyr Ser Glu Asp
420 425 430

Ile Lys Met Val Phe Thr Pro Arg Lys Tyr Met Thr Asp Asp Gln Arg
435 440 445

Phe Ala Ala Arg Arg Pro Asp Val Leu Val Tyr Glu Thr Glu Val Leu
450 455 460

Asp Glu Asp Met Thr Ile Thr Gly Glu Ile Leu Ala Lys Leu Lys Val
465 470 475 480

Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Asp Trp Val Val Lys Val Ile Asp Val
485 490 495

Tyr Pro Asn Asp Ala Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Lys Tyr Leu Lys
500 505 510

Met Gly Asn Tyr His Met Met Val Arg Ser Glu Val Met Arg Gly Arg
515 520 525

Phe Arg Glu Ser Phe Arg Ala Pro Lys Ala Phe Glu Pro Asn Gln Lys
530 535 540

Thr Glu Val Asp Leu Thr Leu Gln Gly Val Asn His Thr Phe Leu Lys
545 550 555 560

Gly His Lys Val Gln Ile Gln Ile Gln Ser Thr Trp Phe Pro Leu Ile
565 570 575

Asp Arg Asn Pro Gln Thr Phe Val Pro Asn Ile Tyr Lys Ala Ser Ala
580 585 590

【図２－４】

Glu Asp Phe Gln Lys Gln Thr His Thr Val Phe Gly Asp Ser Glu Ile
595 600 605

Gln Phe Asn Val Leu Lys
610

【図３－１】

Fig. 3

Met Lys Ile Gln Asn Tyr Val Thr Leu Ile Leu Val Cys Phe Ala Cys
1 5 10 15

Phe Gln Ile Ser Cys Ala Gln Asp Ser Ala Glu Pro Val Tyr Asp Val
20 25 30

Ser Ala His Tyr Asn Lys Gln Glu Val Asp Ile Pro Met Arg Asp Gly
35 40 45

Val Thr Leu His Thr Thr Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Thr Ser Lys Lys
50 55 60

Tyr Pro Met Ile Met Gln Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Gly
65 70 75 80

Glu Gly Gln Phe Lys Ser Lys Ile Gly Pro Asn Glu Tyr Met Met Lys
85 90 95

Asp Gly Tyr Ile Val Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Arg Trp Met Ser
100 105 110

Glu Gly Asp Tyr Asp Asn Met Arg Ala Tyr Ile Pro Asn Lys Lys Lys
115 120 125

Gly Gln Val Asp Glu Ala Ser Asp Thr Tyr Asp Thr Ile Asp Trp Leu
130 135 140

Val Lys Asn Val Asp Asn Asn Asn Gly Asn Val Gly Thr Trp Gly Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Tyr Ser Leu Leu Asp Ser His Pro
165 170 175

Ala Leu Lys Ala Val Ser Pro Gln Ala Cys Ile Gly Asp Phe Phe Phe
180 185 190

【図３－２】

Asp Asp Phe His His Asn Gly Ala Tyr Leu Leu Ser Tyr Trp Arg Ala
195 200 205

Thr Ala Val Phe Gly Tyr Gln Thr Glu Pro Thr Thr Glu Ser Trp Tyr
210 215 220

Asp Phe Pro Gln Leu Asp Thr Gln Asp Gln Tyr Gln Phe Phe Leu Asp
225 230 235 240

Asn Gly Pro Leu Ser Asn Leu Asp Glu Tyr Tyr Lys Glu Asp Asn Glu
245 250 255

Phe Trp Thr Gln Leu Lys Glu His Pro Asn Tyr Asp Glu Phe Trp Lys
260 265 270

Ser Arg Gly Ile Ile Gln His Leu Lys Asp Ile Lys Pro Ala Val Met
275 280 285

Thr Val Gly Gly Leu Phe Asp Ala Glu Asp Leu Tyr Gly Pro Tyr Glu
290 295 300

Thr Tyr Lys Asn Ile Glu Ala Lys Ser Asp Asn Phe Asn Ile Met Val
305 310 315 320

Phe Gly Pro Trp Ser His Gly Asp Trp Ala Arg Asn Lys Glu Arg Gln
325 330 335

Ala Ile Gly Asn Val Tyr Phe Gly Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Tyr Gln
340 345 350

Lys Asp Leu Glu Thr Pro Phe Phe Glu His Phe Leu Lys Asn Asp Gly
355 360 365

Lys Gly Asp Val Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ile Tyr Asp Ser Gly Thr
370 375 380

Lys Glu Trp Lys Ser Tyr Asp Ser Trp Pro Pro Glu Asn Ala Thr Lys
385 390 395 400

【図３－３】

Lys Thr Met Tyr Leu Gly Ser Ser Gln Lys Leu Asn Ser Leu Pro Glu
405 410 415

Ala Thr Gln Glu Thr Lys Phe Ile Ser Asp Val Asn Lys Pro Val Pro
420 425 430

Tyr Ser Glu Asp Ile Lys Met Val Phe Thr Pro Arg Lys Tyr Met Thr
435 440 445

Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ala Arg Arg Pro Asp Val Leu Val Phe Glu
450 455 460

Thr Pro Val Met Thr Glu Asp Met Thr Leu Ala Gly Asp Ile Leu Ala
465 470 475 480

Lys Leu Gln Val Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Asp Trp Val Val Lys
485 490 495

Val Ile Asp Val Tyr Pro Ala Asp Ala Lys Asp Thr Glu Glu Thr Gln
500 505 510

Asp His Leu Lys Met Ser Asn Tyr His Met Met Val Arg Ser Glu Val
515 520 525

Leu Arg Gly Arg Phe Arg Asn Ser Phe Glu Gln Pro Glu Pro Phe Val
530 535 540

Pro Asn Gln Lys Thr Pro Val Thr Ile Lys Leu Gln Asp Val His His
545 550 555 560

Thr Ile Lys Lys Gly His Lys Leu Gln Ile Gln Val Gln Ser Thr Trp
565 570 575

Phe Pro Tyr Ile Asp Leu Asn Pro Gln Thr Tyr Val Asp Asn Ile Phe
580 585 590

【図３－４】

Glu Ala Lys Ala Ser Asp Phe Lys Thr Gln Thr His Ser Val Phe Gly
595 600 605

Asp Ser Ala Ile Glu Phe Ser Ile Leu Asn
610 615

【図１】

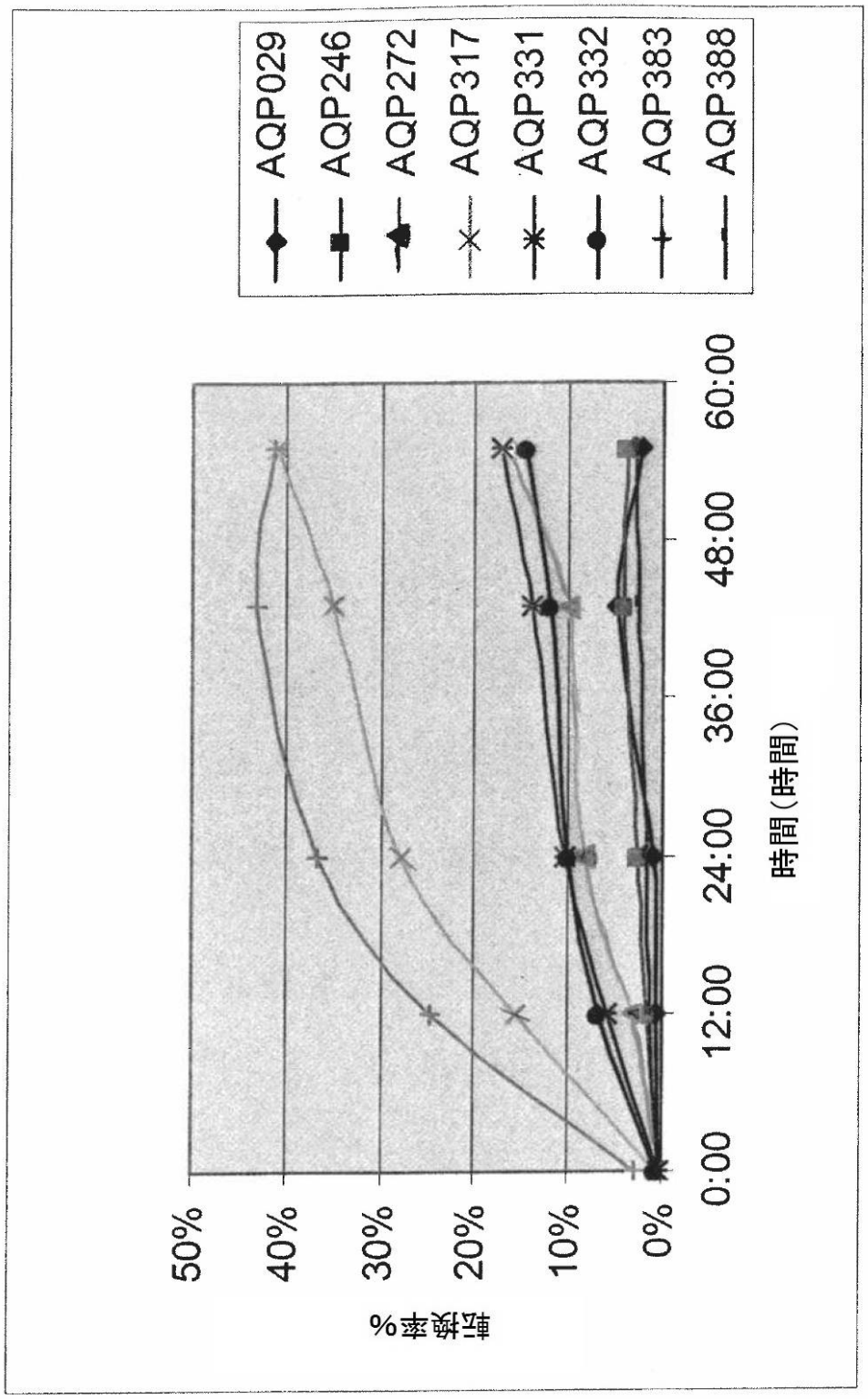


Fig.1

【配列表】
2012532146000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/040900

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C 229/32(2006.01)i, C07C 227/14(2006.01)i, C07C 227/04(2006.01)i, C07C 227/40(2006.01)i, C12P 13/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07C 229/32; C07K 5/08; A61K 31/401

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & GOOGLE SCHOLAR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEAULIEU, P. L. et al., Synthesis of (1R,2S)-1-Amino-2-vinylcyclopropane-carboxylic Acid Vinyl-ACCA) Derivatives: Key Intermediates for the Preparation of Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease, Journal of Organic Chemistry (2005), 70(15), pp. 5869-5879, ISSN: 0022-3263	21-24
A	See the abstract; schemes 3, 4, 7; table 1; and experimental section	1-20
A	THORSTENSSON, F. et al., Synthesis of novel potent hepatitis C virus NS3 protease inhibitors: Discovery of 4-hydroxy-cyclopent-2-ene-1,2-dicarboxylic acid as a N-acyl-L-hydroxyproline bioisostere, Bioorganic & Medicinal Chemistry (2007), 15(2), pp. 827-838, ISSN: 0968-0896 See figure 5 and expemental	1-24
A	WO 2008-064066 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 29 May 2008 See scheme XII; page 74, lines 9-19	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 FEBRUARY 2011 (22.02.2011)	**22 FEBRUARY 2011 (22.02.2011)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	KANG Young Jin Telephone No. 82-42-481-8391

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/040900

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008-064066 A1	29.05.2008	AU 2007-323793 A1	29.05.2008
		AU 2007-323793 A1	29.05.2008
		CA 2669856 A1	29.05.2008
		CN 101652383 A	17.02.2010
		CN 101652383 A	17.02.2010
		EA200900697A1	26.02.2010
		EP 2086995 A1	12.08.2009
		IL198741D0	17.02.2010
		JP 2010-510234 A	02.04.2010
		JP 2010-510234 T	02.04.2010
		KR 10-2009-0083462 A	03.08.2009
		KR20090083462A	03.08.2009
		MX 2009004943 A	19.05.2009
		NO20091871A	31.07.2009
		US 2009-0274648 A1	05.11.2009
		US 2009-274648 A1	05.11.2009
		US 7888464 B2	15.02.2011
		WO 2008-064066 A1	29.05.2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　9/18　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ　9/18	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 タイラー, イアン エヌ.
イギリス国 シービー７ ４ワイエイチ ケンブリッジシャー, イーリー, ヘンリー ウェイ 3
(72)発明者 ロイド, マイケル シー.
イギリス国 シービー６ ２ダブリューダブリュー ケンブリッジシャー, イーリー, ウィスジー ウェイ ５２
(72)発明者 ヘセルタイン, エイドリアン
イギリス国 エルエス２６ ０ティーエル ウェスト ヨークシャー, リーズ, ロースウェル, スウィゼンズ グローブ １

Ｆターム(参考) 4B024 AA03 BA11 CA02 DA09 EA04
4B050 CC01 CC03 DD20 LL05
4B063 QA18 QQ32 QR57 QS17 QS28 QX01
4B064 AD76 AE41 CA21 CB03 DA20
4H006 AA01 AA02 AB20 AB84 AC28 AC52 BB11 BB12 BB15 BB17
BJ20 BT22 BU42