

(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2011-525533

(P2011-525533A)

(43) 公表日 平成23年9月22日 (2011.9.22)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 D 209/52	(2006.01)	C O 7 D 209/52	C S P	4 B O 6 4
C O 7 D 487/14	(2006.01)	C O 7 D 487/14		4 C O 5 O
C 1 2 P 17/10	(2006.01)	C 1 2 P 17/10	Z N A	4 C 2 O 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁)

(21) 出願番号	特願2011-516521 (P2011-516521)	(71) 出願人	506038257 コデクシス、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 63, レッドウッド シティ、 ペノ ブスコット ドライブ 200
(86) (22) 出願日	平成21年6月23日 (2009.6.23)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月18日 (2011.2.18)	(72) 発明者	ミッツ、 ベンジャミン アメリカ合衆国、カリフォルニア・940 02、ベルモント、ヒル・ストリート・1 010
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/048255	(72) 発明者	ミューリー、 シーラ アメリカ合衆国、カリフォルニア・945 55、フレモント、ノースランド・テラス ・5884
(87) 国際公開番号	W02010/008828		
(87) 国際公開日	平成22年1月21日 (2010.1.21)		
(31) 優先権主張番号	61/075, 243		
(32) 優先日	平成20年6月24日 (2008.6.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 実質的に立体異性的に純粋な縮合二環式プロリン化合物の調製のための生体触媒法

(57) 【要約】

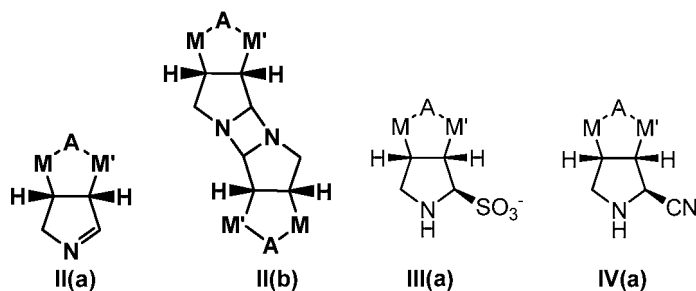
本開示は、本明細書において述べた通りである構造式 I I から V I I の実質的に立体異性的に純粋な縮合二環式プロリン化合物、それらの調製のための生体触媒法、およびそれらの方法に用いられる酵素を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造式 I I (a)、I I (b)、I I I (a) または I V (a)

【化 1】



10

による実質的に立体異性的に純粋な化合物（それらの塩および水和物を含む。）〔式中、
Aは、O、 $\text{C R}^1 \text{R}^2$ 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2
は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$
、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、ならびにXは、F、ClおよびBr
rから選択され、

MおよびM'は、両方が存在していてよく、または両方が存在していなくてよく、なら
びにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、Oおよび C R^3
 R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hであり、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM
'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

20

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、M
およびM'はOではなく、

(b) MおよびM'が $\text{C R}^3 \text{R}^4$ である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
であり得、ならびに

(c) MおよびM'が $\text{C R}^3 \text{R}^4$ であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、
MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。〕。

【請求項 2】

30

MおよびM'が存在せず、ならびにAが、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、
、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択さ
れる、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

MおよびM'がOであり、ならびにAが $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

MおよびM'が $-\text{CH}_2-$ であり、ならびにAが $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、
、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{C}(\text{H}_2)\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2-$ からなる群
から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

40

【請求項 5】

MおよびM'が $-\text{CH}_2-$ であり、ならびにAが $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ および $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

MおよびM'が存在しない、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

50

MおよびM'が $-\text{CH}_2-$ である、請求項1に記載の化合物。

【請求項8】

Aが $-\text{CH}_2-$ である、請求項1に記載の化合物。

【請求項9】

Aが $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である、請求項1に記載の化合物。

【請求項10】

Aが $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である、請求項7に記載の化合物。

【請求項11】

Aが $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ である、請求項7に記載の化合物。

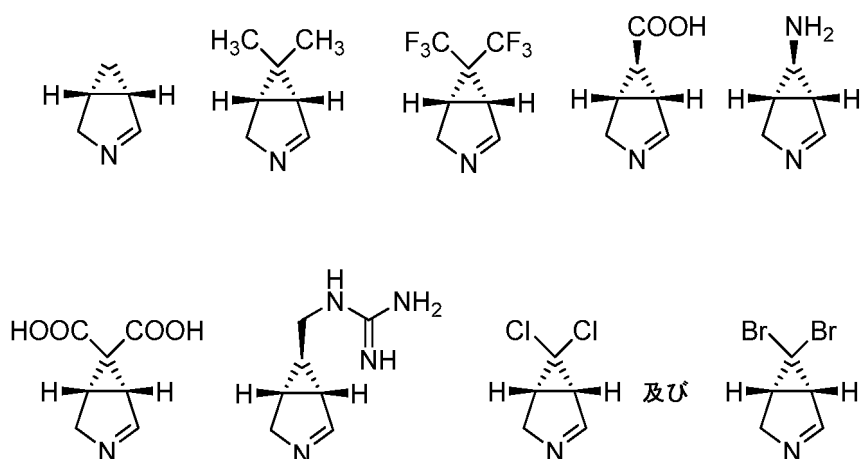
【請求項12】

Aが $-\text{CH}_2-$ である、請求項8に記載の化合物。

【請求項13】

実質的に立体異性的に純粋な化合物が

【化2】



10

20

30

40

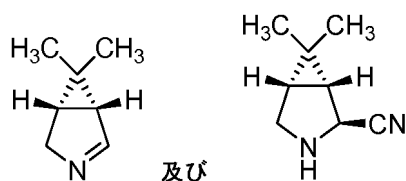
50

からなる群から選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項14】

実質的に立体異性的に純粋な化合物が

【化3】

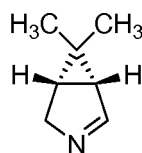


からなる群から選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項15】

実質的に立体異性的に純粋な化合物が

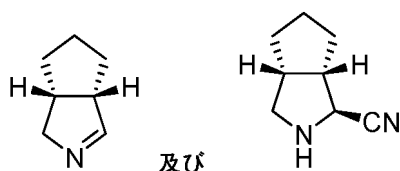
【化4】



である、請求項1に記載の化合物。

【請求項16】

実質的に立体異性的に純粋な化合物が
【化 5】

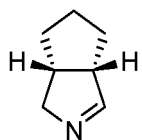


からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 17】

10

実質的に立体異性的に純粋な化合物が
【化 6】



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 18】

請求項 1 の実質的に立体異性的に純粋な化合物の対を含む混合物であって、化合物の対が (i) 構造式 II (a) および II (b) の化合物；(ii) 構造式 III (a) および III (b) の化合物；ならびに (iii) 構造式 IV (a) および IV (b) の化合物から選択される、混合物。

20

【請求項 19】

化合物の対が構造式 III (a) および III (b) の対であり、ならびに混合物中の構造式 III (a) の化合物の量が混合物中の構造式 III (b) の化合物の量より多い、請求項 18 の混合物。

【請求項 20】

構造式 III (a) の化合物の量と構造式 III (b) の化合物の量の比が少なくとも 5 : 1 である、請求項 19 の混合物。

30

【請求項 21】

化合物の対が構造式 IV (a) および IV (b) の対であり、ならびに混合物中の構造式 IV (a) の化合物の量が混合物中の構造式 IV (b) の化合物の量より多い、請求項 18 の混合物。

【請求項 22】

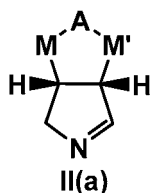
構造式 IV (a) の化合物の量と構造式 IV (b) の化合物の量の比が少なくとも 10 : 1 である、請求項 21 の混合物。

【請求項 23】

構造式 II (a)

【化 7】

40



[式中、

A は、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、ならびに X は、F、Cl および Br

50

から選択され、

MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在していなくてよく、ならびにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、OおよびC R³ R⁴から選択され、R³およびR⁴は、Hであり、またはMのR³もしくはR⁴およびM'のR³もしくはR⁴は、メチレン架橋を形成しており、

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、MおよびM'はOではなく、

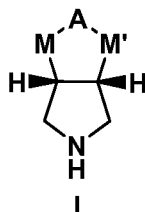
(b) MおよびM'がC R³ R⁴である場合、Aは、-CH=CH-または-CH₂-CH₂-であり得、ならびに

(c) MおよびM'がC R³ R⁴であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

による実質的に立体異性的に純粋な化合物（その塩および水和物を含む。）を調製する方法であって、

構造式 I

【化 8】



[式中、A、MおよびM'は、構造式 I I (a) および I I (b) について定義された通りである。]

によるアミン化合物を、モノアミンオキシダーゼ酵素が構造式 I のアミン化合物を構造式 I I (a) の対応するイミン化合物に酸化する条件下でモノアミンオキシダーゼ酵素と補因子の存在下で酸素と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 2 4】

補因子がモノアミンオキシダーゼ酵素と非共有結合で結合している、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

補因子が、FAD、FMN、NADおよびNADPからなる群から選択される、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 6】

過酸化水素 (H₂O₂) の酸素分子および水への不均化を触媒する成分をさらに含む、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 7】

成分が、Pd、Feおよびカタラーゼ酵素からなる群から選択される、請求項 2 6 の方法。

【請求項 2 8】

モノアミンオキシダーゼ酵素がアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) またはアスペルギルス・オリザ (Aspergillus oryzae) から得られるまたは由来である、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 9】

モノアミンオキシダーゼ酵素が、配列番号 2 の野生型 A. ニガーモノアミンオキシダーゼと少なくとも 90 % 同一であるまたは配列番号 3 2 の野生型 A. オリザモノアミンオキシダーゼと少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 2 3 の方法。

【請求項 3 0】

モノアミンオキシダーゼ酵素が、配列番号 4、8、10、12、14、16、18、2

10

20

30

40

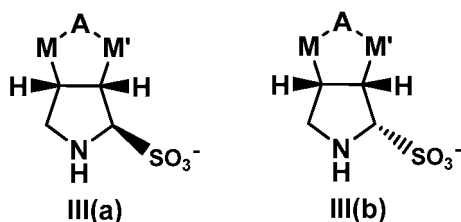
50

0 および 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 23 の方法。

【請求項 31】

構造式 III (a) による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノスルホネート化合物および構造式 III (b) による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノスルホネート化合物（それらの塩および水和物を含む。）

【化 9】



10

[式中、

A は、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、ならびに X は、F、Cl および Br から選択され、

M および M' は、両方が存在してよく、または両方が存在していなくてよく、ならびに M および M' の両方が存在する場合、M および M' は、同じであり、O および CR^3 から選択され、 R^3 および R^4 は、H であり、または M の R^3 もしくは R^4 および M' の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

20

但し、

(a) M および M' が O である場合、A は O ではなく、ならびに A が O である場合、M および M' は O ではなく、

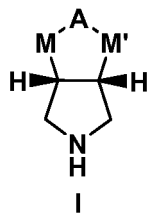
(b) M および M' が CR^3R^4 である場合、A は、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、ならびに

(c) M および M' が CR^3R^4 であり、ならびに 1 つ以上の立体中心を有する場合、M および M' の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

30

を含む混合物を調製する方法であって、構造式 I

【化 10】



[式中、A、M および M' は、構造式 III について定義された通りである。]

によるアミン化合物を、構造式 III (a) による実質的に鏡像異性的アミノスルホネート化合物および構造式 III (b) による実質的に鏡像異性的アミノスルホネート化合物を含む混合物を生成する条件下で、補因子と結合したモノアミノオキシダーゼ酵素の存在下で酸素と、および重亜硫酸塩と接触させる段階を含む、方法。

40

【請求項 32】

重亜硫酸塩が、モノアミノオキシダーゼの前または同時に反応物に加えられる、請求項 31 の方法。

【請求項 33】

重亜硫酸塩がモノアミノオキシダーゼの添加の後に加えられる、請求項 31 の方法。

【請求項 34】

構造式 I によるアミン化合物が、重亜硫酸塩の添加の前に酸素および補因子と結合した

50

モノアミノオキシダーゼ酵素と接触させられる、請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 5】

モノアミノオキシダーゼ酵素がアスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・オリザから得られるまたは由来である、請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 6】

モノアミノオキシダーゼ酵素が、配列番号 2 の野生型 A. ニガーモノアミノオキシダーゼと少なくとも 90 % 同一であるまたは配列番号 3 2 の野生型 A. オリザモノアミノオキシダーゼと少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 3 1 の方法。

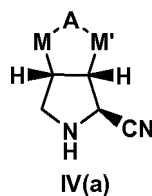
【請求項 3 7】

モノアミノオキシダーゼ酵素が、配列番号 4、8、10、12、14、16、18、20 および 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 8】

構造式 I V (a)

【化 1 1】



[式中、

A は、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、ならびに X は、F、Cl および Br から選択され、

M および M' は、両方が存在していてよく、または両方が存在していなくてよく、ならびに M および M' の両方が存在する場合、M および M' は、同じであり、O および CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、H であり、または M の R^3 もしくは R^4 および M' の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

但し、

(a) M および M' が O である場合、A は O ではなく、A が O である場合、M および M' は O ではなく、

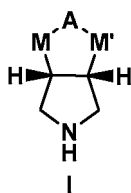
(b) M および M' が CR^3R^4 である場合、A は、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、ならびに

(c) M および M' が CR^3R^4 であり、ならびに 1 つ以上の立体中心を有する場合、M および M' の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物（その塩および水和物を含む。）を調製する方法であって、

構造式 I

【化 1 2】

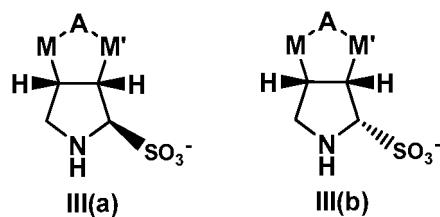


[式中、A、M および M' は、構造式 I V について定義された通りである。]

によるアミン化合物を、以下の構造式 I I I (a) による実質的に鏡像異性的に純粋なア

ミノスルホネート化合物および構造式 I I I (b) による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノスルホネート化合物

【化 1 3】



10

を含む混合物を生成する条件下で、補因子と結合したモノアミノオキシダーゼ酵素の存在下で酸素と、および重亜硫酸塩と接触させる段階、ならびに

構造式 I I I (a) および I I I (b) による化合物を、構造式 I V (a) による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成する条件下でシアニドと接触させる段階を含む、方法。

【請求項 3 9】

補因子がモノアミノオキシダーゼ酵素と非共有結合で結合している、請求項 3 8 の方法。

【請求項 4 0】

補因子が、F A D、F M N、N A D および N A D P からなる群から選択される、請求項 3 8 の方法。

20

【請求項 4 1】

モノアミノオキシダーゼ酵素がアスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・オリザから得られるまたは由来である、請求項 3 8 の方法。

【請求項 4 2】

モノアミノオキシダーゼ酵素が、配列番号 2 の野生型 A、ニガーモノアミノオキシダーゼと少なくとも 9 0 % 同一であるまたは配列番号 3 2 の野生型 A、オリザモノアミノオキシダーゼと少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 3 8 の方法。

【請求項 4 3】

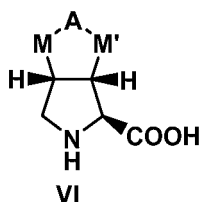
モノアミノオキシダーゼ酵素が、配列番号 4、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0 および 3 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 3 8 の方法。

30

【請求項 4 4】

構造式 V I (a)

【化 1 4】



40

[式中、

A は、O、C R¹ R²、- C = C - または - C H₂ - C H₂ - であり、R¹ および R² は、それぞれ独立に - H、- C O O H、- X、- N H₂、- C H₂ N H C (N H) N H₂、- C X₃、- C H₃、- C H₂ C H₃ から選択され、ならびに X は、F、C l および B r から選択され、

M および M' は、両方が存在していてよく、または両方が存在していなくてよく、ならびに M および M' の両方が存在する場合、M および M' は、同じであり、O および C R³ R⁴ から選択され、R³ および R⁴ は、H であり、または M の R³ もしくは R⁴ および M' の R³ もしくは R⁴ は、メチレン架橋を形成しており、

50

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、MおよびM'はOではなく、

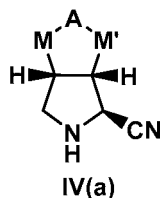
(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、ならびに

(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

による実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物（その塩を含む。）を調製する方法であって、

構造式 I V (a)

【化 1 5】



10

[式中、A、MおよびM'は、構造式 V I のアミノ化合物について定義された通りである。]

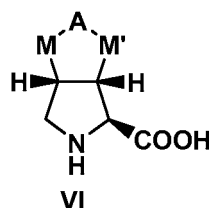
による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V I による実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物に変換される条件下で酸および水と接触させる段階を含む、方法。

20

【請求項 4 5】

構造式 V I

【化 1 6】



30

[式中、

Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、ならびにXは、F、ClおよびBrから選択され、

MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在していなくてよく、ならびにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hであり、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

40

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、MおよびM'はOではなく、

(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、ならびに

(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

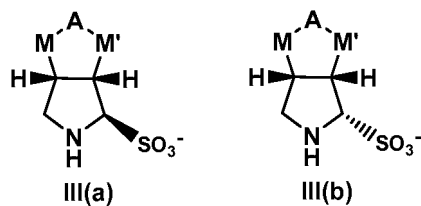
による実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物（その塩を含む）を調製する方法であって、

構造式 I I I (a) による立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物、構造式 I I

50

I (b) による実質的に立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物またはそれらの混合物を、

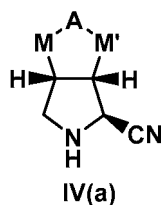
【化 17】



10

構造式 I V (a)

【化 18】



[式中、A、MおよびM'は、構造式 V I のアミノ化合物について定義された通りである。]

20

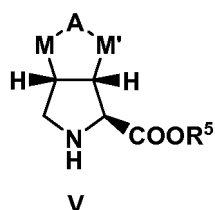
による実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成する条件下でシアニドと接触させる段階、ならびに

構造式 I V (a) のアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V I による実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物に変換される条件下で酸および水と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 46】

構造式 V

【化 19】



30

[式中、

R⁵は、(C₁ - C₆) アルキルであり、

Aは、O、C R¹ R²、-C=C-または-CH₂-CH₂-であり、R¹およびR²は、それぞれ独立に-H、-COOH、-X、-NH₂、-CH₂NHC(NH)NH₂、-CX₃、-CH₃、-CH₂CH₃から選択され、ならびにXは、F、ClおよびBrから選択され、

40

MおよびM'は、両方が存在していてよく、または両方が存在していなくてよく、ならびにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、OおよびC R³ R⁴から選択され、R³およびR⁴は、Hであり、またはMのR³もしくはR⁴およびM'のR³もしくはR⁴は、メチレン架橋を形成しており、

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、MおよびM'はOではなく、

(b) MおよびM'がC R³ R⁴である場合、Aは、-CH=CH-または-CH₂-CH₂-であり得、ならびに

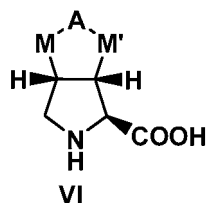
50

(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

による実質的に鏡像異性的に純粋な化合物（その塩を含む。）を調製する方法であって、

構造式VI

【化20】



10

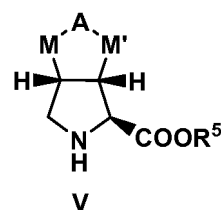
[式中、A、MおよびM'は、構造式Vのアミノ酸化合物について定義された通りである。]

による実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物を、構造式VIによるアミノ酸化合物が構造式Vによる実質的に鏡像異性的に純粋なアミノエステル化合物に変換される条件下で酸ならびに R^5-OH および $R^5OC(O)CH_3$ からなる群から選択される化合物と接触させる段階を含む、方法。

【請求項47】

構造式V

【化21】



20

[式中、

R^5 は、 (C_1-C_6) アルキルであり、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-C=C-$ または $-CH_2-CH_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-X$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $-CX_3$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ から選択され、ならびにXは、F、ClおよびBrから選択され、

30

MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在していなくてよく、ならびにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hであり、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、MおよびM'はOではなく、

40

(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-CH=CH-$ または $-CH_2-CH_2-$ であり得、ならびに

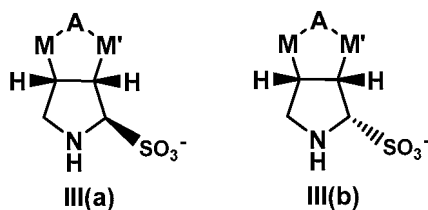
(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]

による実質的に立体異性的に純粋なアミノエステル化合物（その塩を含む）を調製する方法であって、

構造式III(a)による立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物、構造式III(b)による実質的に立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物またはそれらの混合物

50

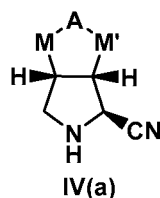
【化 2 2】



を、構造式 I V (a)

【化 2 3】

10



[式中、A、MおよびM'は、構造式V I のアミノ化合物について定義された通りである。] による実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成する条件下でシアニドと接触させる段階、ならびに

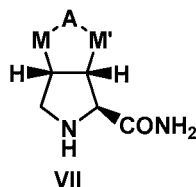
構造式 I V (a) のアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V による実質的に立体異性的に純粋なアミノエステル化合物に変換される条件下で酸およびアルコールと接触させる段階を含む、方法。

20

【請求項 4 8】

構造式 V I I

【化 2 4】



30

[式中、

Aは、O、 CR^1R^2 、 $-C=C-$ または $-CH_2-CH_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-X$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $-CX_3$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ から選択され、ならびにXは、F、ClおよびBrから選択され、

MおよびM'は、両方が存在していてよく、または両方が存在していなくてよく、ならびにMおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hであり、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、

40

但し、

(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、ならびにAがOである場合、MおよびM'はOではなく、

(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-CH=CH-$ または $-CH_2-CH_2-$ であり得、ならびに

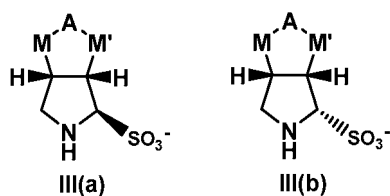
(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、ならびに1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。] による実質的に立体異性的に純粋なアミノアミド化合物(その塩を含む。)を調製する方法であって、

以下の構造式 I I I (a) による立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物、構造式 I I I (b) による実質的に立体異性的に純粋な重亜硫酸アミン付加体化合物または

50

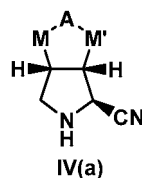
それらの混合物

【化 2 5】



を、構造式 I V (a)

【化 2 6】



10

〔式中、A、MおよびM'は、構造式V I のアミノ化合物について定義された通りである。〕による実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成する条件下でシアニドと接触させる段階、ならびに

構造式 I V (a) のアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V I I による実質的に立体異性的に純粋なアミノアミド化合物に変換される条件下で酸と接触させる段階を含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

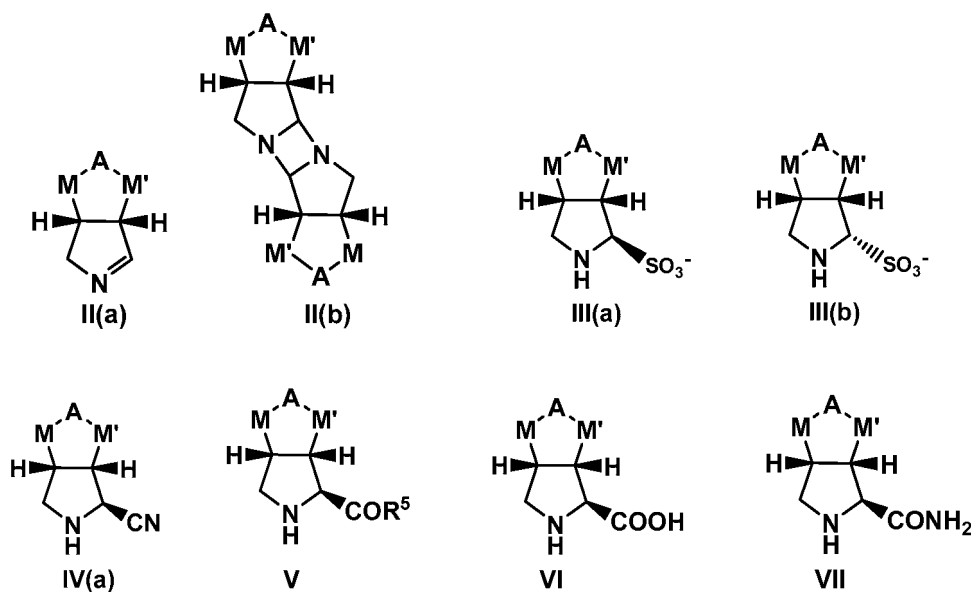
1. 技術分野

本開示は、構造式 I I から V I I

【0002】

【化 1】

30



40

〔式中、A、M、M'およびR⁵は、本明細書において述べる通りである。〕の実質的に立体異性的に純粋な縮合二環式プロリン化合物、それらの調製のための生体触媒法、およびそれらの方法に用いられる生体触媒酵素に関する。

【0003】

50

2. 配列一覧、表またはコンピュータプログラムへの言及

ファイル名C X 2-0 2 0 W O 0 1. t x tとしてコンピュータで読み込み可能な形式 (C R F) で3 7 C. F. R. § 1. 8 2 1に従って同時に電子的に提出された「配列一覧」は、参照により本明細書に組み込む。配列一覧の電子コピーは、2 0 0 9年6月2 3に1 1 0 Kバイトのファイルサイズで作成された。

【背景技術】

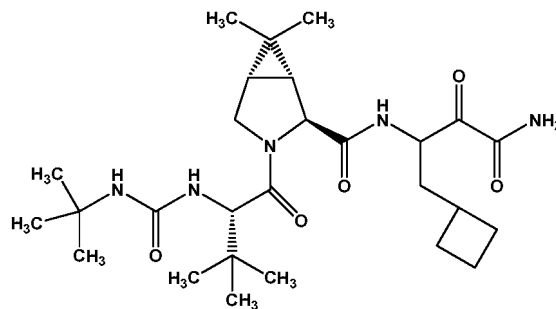
【0 0 0 4】

3. 背景

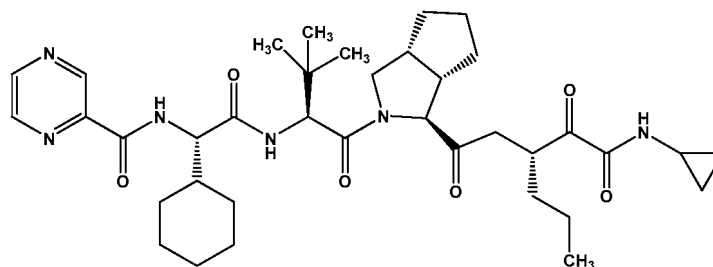
二環式プロリン類似体は、ペプチド模倣薬の発見および開発に用いられている (A. T r a b o c c h iら (2 0 0 8年)、A m i n o A c i d s (2 0 0 8) 3 4 : 1-2 4 頁)。C型肝炎ウイルスプロテアーゼ阻害剤ボセプレビル (S C H 5 0 5 0 3 4 ; ((1 R, 2 S, 5 S) -N- (4-アミノ-1-シクロブチル-3, 4-ジオキソブタン-2-イル) -3- ((S) -2- (3-tert-ブチルウレイド) -3, 3-ジメチルブタノイル) -6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン-2-カルボキサミド) (M a l c o l mら (2 0 0 6年)、A n t i m i c r o b. A g e n t s C h e m o t h e r. 5 0 (3) : 1 0 1 3 2 0 頁) およびテラプレビル (V X 9 5 0 ; N- ((S) -1-シクロヘキシル-2- ((S) -1- ((1 S, 3 a R, 6 a S) -1- ((R) -3- (2- (シクロプロピルアミノ) -2-オキソアセチル) ヘキサノイル) ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロロ-2 (1 H) -イル) -3, 3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イルアミノ) -2-オキソエチル) ピラジン-2-カルボキサミド) (P e r n iら (2 0 0 6年)、A n t i m i c r o b. A g e n t s C h e m o t h e r. 5 0 (3) : 8 9 9 9 0 9 頁)。

【0 0 0 5】

【化 2】



ボセプレビル (SCH-505034)



テラプレビル (VX-950)

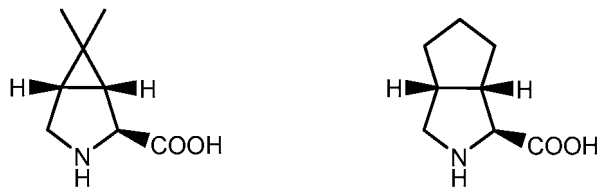
【0 0 0 6】

ボセプレビルおよびテラプレビルは、それぞれ下に示すシス型縮合二環式L-プロリン類似体 (1 R, 2 S, 3 S) -6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキ

サン-2-カルボン酸および(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸のエステルから調製される。

【0007】

【化3】



10

【0008】

WO2000/20824およびWO2000/218369は、構造式VIに対応する様々な縮合二環式L-プロリン類似体を組み込んだ他の多くのC型肝炎ウイルスプロテアーゼ阻害剤を記載している。

【0009】

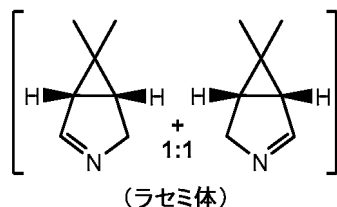
有機化学の方法およびツールを用いたそのような錯体分子の合成の方法が報告されたが、それらの合成は、一般的に多段階であり、複雑であり、費用がかかり、非効率的であり、総収率が低い方法である。

【0010】

Wuら(WO2007/075790)は、構造式

【0011】

【化4】



30

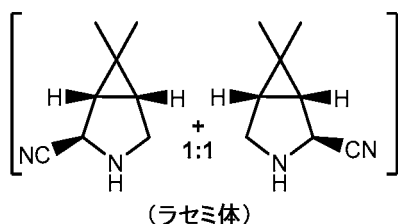
の対応するラセミ体イミンへのその酸化から開始する、構造式(1R, 5S)-6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンの対応する対称(アキラル)二環式アミンからの二環式プロリン類似体(1R, 2S, 5S)-6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸のメチルエステルの製造を開示している。

【0012】

ラセミ体イミンをその後シアニドと反応させて、以下の構造式

【0013】

【化5】



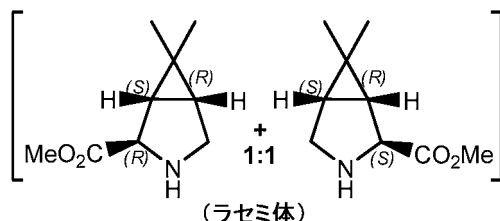
40

のラセミ体アミノニトリルを得、

次にこれを酸およびメタノールと反応させて、以下の構造式

【0014】

【化 6】



のラセミ体アミノ酸メチルエステルを得る。

【0015】

10

最後に、これらの(1R, 2S, 5S) (望ましくない) および(1S, 2R, 5R) (望ましい) 立体異性体メチルエステルをジアステレオマー塩分割により分離して、前者の鏡像異性体とのジ-*p*-トリル-D-酒石酸塩または後者の鏡像異性体とのジ-*p*-トリル-L-酒石酸塩を生成させる。

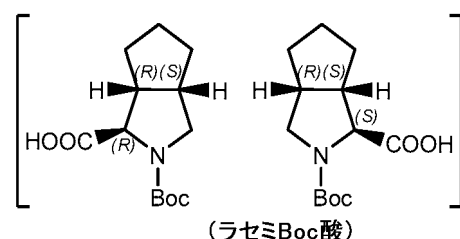
【0016】

Tanouryら(WO2007/022459)は、N-Boc誘導体を調製し、これを化学量論量を超えるバルキージアミンキレートが存在下で可燃性物質sec-ブチルリチウム次いで二酸化炭素(すべて-70℃以下)と反応させて、下に示すラセミ体N-Bocアミノ酸を生成させることによる、対応する対称(アキラル)二環式アミンからのラセミ体(ト-ブトキシカルボニル)オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸の合成を開示している。

20

【0017】

【化 7】



30

【0018】

これらのラセミBoc酸の(1R, 2S, 5S) (望ましくない) および(1S, 2R, 5R) (望ましい) 立体異性体は、S-1-アミノテトラリンなどの単一鏡像異性体キラル塩基を用いてジアステレオマー塩分割により分離される。

【0019】

アミノ酸誘導体の望ましい立体異性体はこれらの方法により得られるが、これらの二環式プロリン類似体の鏡像異性体の混合物の分割は、ラセミ混合物の製造に用いられるすべての物質(例えば、原材料、試薬、溶媒、触媒)の少なくとも半分の廃棄物を本質的に伴う。

40

【0020】

(i) N-アセチル-3-アザビシクロ[3.3.0]オクタンの陽極酸化(EA00090362) および(ii) チアゾリウムイリドアプローチ(Letters in Drug Design & Discovery (2005) 2(7): 497-502頁) J. Org. Chem. 1994, 59, 2773-8頁)を含む、アミノ酸(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸およびそのエステルの化学合成のさらなる方法が報告された。

【0021】

ラセミ混合物の生成を回避する、構造式I((1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン)の対応する対称(アキラル)二環式アミンからの

50

構造式(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸のアミノ酸および構造式Vのそのエステルを非対称的に生成させる方法ならびに鏡像異性体を分離する結果として生じる必要性は、上述の分割に基づく方法より効率がよく、無駄が少なく、費用対効果が高いことがあり得る。

【0022】

モノアミノオキシダーゼ酵素は、酸素を用いて1つの鏡像異性体に対応するイミンに立体特異的に酸化することによってラセミキラルアミンを分割し、脱ラセミ化するために用いられた。アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) のフラビン依存性モノアミノオキシダーゼ (MAO-N) の誘導体 (Shillingら (1995) 、*Biochim. Biophys. Acta.*、1243:529-37頁) は、鏡像異性的に純粋な (93% ee) (d) αメチルベンジルアミンを得るための (d/l) αメチルベンジルアミンの脱ラセミ化に非特異的の化学還元剤との併用で有用であると報告された (Alexeevaら (2002年) 、*Angew. Chem. Int. Ed.*、41:3177-3180頁) 。アスペルギルス・ニガーのフラビン依存性モノアミノオキシダーゼの誘導体は、鏡像異性的に純粋な (98% ee) (R) -2-フェニルピロリジン (phenylpyrrolidine) を得るための (R/S) -2-フェニルピロリジン (phenylpyrrolidine) の脱ラセミ化にも用いられた (Carrら (2005年) 、*ChemBioChem*、6:637-39頁; Gotorら、*「Enantioselective Enzymatic Desymmetrization in Organic Synthesis」*、*Chem. Rev.* (2005年) 105:313-54頁) 。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0023】

【特許文献1】国際公開第2000/20824号

【特許文献2】国際公開第2000/218369号

【特許文献3】国際公開第2007/075790号

【特許文献4】国際公開第2007/022459号

【非特許文献】

【0024】

【非特許文献1】A. Trabocchiら (2008年) 、*Amino Acids* (2008) 34:1-24頁

【非特許文献2】Malcolmら (2006年) 、*Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (3):1013-20頁

【非特許文献3】Perniら (2006年) 、*Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (3):899-909頁

【非特許文献4】*Letters in Drug Design & Discovery* (2005) 2 (7):497-502頁

【非特許文献5】*J. Org. Chem.*、1994、59、2773-8頁

【非特許文献6】Shillingら (1995) 、*Biochim. Biophys. Acta.*、1243:529-37頁

【非特許文献7】Alexeevaら (2002年) 、*Angew. Chem. Int. Ed.*、41:3177-3180頁

【非特許文献8】Carrら (2005年) 、*ChemBioChem*、6:637-39頁

【非特許文献9】Gotorら、*「Enantioselective Enzymatic Desymmetrization in Organic Synthesis」*、*Chem. Rev.* (2005年) 105:313-54頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

したがって、実質的に鏡像異性的に純粋なキラル化合物、特に合成中間体として有用であるキラルアミン化合物を提供するだけではなく、それらの不斉合成のための効率的で、拡張性のある生体触媒法を提供することも望ましい。したがって、それらの生体触媒法に有用な酵素を提供することも望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0026】

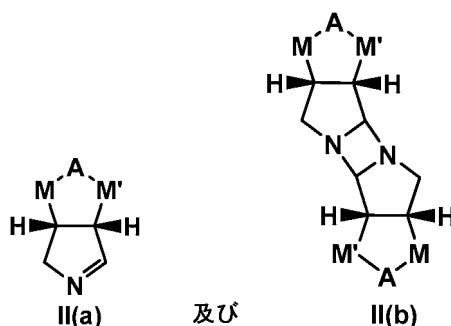
4. 要旨

本開示は、立体的に定義された治療薬の合成における新規な中間体として特に有用である、それらの塩および水和物を含む、以下の構造式 I I (a) の実質的に立体異性的に純粋な二環式イミン化合物（および構造式 I I (b) のそれらの二量体）

10

【0027】

【化8】



20

[式中、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、Xは、F、ClおよびBrから選択される。Mおよび M' は、両方が存在していてよく、または両方が存在してなくてよく、Mおよび M' の両方が存在する場合、Mおよび M' は、同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hである、またはMの R^3 もしくは R^4 および M' の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) Mおよび M' がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、Mおよび M' はOではなく、(b) Mおよび M' が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、(c) Mおよび M' が CR^3R^4 であり、1つ以上の立体中心を有する場合、Mおよび M' の立体中心は、反対の立体化学を有する。]を提供する。

30

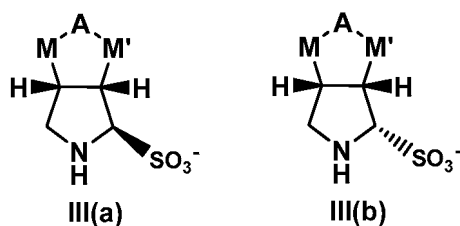
【0028】

本開示は、鏡像異性的に定義された治療薬の合成における新規な中間体として特に有用である、A、Mおよび M' が上述の通りである、それらの塩および水和物を含む、構造式 I I I (a) および構造式 I I I (b)

【0029】

【化9】

40



による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノスルホネート化合物をさらに提供する。

【0030】

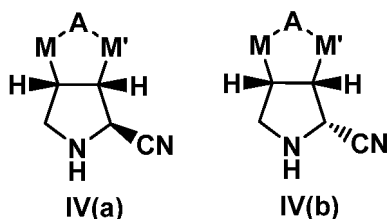
さらに、本開示は、立体的に定義された治療薬の合成における新規な中間体として有用

50

である構造式 I V (a) の実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を提供する。以下の構造式 I V (a) の実質的に鏡像異性的に純粋なトランスアミノニトリル化合物は、A、M および M ' が上述の通りである、それらの塩および水和物を含む、以下の構造式 I V (b) の実質的に鏡像異性的に純粋なシスアミノニトリル化合物を含む混合物としても提供することができる。

【 0 0 3 1 】

【 化 1 0 】



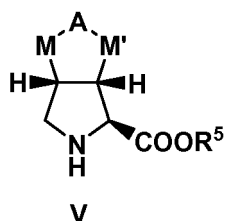
10

【 0 0 3 2 】

本開示は、鏡像異性的に定義された治療薬の合成における中間体として特に有用である、それらの塩および水和物を含む、構造式 V

【 0 0 3 3 】

【 化 1 1 】



20

[式中、A、M および M ' は、上述の通りであり、R ⁵ は、保護基（例えば、ベンジルまたはトリメチルシリルなど）、- (C ₁ - C ₂) アルキル、- (C ₁ - C ₃) アルキル、- (C ₁ - C ₄) アルキルおよび- (C ₁ - C ₆) アルキルからなる群から選択される。] の場合によって保護された実質的に鏡像異性的に純粋な化合物を提供する。特定の非限定の実施形態において、R ⁵ は、メチル、エチルまたはtert-ブチルである。

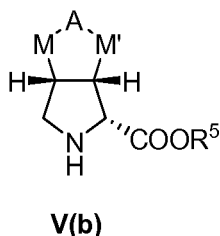
30

【 0 0 3 4 】

本開示はまた、それらの塩および水和物を含む、構造式 V (b)

【 0 0 3 5 】

【 化 1 2 】



40

[式中、A、M および M ' は、上述の通りであり、R ⁵ は、保護基（例えば、ベンジルまたはトリメチルシリルなど）、- (C ₁ - C ₂) アルキル、- (C ₁ - C ₃) アルキル、- (C ₁ - C ₄) アルキルおよび- (C ₁ - C ₆) アルキルからなる群から選択される。] の場合によって保護された実質的に鏡像異性的に純粋な化合物（構造式 V の化合物のシス鏡像異性体に相当する）を提供する。特定の非限定の実施形態において、R ⁵ は、メチル、エチルまたはtert-ブチルである。

【 0 0 3 6 】

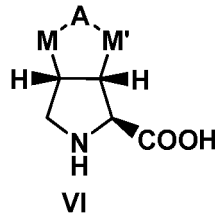
本開示はまた、鏡像異性的に定義された治療薬の合成における中間体として特に有用で

50

ある、それらの塩および水和物を含む、構造式 V I

【 0 0 3 7 】

【 化 1 3 】



10

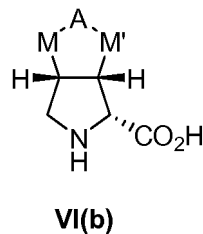
〔式中、A、MおよびM'は、上述の通りである。〕の実質的に鏡像異性的に純粋なカルボキシル置換化合物を提供する。

【 0 0 3 8 】

本開示はまた、それらの塩および水和物を含む、構造式 V I (b)

【 0 0 3 9 】

【 化 1 4 】



20

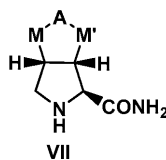
〔式中、A、MおよびM'は、上述の通りである。〕の場合によって保護された実質的に鏡像異性的に純粋な化合物（構造式 V I の化合物のシス鏡像異性体に相当する）を提供する。

【 0 0 4 0 】

さらに、本開示は、鏡像異性的に定義された治療薬の合成における中間体として特に有用である、それらの塩および水和物を含む、構造式 V I I

【 0 0 4 1 】

【 化 1 5 】



30

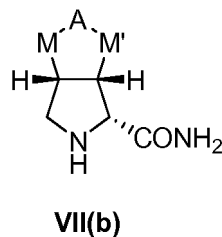
〔式中、A、MおよびM'は、上述の通りである。〕の実質的に鏡像異性的に純粋な化合物を提供する。

【 0 0 4 2 】

本開示はまた、それらの塩および水和物を含む、構造式 V I I (b)

【 0 0 4 3 】

【 化 1 6 】



40

〔式中、A、MおよびM'は、上述の通りである。〕の場合によって保護された実質的に

50

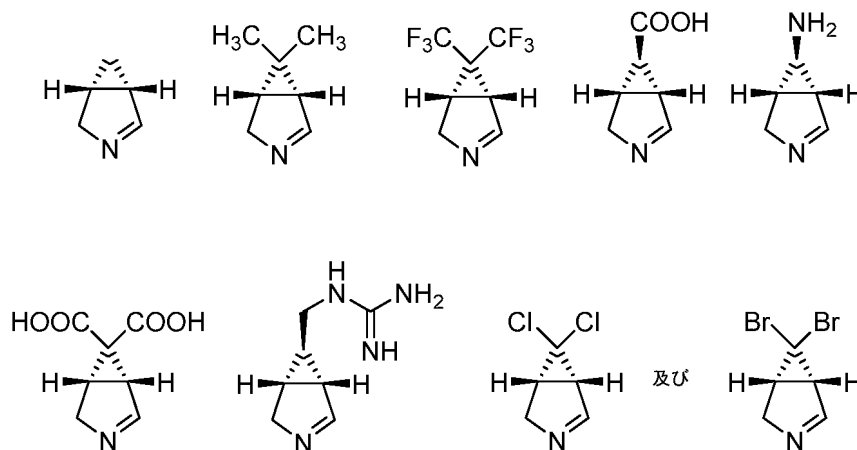
鏡像異性的に純粋な化合物（構造式 V I I の化合物のシス鏡像異性体に相当する）を提供する。

【0044】

したがって、特定の実施形態において、本開示は、1つ以上の治療薬の合成のための中間体として有用な以下の縮合二環式プロリン化合物ならびに少なくとも以下の縮合二環式プロリン化合物の合成のための生体触媒法を提供する。

【0045】

【化17】



10

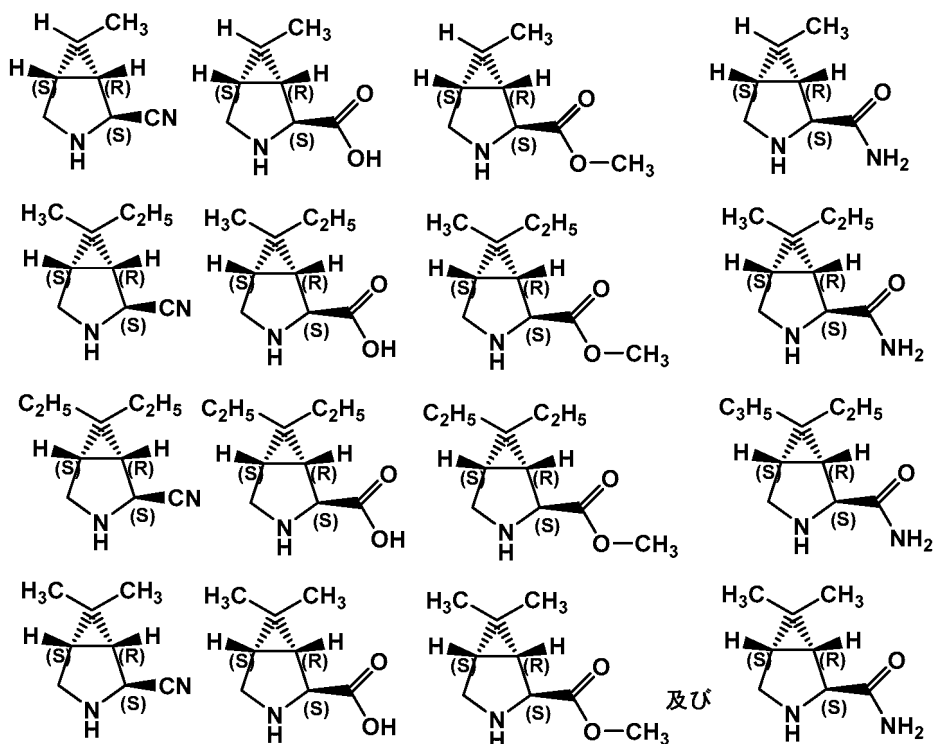
20

【0046】

本開示は、1つ以上の治療薬の合成のための中間体として有用な以下の縮合二環式プロリン化合物ならびに少なくとも以下の縮合二環式プロリン化合物の合成のための生体触媒法を提供する。

【0047】

【化18】



30

40

【0048】

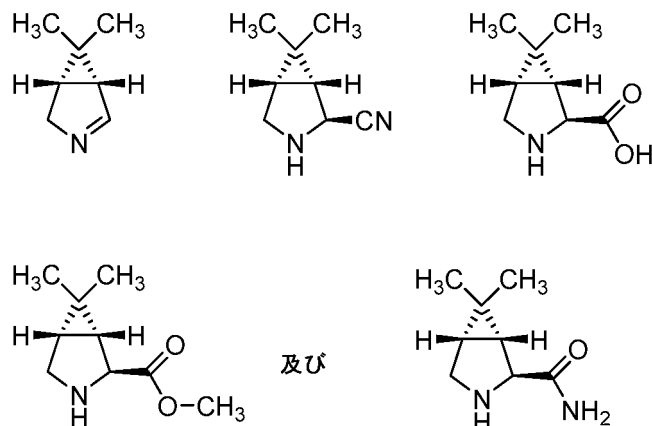
他の特定の実施形態において、本開示は、1つ以上の治療薬の合成のための中間体とし

50

て有用な以下の化合物ならびにこれらの化合物の合成のための生体触媒法を提供する。

【0049】

【化19】



10

【0050】

このように、本開示は、1つ以上の治療薬の合成のための中間体として有用な縮合二環式プロリン化合物ならびにこれらの縮合二環式プロリン化合物の合成のための生体触媒法を提供する。

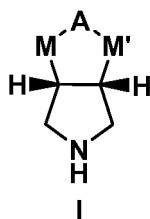
【0051】

本開示はまた、構造式 I I から V I I の実質的に立体異性的に純粋な化合物の生体触媒による合成の方法を提供する。一実施形態において、本開示は、A、MおよびM'が上述の通りである、それらの塩を含む構造式 I I による実質的に立体異性的に純粋なイミン化合物を調製する方法を提供する。該方法は、構造式 I

20

【0052】

【化20】



30

〔式中、A、MおよびM'が上述の通りである。〕による対称（アキラル）二環式アミン化合物を、モノアミノオキシダーゼ酵素が構造式 I のアミン化合物を構造式 I I（a）の対応するイミン化合物、式 I I（b）のその二量体およびそれらの混合物に酸化する条件下で補因子の存在下で酸素およびモノアミノオキシダーゼ酵素と接触させる段階を含む。特定の実施形態において、補因子は、FAD、FMN、NADPおよびNADからなる群から選択される。特定の実施形態において、補因子は、FADである。特定の実施形態において、反応混合物は、スキーム2（下）に示すように、モノアミノオキシダーゼ触媒反応の過酸化水素副生成物の分子状酸素および水への不均化を促進するのに有用な成分をさらに含む。特定の実施形態において、この成分は、PdおよびFeなどであるが、これらに限定されない化学物質から選択されるが、他の実施形態において、この成分は、カタラーゼ酵素などの酵素である。特定の実施形態において、反応混合物は、過酸化水素（H₂O₂）が分子状酸素および水に分解される、スキーム2に示す不均化反応を触媒するカタラーゼ酵素をさらに含む。

40

【0053】

特定の実施形態において、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I（a）の対応するイミン化合物に酸化することができるモノアミノオキシダーゼは、アスペルギルス属の種から得られる。特定の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、アスペルギルス・ニガ

50

ーモノアミノオキシダーゼであるが、他の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、アスペルギルス・オリザ (*Aspergillus oryzae*) モノアミノオキシダーゼである。いずれの場合においてもモノアミノオキシダーゼは、対応するアスペルギルス属種から精製することができ、またはE. コリ (*E. coli*) などであるが、これに限定されない異種宿主において発現させた組換えタンパク質として分離することができる。

【0054】

他の実施形態において、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I (a) の対応するイミン化合物に酸化することができるモノアミノオキシダーゼは、複数のモノアミノオキシダーゼの部分、例えば、アスペルギルス・ニガーモノアミノオキシダーゼのアミノ末端部分およびアスペルギルス・オリザモノアミノオキシダーゼのカルボキシ末端部分を含む融合またはハイブリッドタンパク質を含む。特定の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、アミノ末端 314 アミノ酸がアスペルギルス・ニガーのアミノ末端 314 アミノ酸 (配列番号 2) に相当し、カルボキシ末端 181 アミノ酸がアスペルギルス・オリザのカルボキシ末端 181 アミノ酸 (配列番号 32) に相当する、495 アミノ酸タンパク質 (配列番号 6) である。他の特定の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、それぞれが配列番号 6 のアミノ酸配列と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 10、12、14、16、18、20 および 36 から選択される配列番号 6 の 495 アミノ酸タンパク質の誘導体である。

【0055】

特定の実施形態において、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I (a) の対応するイミン化合物に酸化することができるモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2 のアスペルギルス属モノアミノオキシダーゼ由来であり、配列番号 2 のアスペルギルス・ニガーモノアミノオキシダーゼのアミノ酸配列と比較して 2 つ以上のアミノ酸置換を有する。特定の実施形態において、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I の対応するイミン化合物に酸化することができるモノアミノオキシダーゼは、配列番号 4 または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。

【0056】

他の実施形態において、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I (a) の対応するイミン化合物に酸化することができるモノアミノオキシダーゼは、アミノ末端アミノ酸配列が第 1 のアスペルギルス属モノアミノオキシダーゼ由来であるが、カルボキシ末端アミノ酸配列が他のアスペルギルス属モノアミノオキシダーゼ由来である融合タンパク質である。特定の非限定的な実施形態において、そのような融合タンパク質のアミノ末端およびカルボキシ末端部分の両方は、配列番号 22、24、26、28、30 および 34 からなる群から選択されるものから独立に選択されることがあり得る。特定の実施形態において、融合タンパク質のアミノ末端部分は、配列番号 32 のタンパク質由来であるが、融合タンパク質のカルボキシ末端部分は、配列番号 2 のタンパク質由来である。

【0057】

特定の実施形態において、本開示は、A、M および M' が上述の通りである、その塩および水和物を含む、構造式 I I I (a) または I I I (b) によるアミノスルホネート化合物を調製する方法を提供する。これらの方法は、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I による対称二環式アミン化合物を、アミノスルホネート (イミン-重亜硫酸塩付加体) 化合物を生成する条件下で酸素、モノアミノオキシダーゼ酵素および重亜硫酸塩と接触させる段階を含む。特定の実施形態において、酸化反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。

【0058】

本開示は、A、M および M' が上述の通りである、その塩および水和物を含む、構造式 I V (a) による実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I による対称二環式アミン化合物を、アミノニトリル化合物を生成する条件下で、酸素、モノアミノオ

キシダーゼ酵素および重亜硫酸塩と接触させ、続いてシアニドと接触させる段階を含む。特定の実施形態において、酸化反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。

【0059】

本開示は、A、MおよびM'が上述の通りである、その塩を含む、構造式I Vによる実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、MおよびM'が上述の通りである、構造式Iによる対称二環式アミン化合物を、アミノニトリル化合物を生成する条件下で、構造式I I (a)のイミン、構造式I I (b)のその二量体またはそれらの混合物を生成させるために酸素およびモノアミノオキシダーゼ酵素と接触させ、続いてシアニドと接触させる段階を含む。特定の実施形態において、酸化反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。

10

【0060】

本開示は、構造式I I (a) (もしくは構造式I I (b)の化合物)からまたは構造式I V (a)のアミノニトリル化合物から開始する、A、MおよびM'が上述の通りである、その塩を含む、構造式V Iによる実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物を調製する方法も提供する。この方法は、A、MおよびM'が上述の通りである、構造式I Vによる実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式V Iのアミノ酸化合物に変換される条件下で酸および水と接触させる段階を含む。

【0061】

本開示は、A、MおよびM'が上述の通りである、その塩および共結晶 (例えば、NH₄Cl)を含む、構造式V Iによる実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、MおよびM'が上述の通りである、構造式Iによる対称 (アキラル) アミン化合物を、構造式I Vによる実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成するのに適する条件下で、酸素およびモノアミノオキシダーゼ酵素と接触させ、続いてシアニドと接触させる段階を含む。特定の実施形態において、酸化反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。そのように生成したアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式V Iのアミノ酸化合物に変換される条件下で酸および水と接触させる。

20

【0062】

本開示は、A、MおよびM'が上述の通りである、その塩および共結晶 (例えば、NH₄Cl)を含む、構造式V Iによる実質的に立体異性的に純粋なアミノ酸化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、MおよびM'が上述の通りである、構造式Iによる対称 (アキラル) アミン化合物を、構造式I Vによる実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成するのに適する条件下で、酸素、モノアミノオキシダーゼ酵素および重亜硫酸塩と接触させ、続いてシアニドと接触させる段階を含む。特定の実施形態において、酸化反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。そのように生成したアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式V Iのアミノ酸化合物に変換される条件下で酸および水と接触させる。他の実施形態において、そのように生成したアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式Vのアミノエステル化合物に変換される条件下で酸およびアルコールと接触させる。

30

【0063】

さらに、本開示は、本明細書で開示する新規な化合物および生体触媒法を含む方法を用いて、A、M、M'およびR⁵が上述の通りである、その塩を含む、構造式Vによる実質的に立体異性的に純粋な保護アミノ酸化合物を調製する方法を提供する。この方法は、A、MおよびM'が上述の通りである、構造式I Vによる実質的に立体異性的に純粋なアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式Vのアミノ酸エステル化合物に変換される条件下で酸およびアルコールと接触させる段階を含む。

40

【0064】

本開示は、本明細書で開示する新規な化合物および生体触媒法を含む方法を用いて、A、MおよびM'が上述の通りである、その塩を含む、構造式V Iによる実質的に鏡像異性的に純粋なアミノ酸化合物を調製する方法も提供する。この方法は、A、MおよびM'が

50

上述の通りである、構造式 I V による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V I のアミノ酸化合物に変換される条件下で酸（例えば、H C l）と接触させる段階を含む。

【0065】

本開示は、A、M および M' が上述の通りである、その塩および共結晶（例えば、N H₄ C l）を含む、構造式 V I による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノ酸化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I によるアミン化合物を、構造式 I V による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成するのに適する条件下で、酸素およびモノアミノオキシダーゼ酵素および N a H S O₃ と接触させ、続いてシアニドと接触させる段階を含む。特定の実施形態において、反応混合物は、カタラーゼ酵素をさらに含む。そのように生成したアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V I のアミノ酸化合物に変換される条件下で H C l と接触させる。

10

【0066】

さらに、本開示は、本明細書で開示する新規な化合物および生体触媒法を含む方法を用いて、A、M、M' および R⁵ が上述の通りである、その塩を含む、構造式 V による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノ酸エステル化合物を調製する方法を提供する。この方法は、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I V による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を、アミノニトリル化合物が構造式 V のアミノエステル化合物に変換される条件下で酸（例えば、H C l）およびアルコールと接触させる段階を含む。

20

【0067】

本開示は、A、M および M' が上述の通りである、その塩を含む、構造式 V I I による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノアミド化合物を調製する方法をさらに提供する。この方法は、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I によるアミン化合物を、A、M および M' が上述の通りである、構造式 I V による実質的に鏡像異性的に純粋なアミノニトリル化合物を生成するのに適する条件下で、酸素およびモノアミノオキシダーゼ酵素とならびに場合によってカタラーゼ酵素および重亜硫酸塩と接触させ、続いてシアニドと接触させ、その後、アミノニトリル化合物を構造式 V I I のアミノ酸アミド化合物に変換させることができる条件下で H C l および水と接触させる段階を含む。

【0068】

構造式 I のアミン化合物を構造式 I I の対応するイミン化合物に酸化することができる、本開示のモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2、配列番号 3 2 および配列番号 6 のアミノ酸配列と比較して 1 つ以上のアミノ酸置換を有する。そのようなアミノ酸置換は、酵素活性の増大、立体選択性、熱安定性、溶媒安定性、生成物阻害の減少、基質阻害の減少または反応副生成物に対する感受性の低下などの 1 つ以上の改善された特性をモノアミノオキシダーゼに与える。そのようなアミノ酸置換は、例えば、E. コリ宿主細胞などであるが、これに限定されない異種宿主中の組換えにより発現させたタンパク質としての、宿主細胞中のモノアミノオキシダーゼの溶解度、安定性および発現レベルも改善し得る。

30

【0069】

本開示は、そのようなモノアミノオキシダーゼをコードするポリヌクレオチドおよび開示した生体触媒法においてポリペプチドを用いる方法も提供する。

40

【0070】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示したモノアミノオキシダーゼは、それらの酵素活性の速度、すなわち、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I の対応するイミン化合物に変換するそれらの速度に関して配列番号 2、配列番号 3 2 または配列番号 6 の酵素と比較して改善されている。いくつかの実施形態において、開示したモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2、配列番号 3 2 または配列番号 6 のモノアミノオキシダーゼによって示される速度の少なくとも 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、100 倍のまたは 100 倍を超える速度で基質を生成物に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号 4、8、10、12

50

、14、16、18、20および36に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0071】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示したモノアミノオキシダーゼは、構造式Iのアミン化合物を少なくとも約95%の鏡像異性体過剰率を有する構造式IIの対応するイミン化合物に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号4、8、10、12、14、16、18、20および36に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0072】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号4、8、10、12、14、16、18および20の配列式に基づいており、それらと少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。これらの差異は、1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、置換またはそのような変化のいずれかの組合せであり得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列の差異は、非保存的、保存的アミノ酸置換ならびに非保存的および保存的アミノ酸置換の組合せを含み得る。そのような変化を起こすことができる様々なアミノ酸残基の位置は、本明細書で述べる。

【0073】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基99ならびに配列番号32の残基97に対応するアミノ酸、グルタミンが酸性アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このグルタミン残基は、グルタミン酸残基で置換されている。

【0074】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基365ならびに配列番号32の残基363に対応するアミノ酸、チロシンが異なる芳香族アミノ酸、すなわち、フェニルアラニンまたはトリプトファンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのチロシン残基は、トリプトファン残基で置換されている。

【0075】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基382ならびに配列番号32の残基380に対応するアミノ酸、フェニルアラニンが非極性アミノ酸、すなわち、バリン、イソロイシン、アラニン、グリシン、メチオニンまたはロイシンで置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このフェニルアラニン残基は、ロイシン残基で置換されている。

【0076】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基465ならびに配列番号32の残基463に対応するアミノ酸、セリンが非極性アミノ酸、すなわち、バリン、イソロイシン、アラニン、メチオニン、ロイシンまたはグリシンで置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのセリン残基は、グリシン残基で置換されている。

【0077】

他の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基135に対応するアミノ酸、トレオニンが他の極性アミノ酸、すなわち、セリン、グルタミンまたはアスパラギンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このトレオニン残基は、グルタミン残基で置換されている。

【0078】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番

10

20

30

40

50

号2および配列番号6の残基284に対応するアミノ酸、アスパラギンが酸性アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのアスパラギン残基は、グルタミン酸残基で置換されている。

【0079】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2の残基289に対応するアミノ酸が他の非極性アミノ酸、すなわち、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはメチオニンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのアラニン残基は、バリン残基で置換されている。

【0080】

他の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2の残基384に対応するアミノ酸、リシンが他の極性アミノ酸、すなわち、セリン、トレオニンまたはグルタミンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのリシン残基は、グルタミン残基で置換されている。

【0081】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、アスペルギルス・ニガーのモノアミノオキシダーゼ（配列番号2）の相同体またはアスペルギルス・オリザのモノアミノオキシダーゼ（配列番号44）の相同体であり、本明細書で開示したものに対応する1つ以上のアミノ酸置換を有するモノアミノオキシダーゼである。実例となる相同体は、モノアミノオキシダーゼ配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34などである。他の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34の酵素から選択され、本明細書で開示したものに対応する1つ以上のアミノ酸置換を有するモノアミノオキシダーゼである。

【0082】

他の態様において、本開示は、本明細書で述べた操作改変モノアミノオキシダーゼをコードするポリヌクレオチドまたは高度緊縮条件下でそのようなポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドは、プロモーターおよびコードされた操作改変モノアミノオキシダーゼの発現に有用な他の調節要素を含むことができ、特定の所望の発現系について最適化されたコドンを利用することができる。具体例としてのポリヌクレオチドは、配列番号1、5、7、9、11、13、15、17、19、31および35を含むが、これらに限定されない。

【0083】

他の態様において、本開示は、本明細書で述べたポリヌクレオチドおよび／または発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。この宿主細胞は、アスペルギルス属種、例えば、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリザもしくはアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) であってよく、またはそれらは、異なる生物、例えば、*E. コリ*もしくは*S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*) であってよい。この宿主細胞は、本明細書で述べた操作改変モノアミノオキシダーゼ酵素の発現および分離のために用いることができ、または代わりに、それらは、基質の立体異性生成物への変換のために直接用いることができる。

【0084】

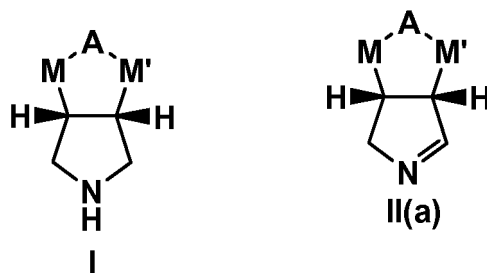
全細胞、細胞抽出物もしくは精製モノアミノオキシダーゼを用いて方法を実施するかどうかにかかわらず、単一モノアミノオキシダーゼを用いることができ、または代わりに、2つ以上のモノアミノオキシダーゼの混合物を用いることができる。

【0085】

本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼ酵素は、以下の構造式Iの化合物の構造式I (a)の化合物への酸化を触媒することができる。

【0086】

【化 2 1】



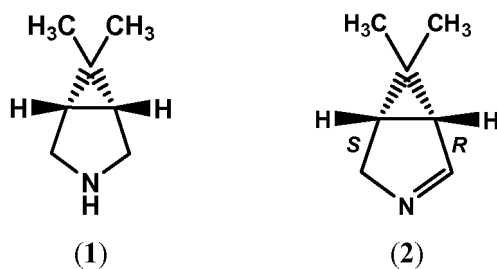
【0087】

10

特定の実施形態において、本明細書で述べたモノアミノキシダーゼ酵素は、以下の化合物（１）である（１Ｒ，５Ｓ）－６，６－ジメチル－３－アザビシクロ〔３．１．０〕ヘキサンの以下の化合物（２）である（１Ｒ，５Ｓ）－６，６－ジメチル－３－アザビシクロ〔３．１．０〕ヘキサ－２－エンへの酸化を触媒することができる。

【0088】

【化 2 2】



20

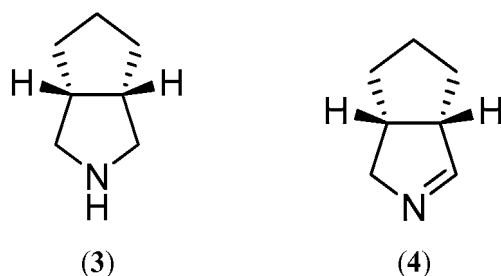
【0089】

他の特定の実施形態において、本明細書で述べたモノアミノキシダーゼ酵素は、以下の化合物（３）である（３ａＲ，６ａＳ）－オクタヒドロシクロペンタ〔ｃ〕ピロールの以下の化合物（４）である（３ａＳ，６ａＲ）－１，３ａ，４，５，６，６ａ－ヘキサヒドロシクロペンタ〔ｃ〕ピロールへの酸化を触媒することができる。

【0090】

30

【化 2 3】



【0091】

40

構造式 I の化合物を構造式 II (a) の化合物に酸化する方法のいくつかの実施形態において、基質は、約 99 % を超える立体異性体過剰率の生成物に酸化され、モノアミノキシダーゼは、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20 または 36 に対応する配列を含む。

【0092】

構造式 I の化合物を構造式 II (a) の化合物に酸化する方法のいくつかの実施形態において、1－100 g / L の基質の少なくとも約 10－20 % が約 1－10 g / L のポリペプチドにより約 24 時間未満で生成物に変換され、ポリペプチドは、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20 または 36 に対応するアミノ酸配列を含む。

【0093】

50

基質を生成物に還元する方法のいくつかの実施形態において、約 25 – 50 g / L を超える基質および約 1 – 5 g / L 未満のポリペプチド（配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20 または 36 に対応するアミノ酸配列を含む）を用いて行う場合、基質の少なくとも約 95 % が約 24 時間未満で生成物に変換される。

【発明を実施するための形態】

【0094】

5. 詳細な記述

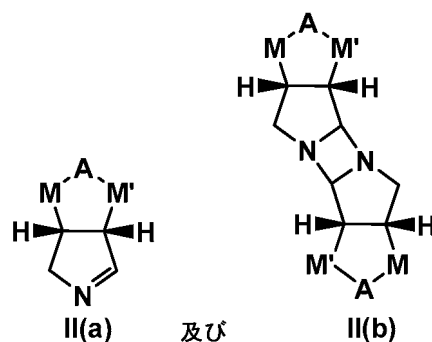
5. 1 本開示の縮合二環式プロリン化合物

5. 1. 1 式 I I (a) および (b) の縮合二環式プロリン化合物

本開示は、それらの塩および水和物を含む、以下の構造式 I I (a) の実質的に鏡像異性的に純粋な縮合二環式プロリン化合物およびそれらの二量体である構造式 I I (b) の化合物ならびにそれらの混合物

【0095】

【化 2 4】



[式中、A は、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、X は、F、Cl および Br から選択される。M および M' は、両方が存在してよく、または両方が存在してなくてよく、M および M' の両方が存在する場合、M および M' は、同じであり、O および CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、H である、または M の R^3 もしくは R^4 および M' の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) M および M' が O である場合、A は O ではなく、A が O である場合、M および M' は O ではなく、(b) M および M' が CR^3R^4 である場合、A は、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、(c) M および M' が CR^3R^4 であり、1 つ以上の立体中心を有する場合、M および M' の立体中心は、反対の立体化学を有する。] を提供する。

【0096】

一実施形態において、A は、 $-\text{CH}_2-$ である。

【0097】

他の実施形態において、A は、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ である。

【0098】

他の実施形態において、A は、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である。

【0099】

他の実施形態において、A は、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ である。

【0100】

他の実施形態において、A は、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-$ である。

【0101】

他の実施形態において、A は、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)-$ である。

【0102】

一実施形態において、M および M' は、存在せず、A は、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$

、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

【0103】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

【0104】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

10

【0105】

さらなる実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ および $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ からなる群から選択される。

【0106】

さらなる実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{O}-$ であり、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

20

【0107】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{O}-$ であり、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

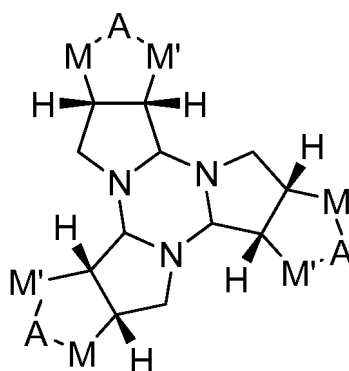
【0108】

ピロリジン化合物の多くのイミン（例えば、3,4-ジヒドロ-2H-ピロール）は、環ひずみのため、二量体に加えて、または二量体の代わりに、熱力学的に有利な三量体を形成することが公知である。したがって、特定の実施形態において、式II(a)の上の化合物のいずれかは、構造式II(c)

【0109】

30

【化25】



II(c)

40

を有する二量体の形で存在し得る。

【0110】

特定の実施形態において、本開示は、式II(a)の化合物の二量体、例えば、構造式II(c)の化合物ならびに式II(a)および／または式II(b)の化合物とのこれらの混合物を提供する。

【0111】

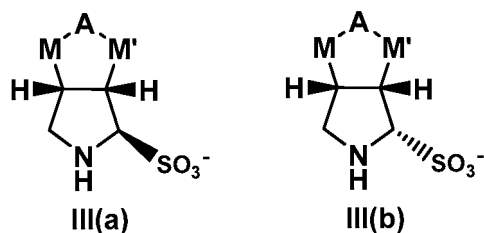
50

5. 1. 2 構造式 I I I のアミノスルホネート

本開示は、それらの塩、水和物および混合物を含む、構造式 I I I (a) および (b)

【0112】

【化26】



10

[式中、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、Xは、F、ClおよびBrから選択される。MおよびM'は、両方が存在していてよく、または両方が存在してなくてよく、MおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hである、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、MおよびM'はOではなく、(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。]の実質的に鏡像異性的に純粋なアミノスルホネート化合物をさらに提供する。

20

【0113】

一実施形態において、Aは、 $-\text{CH}_2-$ である。

【0114】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ である。

【0115】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である。

【0116】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ である。

30

【0117】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-$ である。

【0118】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)-$ である。

【0119】

一実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

40

【0120】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

【0121】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{C}(\text{H}_2)\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2-$ からなる群から選択される。

50

一実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

【0134】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

【0135】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{C}(\text{H}_2)\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2-$ からなる群から選択される。

10

【0136】

さらなる実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ および $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ からなる群から選択される。

【0137】

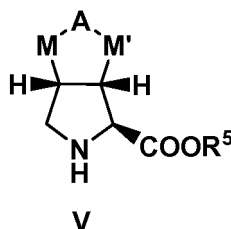
5. 1. 4 構造式Vの縮合二環式プロリン化合物

本開示は、それらの塩および水和物を含む、構造式V

20

【0138】

【化28】



[式中、A、MおよびM'は、上述の通りであり、R⁵は、保護基（例えば、ベンジルまたはトリメチルシリルなど）、 $-(\text{C}_1-\text{C}_2)$ アルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_3)$ アルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_4)$ アルキルおよび $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキルからなる群から選択される。]の縮合二環式プロリン化合物を提供する。特定の非限定的な実施形態において、R⁵は、それらの塩および水和物を含む、メチル、エチルまたは t -ブチルであり、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、R¹およびR²は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、Xは、F、ClおよびBrから選択される。MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在してよく、MおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、R³およびR⁴は、Hである、またはMのR³もしくはR⁴およびM'のR³もしくはR⁴は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、MおよびM'はOではなく、(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。

30

40

【0139】

一実施形態において、Aは、 $-\text{CH}_2-$ である。

【0140】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ である。

【0141】

50

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である。

【0142】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ である。

【0143】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-$ である。

【0144】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)-$ である。

【0145】

一実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

10

【0146】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

【0147】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{C}(\text{H}_2)\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2-$ からなる群から選択される。

20

【0148】

さらなる実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ および $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ からなる群から選択される。

【0149】

一実施形態において、R⁵は、ベンジルである。

【0150】

一実施形態において、R⁵は、トリメチルシリルである。

【0151】

他の実施形態において、R⁵は、メチルである。

30

【0152】

さらなる実施形態において、R⁵は、エチルである。

【0153】

他の実施形態において、R⁵は、t-ブチルである。

【0154】

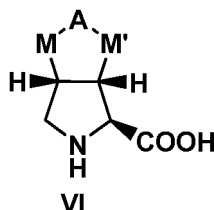
5. 1. 5 構造式VIの縮合二環式プロリン化合物

本開示は、それらの塩および水和物を含む、構造式VI

【0155】

【化29】

40



[式中、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、R¹およびR²は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、Xは、F、ClおよびBr

50

から選択される。MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在していなくてよく、MおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、OおよびC R³ R⁴から選択され、R³およびR⁴は、Hである、またはMのR³もしくはR⁴およびM'のR³もしくはR⁴は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、MおよびM'はOではなく、(b) MおよびM'がC R³ R⁴である場合、Aは、-CH=CH-または-CH₂-CH₂-であり得、(c) MおよびM'がC R³ R⁴であり、1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。] による実質的に鏡像異性的に純粋な化合物も提供する。

【0156】

10

一実施形態において、Aは、-CH₂-である。

【0157】

他の実施形態において、Aは、-CH(CH₃)-である。

【0158】

他の実施形態において、Aは、-C(CH₃)₂-である。

【0159】

他の実施形態において、Aは、-CH(CH₂CH₃)-である。

【0160】

他の実施形態において、Aは、-C(CH₂CH₃)₂-である。

【0161】

20

他の実施形態において、Aは、-C(CH₂CH₃)(CH₃)-である。

【0162】

一実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、-CH₂-、-CH(CH₃)-、-CH(C₂H₅)-、-C(CH₃)₂-、-C(C₂H₅)₂-、-CF₂-、-CCl₂-、-CBr₂-、-C(CF₃)₂-、-CH(COOH)-、-C(COOH)₂-、-CH(NH₂)-および-CH(CH₂NHC(NH)NH₂)-からなる群から選択される。

【0163】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、-CH₂-、-C(CH₃)₂-、-C(CH₃)₂-および-C(C₂H₅)₂-からなる群から選択される。

30

【0164】

他の実施形態において、MおよびM'は、-CH₂-であり、Aは、-O-、-CH₂-、-C(CH₃)₂-、-CH(CH₃)-、-C(C₂H₅)₂-、-CH(C₂H₅)₂-、-CF₂-、-CCl₂-、-CBr₂-、-C(CF₃)₂-、-CH(COOH)-、-C(COOH)₂-、-CH(NH₂)-および-C(H₂)NHC(NH)NH₂-からなる群から選択される。

【0165】

さらなる実施形態において、MおよびM'は、-CH₂-であり、Aは、-O-、-CH₂-および-C(CH₃)₂-からなる群から選択される。

【0166】

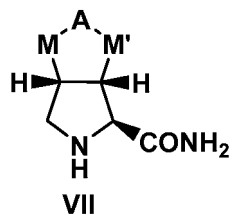
40

5. 1. 6 構造式V I Iの縮合二環式プロリン化合物

さらに、本開示は、それらの塩および水和物を含む、構造式V I I

【0167】

【化 3 0】



〔式中、Aは、O、 CR^1R^2 、 $-\text{C}=\text{C}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立に $-\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ から選択され、Xは、F、ClおよびBrから選択される。MおよびM'は、両方が存在してよく、または両方が存在してなくてよく、MおよびM'の両方が存在する場合、MおよびM'は、同じであり、Oおよび CR^3R^4 から選択され、 R^3 および R^4 は、Hである、またはMの R^3 もしくは R^4 およびM'の R^3 もしくは R^4 は、メチレン架橋を形成しており、但し、(a) MおよびM'がOである場合、AはOではなく、AがOである場合、MおよびM'はOではなく、(b) MおよびM'が CR^3R^4 である場合、Aは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり得、(c) MおよびM'が CR^3R^4 であり、1つ以上の立体中心を有する場合、MおよびM'の立体中心は、反対の立体化学を有する。〕の実質的に鏡像異性的に純粋な複素二環式イミノ酸化合物を提供する。

【0168】

一実施形態において、 R^6 および R^7 は、両方ともHである。

【0169】

一実施形態において、Aは、 $-\text{CH}_2-$ である。

【0170】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ である。

【0171】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ である。

【0172】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ である。

【0173】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-$ である。

【0174】

他の実施形態において、Aは、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_3)-$ である。

【0175】

一実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2)-$ からなる群から選択される。

【0176】

他の実施形態において、MおよびM'は、存在せず、Aは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ および $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ からなる群から選択される。

【0177】

他の実施形態において、MおよびM'は、 $-\text{CH}_2-$ であり、Aは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CCl}_2-$ 、 $-\text{CBr}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CF}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})-$ 、 $-\text{C}(\text{COOH})_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ および $-\text{C}(\text{H}_2)\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2-$ からなる群から選択される。

【0178】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態において、MおよびM'は、 $-CH_2-$ であり、Aは、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ および $-C(CH_3)_2-$ からなる群から選択される。

【0179】

5. 2 本開示のモノアミノキシダーゼ

構造式 I のアミン化合物を構造式 I I の対応するイミン化合物に酸化することができる、本開示のモノアミノキシダーゼは、配列番号 2、配列番号 6 および配列番号 32 のアミノ酸配列と比較して 1 つ以上のアミノ酸置換を有する。そのようなアミノ酸置換は、酵素活性の増大、立体選択性、熱安定性、溶媒安定性、生成物阻害の減少、基質阻害の減少または反応副生成物に対する感受性の低下などの 1 つ以上の改善された特性をモノアミノキシダーゼに与える。そのようなアミノ酸置換は、例えば、E. コリ宿主細胞などであるが、これに限定されない異種宿主中の組換えにより発現させたタンパク質としての、宿主細胞中のモノアミノキシダーゼの発現レベル、溶解度および／または安定性も改善し得る。一実施形態において、アミノ酸置換 S465G は、E. コリにおける本開示のモノアミノキシダーゼの発現レベル、溶解度および／または安定性の実質的な増大をもたらす。

【0180】

本開示は、そのようなモノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドおよび開示した生体触媒法においてポリペプチドを用いる方法も提供する。

【0181】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示したモノアミノキシダーゼは、それらの酵素活性の速度、すなわち、構造式 I のアミン化合物を構造式 I I の対応するイミン化合物に変換するそれらの速度に関して配列番号 2、配列番号 6 または配列番号 32 の酵素と比較して改善されている。いくつかの実施形態において、開示したモノアミノキシダーゼは、配列番号 2、配列番号 6 または配列番号 32 のモノアミノキシダーゼによって示される速度の少なくとも 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、100 倍のまたは 100 倍を超える速度で基質を生成物に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号 4、8、10、12、14、16、18、20 および 36 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0182】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示したモノアミノキシダーゼは、構造式 I のアミン化合物を少なくとも約 95% のジアステレオマー過剰率を有する構造式 I I の対応するイミン化合物に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号 4、8、10、12、14、16、18、20 および 36 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0183】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノキシダーゼは、配列番号 4、8、10、12、14、16、18 および 20 の配列式に基づいており、それらと少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含み得る。これらの差異は、アミノ酸の挿入、欠失、置換またはそのような変化のいずれかの組合せであり得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列の差異は、非保存的、保存的アミノ酸置換ならびに非保存的および保存的アミノ酸置換の組合せを含み得る。そのような変化を起こすことができる様々なアミノ酸残基の位置は、本明細書で述べる。

【0184】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノキシダーゼは、配列番号 2 および配列番号 6 の残基 99 ならびに配列番号 32 の残基 97 に対応するアミノ酸、グルタミンが酸性アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このグルタミン残基は、グルタミン酸残基で置換されている。

【0185】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基365ならびに配列番号32の残基363に対応するアミノ酸、チロシンが異なる芳香族アミノ酸、すなわち、フェニルアラニンまたはトリプトファンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このチロシン残基は、トリプトファン残基で置換されている。

【0186】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基382ならびに配列番号32の残基380に対応するアミノ酸、フェニルアラニンが非極性アミノ酸、すなわち、バリン、イソロイシン、アラニン、グリシン、メチオニンまたはロイシンで置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このフェニルアラニン残基は、ロイシン残基で置換されている。

10

【0187】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基465ならびに配列番号32の残基463に対応するアミノ酸、セリンが非極性アミノ酸、すなわち、バリン、イソロイシン、アラニン、メチオニン、ロイシンまたはグリシンで置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このセリン残基は、グリシン残基で置換されている。

【0188】

他の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基135に対応するアミノ酸、トレオニンが他の極性アミノ酸、すなわち、セリン、グルタミンまたはアスパラギンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このトレオニン残基は、グルタミン残基で置換されている。

20

【0189】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基284に対応するアミノ酸、アスパラギンが酸性アミノ酸、すなわち、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、そのアスパラギン残基は、グルタミン酸残基で置換されている。

【0190】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2および配列番号6の残基289に対応するアミノ酸、アラニンが他の非極性アミノ酸、すなわち、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはメチオニンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このアラニン残基は、バリン残基で置換されている。

30

【0191】

他の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、配列番号2の残基384に対応するアミノ酸、リシンが他の極性アミノ酸、すなわち、セリン、トレオニンまたはグルタミンで保存的に置換されているアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、このリシン残基は、グルタミン残基で置換されている。

40

【0192】

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、アスペルギルス・ニガーのモノアミノオキシダーゼ（配列番号2）の相同体またはアスペルギルス・オリザ（配列番号32）の相同体であり、本明細書で開示したものに対応する1つ以上のアミノ酸置換を有するモノアミノオキシダーゼである。実例となる相同体は、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34のモノアミノオキシダーゼなどである。したがって、特定の実施形態において、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼは、本明細書で開示したものに対応する1つ以上のアミノ酸置換を有する、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34の酵素から選択されるモノア

50

ミンオキシダーゼである。

【0193】

定義

本明細書で用いているように、以下の用語は、以下の意味を有するものとする。

【0194】

「モノアミンオキシダーゼ」は、構造式 I（上記を参照）の化合物を構造式 I I（上記を参照）の対応する生成物に酸化する酵素能を有するポリペプチドを意味する。このポリペプチドは、一般的に、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、フラビンアデニンモノヌクレオチド（FMN）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸（NADP）などであるが、これらに限定されない酸化補因子を利用する。特定の実施形態において、酸化補因子は、FADである。モノアミンオキシダーゼは、本明細書で用いているように、天然に存在する（野生型）モノアミンオキシダーゼならびに人為的操作により生成する天然に存在しない操作改変ポリペプチドを含む。

【0195】

「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸をコードする核酸の部分（例えば、遺伝子）を意味する。

【0196】

「天然に存在する」または「野生型」は、天然に見い出される形を意味する。例えば、天然に存在するまたは野生型ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然における源から分離することができ、人為的操作により意図的に修飾されなかった、生物に存在する配列である。

【0197】

「組換え」は、例えば、細胞、核酸またはポリペプチドに関して用いる場合、天然に存在しないような方法で修飾された、またはそれと同じであるが、組換え技術を用いて合成材料から、および／または操作により、生成もしくは誘導された物質または該物質の自然もしくは天然形に対応する物質を意味する。非限定的な例は、とりわけ、天然（非組換え）形の細胞内で見出されない、または異なるレベルで発現する天然遺伝子を発現させる、組換え細胞発現遺伝子を含む。

【0198】

「配列同一性の百分率」および「相同性の百分率」は、本明細書において同義で用い、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド間の比較を意味し、比較ウィンドウにわたり2つの最適に整列させた配列を比較することによって求めるものであり、2つの配列の最適な整列において、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの部分は、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含む可能性がある。この百分率は、両配列において同じ核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を測定して、一致する位置の数を求め、一致する位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を得ることにより、算出することができる。あるいは、この百分率は、両配列において同じ核酸塩基もしくはアミノ酸残基が存在する、または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップと整列する位置の数を測定して、一致する位置の数を求め、一致する位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を得ることにより、算出することができる。当業者は、2つの配列を整列させるために利用可能な多くの確立されたアルゴリズムが存在することを十分に理解している。比較のための配列の最適な整列は、例えば、SmithおよびWaterman、1981、Adv. Appl. Math.、2:482頁の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、1970、J. Mol. Biol.、48:443頁の相同性整列アルゴリズムにより、PearsonおよびLipman、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:2444頁の類似性の検索方法により、これらのアルゴリズム（GCG Wisconsin Software PackageにおけるG

10

20

30

40

50

AP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピュータによる実行により、または目視検査(一般的に、Current Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.、(1995 Supplement)(Ausubel)を参照)により行うことができる。配列同一性の百分率および配列類似性を測定するのに適するアルゴリズムの例は、それぞれAltschulら、1990、J. Mol. Biol.、215:403-410頁およびAltschulら、1977、Nucleic Acids Res.、3389-3402頁に記載されたBLASTおよびBLAST2 10
.0アルゴリズムである。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationウェブサイトを紹介して公的に入手できる。このアルゴリズムは、データベース配列における同じ長さのワードと並べたときに、いくつかの陽性評価閾値スコアTと一致または満たす問い合わせ配列における長さWの短いワードを同定することによって高スコア配列対(HSPs)を最初に同定することを必要とする。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれている(Altschulら、前出)。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPsを見い出すための検索を開始するためのシードとしての役割を果たす。累積整列スコアを増加させることができる限り、ワードヒットを各配列に沿って両方向に 20
拡大させる。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメーターM(一致残基の対に対する報酬スコア;常に >0)およびN(不一致残基の対に対する罰則スコア;常に <0)を用いて算出する。アミノ酸配列については、スコア行列を用いて累積スコアを算出する。累積整列スコアがその最大達成値から量X減少する;1つ以上の負のスコアの残基整列の累積のため、累積スコアがゼロもしくはそれ以下になる;またはいずれかの配列の末端に到達する場合、各方向におけるワードヒットの拡大を中止する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、整列の感度および速度を決定する。BLAST Nプログラム(ヌクレオチド配列については、11のワード長(W)、10の期待値(E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ および両鎖の比較をデフォルトとして用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、3のワード長(W)、10の期待値(E)およびB 30
L O S U M 6 2スコア行列をデフォルトとして用いる(HenikoffおよびHenikoff、1989、Proc Natl Acad Sci USA、89:10915頁を参照)。配列整列および配列同一性百分率の典型的な決定には、示したデフォルトパラメーターを用いた、GCG Wisconsin Softwareパッケージ(Accelrys、Madison WI)におけるBESTFITまたはGAPプログラムを用いることができる。

【0199】

「参照配列」は、配列の比較の基準として用いられる定義された配列を意味する。参照配列は、より大きい配列のサブセット、例えば、全長遺伝子またはポリペプチド配列の部分であってよい。一般的に、参照配列は、長さが少なくとも20ヌクレオチドもしくはア 40
ミノ酸残基、長さが少なくとも25残基、長さが少なくとも50残基または全長の核酸もしくはポリペプチドである。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドはそれぞれ(1)2つの配列の間で類似している配列(すなわち、完全な配列の一部)を含む可能性があり、(2)2つの配列の間で異なっている配列をさらに含む可能性があるので、2つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列の比較は、配列の類似性の局所領域を特定し、比較するために2つのポリヌクレオチドの配列を「比較ウィンドウ」にわたって比較することによって一般的に実施される。

【0200】

「比較ウィンドウ」は、配列を少なくとも20個の連続したヌクレオチドまたはアミノ 50
酸の参照配列と比較することができる、少なくとも約20個の連続したヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念的な部分を意味し、比較ウィンドウにおける配列の部分は、2

つの配列の最適な整列のために参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでいてよい。比較ウィンドウは、20個より長い連続した残基であってよく、場合によって30、40、50、100またはより長いウィンドウを含む。

【0201】

「実質的同一性」は、少なくとも20残基位置の比較ウィンドウにわたる、しばしば少なくとも30-50残基のウィンドウにわたる参照配列と比較して少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の同一性、89から95%配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味し、配列同一性の百分率は、参照配列を、比較ウィンドウにわたり参照配列の総計20%以下である欠失または付加を含む配列と比較することによって算出する。ポリペプチドに適用される特定の実施形態において、「実質的同一性」という用語は、デフォルトギャップ加重値を用いてプログラムGAPまたはBESTFITなどにより最適に整列させた場合に、2つのポリペプチド配列が少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも89%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性またはそれ以上（例えば、99%の配列同一性）を共有することを意味する。好ましくは、同じではない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。

【0202】

「に対応する」、「への参照」または「に対する」は、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けの状況において用いる場合、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列を参照配列と比較する場合の指定された参照配列の残基の番号付けに適用される。言い換えれば、所定のポリマーの残基番号または残基位置は、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数で示される位置によるのではなく、参照配列を基準として指定される。例えば、操作改変モノアミノオキシダーゼのアミノ酸配列のような所定のアミノ酸配列は、2つの配列の間の残基の一致を最適化するためにギャップを導入することによって参照配列と整列させることができる。これらの場合、ギャップが存在するが、所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列における残基の番号付けは、それが整列された参照配列を基準として行われる。

【0203】

「立体選択性」は、1つの立体異性体の化学または酵素反応における他のものと比べて優先的な形成を意味する。立体選択性は、1つの立体異性体の生成が他のものと比べて有利である場合には部分的であり得、または1つの立体異性体のみが生成する場合には完全であり得る。立体異性体が鏡像異性体である場合、立体選択性は、両方の総計における1つの鏡像異性体の割合（一般的に百分率として報告される）である、エナンチオ選択性と呼ばれる。それは、当技術分野で代わるべきものとして式
$$\frac{\text{多量の鏡像異性体} - \text{微量の鏡像異性体}}{\text{多量の鏡像異性体} + \text{微量の鏡像異性体}}$$
に従って計算される鏡像異性体過剰率（e. e.）と一般的に報告される（一般的に百分率として）。立体異性体がジアステレオマーである場合、立体選択性は、ジアステレオ選択性と呼ばれ、これは、2つのジアステレオマーの混合物中の1つのジアステレオマー割合（一般的に百分率として報告される）であり、また、代わるべきものとしてジアステレオマー過剰率（d. e.）と一般的に報告される。鏡像異性体過剰率およびジアステレオマー過剰率は、立体異性体過剰率の類型である。

【0204】

「高度に立体選択的」は、基質を少なくとも約99%の立体異性体過剰率を有する対応する生成物に変換することができるモノアミノオキシダーゼポリペプチドに適用される。

【0205】

「立体特異性」は、1つの立体異性体の化学または酵素反応における他のものと比べて優先的な変換を意味する。立体特異性は、1つの立体異性体の変換が他のものと比べて有利である場合には、部分的である可能性があり、または1つの立体異性体のみが変換される場合には完全である可能性がある。

【0206】

「化学選択性」は、1つの生成物の化学または酵素反応における他のものと比べて優先的な形成を意味する。

【0207】

「改善された酵素特性」は、参照モノアミノキシダーゼと比較して酵素特性の改善を示すモノアミノキシダーゼポリペプチドを意味する。本明細書で述べた操作改変モノアミノキシダーゼポリペプチドについては、いくつかの実施形態において、参照モノアミノキシダーゼは他の改善された操作改変モノアミノキシダーゼであり得るが、比較は、一般的に野生型モノアミノキシダーゼ酵素に対して行われる。改善が望ましい酵素特性は、酵素活性（基質の変換率により表すことができる）、熱安定性、pH活性プロファイル、補因子の必要、阻害物質（例えば、生成物阻害）に対する無反応性、立体特異性、立体選択性（エナンチオ選択性を含む）、溶解度ならびに宿主細胞中の安定性および発現レベルを含むが、これらに限定されない。

【0208】

「酵素活性の増加」は、参照モノアミノキシダーゼと比較して特異的活性（生成した生成物／時間／重量タンパク質）の増加または基質の生成物への変換率（例えば、規定量のモノアミノキシダーゼを用いた場合の規定の時間における出発量の基質の生成物への変換率）の増加によって表すことができる、操作改変モノアミノキシダーゼポリペプチドの改善された特性を意味する。酵素活性を測定する具体例としての方法は、実施例に示す。変化が酵素活性の増加をもたらし得る、 K_m 、 V_{max} または k_{cat} などの古典的酵素特性を含む酵素活性に関連する特性が影響を受ける可能性がある。酵素活性の改善は、対応する野生型モノアミノキシダーゼの酵素活性の約1.5倍から天然に存在するモノアミノキシダーゼまたはモノアミノキシダーゼポリペプチドが由来する他の操作改変モノアミノキシダーゼより酵素活性が2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍またはそれ以上まで高いものであり得る。触媒回転速度が必要とする補因子を含む基質の拡散速度を超えることができないような、あらゆる酵素の活性が拡散律速であることは、当業者によって理解される。拡散制限の理論的最大値、すなわち k_{cat}/K_m は、一般的に約 10^8 から 10^9 ($M^{-1}s^{-1}$)である。したがって、モノアミノキシダーゼの酵素活性の改善は、モノアミノキシダーゼ酵素による作用を受ける基質の拡散速度に関連する上限を有する。モノアミノキシダーゼの活性は、Zhouら（Zhouら、「A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity」、1997、Anal. Biochem.、253:169-74頁）およびSzutowiczら（Szutowiczら、「Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tissues Using Peroxidase and 2,2'-Azino(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) as Chromogen」、1984、Anal. Biochem.、138:86-94頁）により開示されたものなどであるが、これらに限定されないモノアミノキシダーゼを測定するための公表された方法またはその変法を用いて測定することができる。酵素活性の比較は、本明細書でさらに詳細に述べるような酵素の定義された製剤、設定条件下での定義されたアッセイおよび1つ以上の定義された基質を用いて、または例えば、ZhouおよびSzutowiczの方法を用いて行われる。一般的に、溶解物を比較する場合、宿主細胞により産生され、溶解物中に存在する酵素の量の変動を最小限にするために同一の発現系および同一の宿主細胞を用いると同時にアッセイした細胞の数およびタンパク質の量を測定する。

【0209】

「変換」は、基質の対応する生成物への酵素的酸化を意味する。「変換百分率」は、指定された条件下である時間内に生成物に酸化された基質の百分率を意味する。したがって、モノアミノキシダーゼポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、基質の生成物

への「変換百分率」として表すことができる。

【0210】

「熱安定性」は、非処理酵素と比較してある時間（例えば、0.5－24時間）にわたる高温（40－80℃）への暴露後に同様な活性（例えば、60％から80％以上）を維持しているモノアミノキシダーゼポリペプチドに適用される。

【0211】

「溶媒安定性」は、非処理酵素と比較してある時間（例えば、0.5－24時間）にわたる種々の濃度（例えば、5－99％）の溶媒（イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、2－メチルテトラヒドロフラン、アセトン、トルエン、酢酸ブチル、メチルtert－ブチルエーテル等）への暴露後に同様な活性（例えば、60％から80％以上）を維持しているモノアミノキシダーゼポリペプチドに適用される。

10

【0212】

「pH安定性」は、非処理酵素と比較してある時間（例えば、0.5－24時間）にわたる高または低pH（例えば、4.5－6または8－12）への暴露後に同様な活性（例えば、60％から80％以上）を維持しているモノアミノキシダーゼポリペプチドに適用される。

【0213】

「熱安定性および溶媒安定性」は、熱安定性および溶媒安定性であるモノアミノキシダーゼポリペプチドに適用される。

【0214】

「に由来する」は、操作改変モノアミノキシダーゼ酵素に関連して本明細書で用いているように、工学技術の基盤となる始発モノアミノキシダーゼ酵素および／またはそのようなモノアミノキシダーゼ酵素をコードする遺伝子を特定する。例えば、配列番号8の操作改変モノアミノキシダーゼ酵素は、配列番号2のアスペルギルス・ニガーモノアミノキシダーゼ酵素をコードする遺伝子を多世代にわたって人為的に進化させることによって得られた。したがって、この操作改変モノアミノキシダーゼ酵素は、配列番号2の野生型モノアミノキシダーゼ「に由来する」。

20

【0215】

「親水性アミノ酸または残基」は、Eisenbergら、1984、J. Mol. Biol.、179：125－142頁の標準化コンセンサス疎水性スケールに従ったゼロ未満の疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコードされる疎水性アミノ酸は、L-Thr（T）、L-Ser（S）、L-His（H）、L-Glu（E）、L-Asn（N）、L-Gln（Q）、L-Asp（D）、L-Lys（K）およびL-Arg（R）などである。

30

【0216】

「酸性アミノ酸または残基」は、アミノ酸がペプチドまたはポリペプチドに含まれている場合に約6未満のpK値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を意味する。酸性アミノ酸は、一般的に水素イオンの喪失のため生理的pHで負に荷電した側鎖を有する。遺伝的にコードされるアミノ酸は、L-Glu（E）およびL-Asp（D）などである。

40

【0217】

「塩基性アミノ酸または残基」は、アミノ酸がペプチドまたはポリペプチドに含まれている場合に約6を超えるpK値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を意味する。塩基性アミノ酸は、一般的に水素イオンとの会合のため生理的pHで正に荷電した側鎖を有する。遺伝的にコードされるアミノ酸は、L-Arg（R）およびL-Lys（K）などである。

【0218】

「極性アミノ酸または残基」は、生理的pHで非荷電であるが、2つの原子によって共有されている電子対がそれらの原子の1つによってより近接して保持されている少なくとも1つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコー

50

ドされる極性アミノ酸は、L-A s n (N)、L-G l n (Q)、L-S e r (S) および L-T h r (T) などである。

【0219】

「疎水性アミノ酸または残基」は、E i s e n b e r g ら、1984、J. M o l. B i o l.、179:125-142 頁の標準化コンセンサス疎水性スケールに従ったゼロを超える疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコードされるアミノ酸は、L-P r o (P)、L-I l e (I)、L-P h e (F)、L-V a l (V)、L-L e u (L)、L-T r p (W)、L-M e t (M)、L-A l a (A) および L-T y r (Y) などである。

【0220】

「芳香族アミノ酸または残基」は、少なくとも1つの芳香または複素芳香環を含む側鎖を有する親水性もしくは疎水性アミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコードされる芳香族アミノ酸は、L-P h e (F)、L-T y r (Y) および L-T r p (W) などである。その複素芳香族窒素原子の p K a により、L-H i s (H) は時として塩基性残基として、またはその側鎖が複素芳香環を含むので、芳香族残基として分類されるが、本明細書ではヒスチジンは、親水性残基として、または「拘束性残基」(下を参照)として分類される。

【0221】

「拘束性アミノ酸または残基」は、拘束性形状を有するアミノ酸または残基を意味する。本明細書において、拘束性残基は、L-P r o (P) および L-H i s (H) などである。ヒスチジンは、比較的小さいイミダゾール環を有するため、拘束性形状を有する。プロリンは、これも5員環を有するため、拘束性形状を有する。

【0222】

「非極性アミノ酸または残基」は、生理的 p H で荷電されておらず、2つの原子によって共有されている電子対が一般的に2つの原子のそれぞれによって同等に保持されている結合を有する側鎖(すなわち、側鎖は極性ではない)を有する疎水性アミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコードされる非極性アミノ酸は、L-G l y (G)、L-L e u (L)、L-V a l (V)、L-I l e (I)、L-M e t (M) および L-A l a (A) などである。

【0223】

「脂肪族アミノ酸または残基」は、脂肪族炭化水素側鎖を有する疎水性アミノ酸または残基を意味する。遺伝的にコードされる脂肪族アミノ酸は、L-A l a (A)、L-V a l (V)、L-L e u (L) および L-I l e (I) などである。

【0224】

「システイン」。アミノ酸 L-C y s (C) は、他の酸 L-C y s (C) アミノ酸または他のスルファニルもしくはスルフヒドリル含有アミノ酸とジスルフィド架橋を形成することができる点で異常である。「システイン様残基」は、システインおよびジスルフィド架橋の形成に利用可能なスルフヒドリル部分を含む他のアミノ酸を含む。L-C y s (C) (および-S H 含有側鎖を有する他のアミノ酸) が還元遊離-S H または酸化ジスルフィド架橋形のペプチドに存在する能力は、L-C y s (C) が正味の疎水性または親水性特性をペプチドに与えるかどうかに影響を及ぼす。L-C y s (C) は E i s e n b e r g (E i s e n b e r g ら、1984、前出) の標準化コンセンサス疎水性スケールに従った0.29の疎水性を示すが、本開示の目的のためにL-C y s (C) は、それ自体の特有な群に分類されると理解すべきである。

【0225】

「小アミノ酸または残基」は、3個以下の炭素および/またはヘテロ原子(α炭素および水素を除く)からなる側鎖を有するアミノ酸または残基を意味する。小アミノ酸または残基は、上の定義に従って脂肪族、非極性、極性または酸性小アミノ酸もしくは残基とさらに分類することができる。遺伝的にコードされる小アミノ酸または残基は、L-A l a (A)、L-V a l (V)、L-C y s (C)、L-A s n (N)、L-S e r (S)、

10

20

30

40

50

L-Thr (T) および L-Asp (D) などである。

【0226】

「ヒドロキシル含有アミノ酸または残基」は、ヒドロキシル(—OH)部分を含むアミノ酸を意味する。遺伝的にコードされるヒドロキシル含有アミノ酸は、L-Ser (S)、L-Thr (T) および L-Tyr (Y) などである。

【0227】

「保存的」アミノ酸置換または変異は、類似の側鎖を有する残基の互換性を意味し、したがって、アミノ酸の同じまたは類似の定義されたクラス内のアミノ酸によるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換を一般的に含む。しかし、本明細書で用いているように、保存的変異が代わりに脂肪族残基から脂肪族残基への、非極性残基から非極性残基への、極性残基から極性残基への、酸性残基から酸性残基への、塩基性残基から塩基性残基への、芳香族残基から芳香族残基へのまたは拘束性残基から拘束性残基への置換であり得る場合、保存的変異は、親水性残基から親水性残基への、疎水性残基から疎水性残基への、ヒドロキシル含有残基からヒドロキシル含有残基へのまたは小残基から小残基への置換を含まない。さらに、本明細書で用いているように、A、V、LまたはIは、他の脂肪族残基または他の非極性残基に保存的に変異させることができる。下の表Iに具体例としての保存的置換を示す。

【0228】

【表1】

表1：保存的置換

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

【0229】

「非保存的置換」は、著しく異なる側鎖の特性を有するアミノ酸によるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換または変異を意味する。非保存的置換は、上に示す定義された群内ではなく、群間のアミノ酸を用いてよい。一実施形態において、非保存的変異は、(a) 置換の範囲におけるペプチド主鎖の構造 (例えば、グリシンに対するプロリン) (b) 電荷もしくは疎水性または (c) 側鎖のバルクに影響を及ぼす。

【0230】

「欠失」は、参照ポリペプチドからの1つ以上のアミノ酸の除去によるポリペプチドの修飾を意味する。欠失は、操作改変モノアミノオキシダーゼ酵素の酵素活性を保持および／または改善された特性を保持すると同時に、1つ以上のアミノ酸、2つ以上のアミノ酸、5つ以上のアミノ酸、10以上のアミノ酸、15以上のアミノ酸または20以上のアミノ酸、参照酵素を作るアミノ酸の総数の10%までまたはアミノ酸の総数の20%までの除去を含み得る。欠失は、ポリペプチドの内部部分および／または末端部分に向けることができる。種々の実施形態において、欠失は、連続した部分を含んでよく、または不連続であってよい。

【0231】

「挿入」は、参照ポリペプチドからの1つ以上のアミノ酸の付加によるポリペプチドの修飾を意味する。いくつかの実施形態において、改善された操作改変モノアミノオキシダーゼ酵素は、天然に存在するモノアミノオキシダーゼへの1つ以上のアミノ酸の挿入ならびに他の改善されたモノアミノオキシダーゼポリペプチドへの1つ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入は、ポリペプチドの内部の部分におけるまたはカルボキシもしくはアミノ末端へのものであり得る。挿入は、本明細書で用いているように、当技術分野で公知である融合タンパク質を含む。挿入は、アミノ酸の連続した部分であってよく、または天然に存在するポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸によって分離されていてよい。

【0232】

指定された参照配列に関する「との差異」または「と異なる」は、参照配列と整列させたときの所定のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の差異を意味する。一般的に、2つの配列が最適に整列されている場合に、差異を決定することができる。差異は、参照配列と比較したアミノ酸残基の挿入、欠失または置換を含む。

【0233】

「フラグメント」は、本明細書で用いているように、アミノ末端および／またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が当該配列における対応する位置に同じであるポリペプチドを意味する。フラグメントは、少なくとも14アミノ酸長、少なくとも20アミノ酸長、少なくとも50アミノ酸長またはより長く、全長モノアミノオキシダーゼポリペプチドの70%、80%、90%、95%、98%および99%であり得る。

【0234】

「分離ポリペプチド」は、それに自然に付随する他の混入物、例えば、タンパク質、脂質およびポリヌクレオチドから実質的に分離されているポリペプチドを意味する。この用語は、それらの天然に存在する環境または発現系（例えば、宿主細胞またはインビボ合成）から除去または精製されたポリペプチドを含む。改善されたモノアミノオキシダーゼは、細胞内に存在し、細胞培地中に存在してよく、または溶解物もしくは分離調製物などの様々な形で調製することができる。したがって、いくつかの実施形態において、改善されたモノアミノオキシダーゼは、分離ポリペプチドであり得る。

【0235】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、該ポリペプチド種が存在する優勢な種である（すなわち、モルまたは重量基準でそれが組成物中の他の個々の巨大分子種より豊富である）組成物を意味し、対象種が存在する巨大分子種の少なくとも約50%（モルまたは重量%）を含む場合、一般的に実質的に精製された組成物である。一般的に、実質的に純粋なモノアミノオキシダーゼ組成物は、組成物中に存在するすべての巨大分子種の約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、約98%以上（モルまたは重量%）を含む。いくつかの実施形態において、対象種は、本質的な均質になるまで精製され（すなわち、混入物種は、通常の検出方法によって組成物中に検出することができない）、組成物は、本質的に単一巨大分子種からなっている。溶媒種、小分子（<500ダルトン）および元素イオン種は、巨大分子種とみなされない。いくつかの実施形態において、改善された分離モノアミノオキシダーゼポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【0236】

「緊縮ハイブリッド形成」は、本明細書において核酸ハイブリッドが安定である条件に適用するために用いる。当業者に公知であるように、ハイブリッドの安定性は、ハイブリッドの融解温度（ T_m ）に反映される。一般的に、ハイブリッドの安定性は、イオン強度、温度、G/C含量およびカオトロピック剤の存在の関数である。ポリヌクレオチドの T_m 値は、融解温度を予測するための公知の方法を用いて計算することができる（例えば、Baldinoら、Methods Enzymology、168：761-777頁；Boltonら、1962、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、48：1390頁；Bresslauerら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83：8893-8897頁；Freierら、1986、Proc. Na

10

20

30

40

50

tl. Acad. Sci. USA、83:9373-9377頁; Kierzekら、Biochemistry、25:7840-7846頁; Rychlikら、1990、Nucleic Acids Res、18:6409-6412頁(正誤表、1991、Nucleic Acids Res、19:698頁); Sambrookら、前出); Suggsら、1981、In Developmental Biology Using Purified Gene (Brownら編)、683-693頁、Academic Press; および Wetmur、1991、Crit Rev Biochem Mol Biol、26:227-259頁を参照。すべての刊行物を参照により本明細書に組み込む)。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書で開示したポリペプチドをコードし、中等度緊縮または高度緊縮条件などの定義された条件下で本開示の操作改変モノアミノキシダーゼ酵素をコードする配列の相補体とハイブリッド形成する。

10

【0237】

「ハイブリッド形成緊縮性」は、核酸のそのような洗浄条件に関連する。一般的に、ハイブリッド形成反応は、より低い緊縮性の条件下で行わせ、続いて可変であるが、より高い緊縮性の洗浄を行う。「中等度に緊縮性のハイブリッド形成」という用語は、標的DNAを、標的DNAとの約60%の同一性、好ましくは約75%の同一性、約85%の同一性を有する、標的ポリヌクレオチドとの約90%を超える同一性を有する相補的核酸に結合させる条件に適用される。具体例としての中等度に緊縮性の条件は、42℃における50%ホルムアルデヒド、5×デンハート溶液、5×SSPE、0.2%SDS中でのハイブリッド形成の後の42℃における0.2×SSPE、0.2%SDSでの洗浄に相当する条件である。「高緊縮ハイブリッド形成」は、定義されたポリヌクレオチド配列について溶液条件下で測定される熱的融解温度 T_m から約10℃以下である条件に一般的に適用される。いくつかの実施形態において、高緊縮条件は、65℃において0.018M NaCl中で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリッド形成を可能にする条件を意味する(すなわち、ハイブリッドが65℃の0.018M NaCl中で安定ではない場合、本明細書において予期されるように高緊縮条件下で安定ではない)。高緊縮条件は、例えば、42℃における50%ホルムアルデヒド、5×デンハート溶液、5×SSPE、0.2%SDSに相当する条件におけるハイブリッド形成の後の65℃における0.1×SSPEおよび0.1%SDSでの洗浄によってもたらすことができる。他の高緊縮ハイブリッド形成条件ならびに中等度に緊縮性の条件は、上で引用した参考文献に記載されている。

20

30

【0238】

「異種」ポリヌクレオチドは、実験技術により宿主細胞に導入されるあらゆるポリヌクレオチドを意味し、宿主細胞から除去され、実験操作に供され、次に宿主細胞に導入されるポリヌクレオチドを含む。

【0239】

「最適化されたコドン」は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンが、コードされるタンパク質が問題の生物において効率よく発現するように個々の生物において優先的に用いられるコドンに変化することを意味する。ほとんどのアミノ酸が「同義」または「同義語」コドンと呼ばれるいくつかのコドンによって表されるという点で、遺伝コードは、縮重しているが、個々の生物によるコドン使用頻度は、ランダムではなく、特定のコードトリプレットに偏っていることは周知である。このコドン使用頻度の偏りは、低コピー数タンパク質および生物のゲノムの凝集タンパク質コード領域と比べて所定の遺伝子、共通機能または先祖由来の遺伝子、高度に発現されるタンパク質に関して高い可能性がある。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択される宿主生物からの最適な産生のために最適化されたコドンであってよい。

40

【0240】

「好ましい最適な高コドン使用頻度バイアスコドン」は、同じアミノ酸をコードする他

50

のコードよりタンパク質コード領域において高い頻度で用いられるコードと同義である。好ましいコードは、単一遺伝子におけるコード使用頻度、共通機能もしくは起源の一連の遺伝子、高度に発現する遺伝子、全生物の凝集タンパク質コード領域におけるコード頻度、関連生物の凝集タンパク質コード領域におけるコード頻度またはそれらの組合せに関連して決定することができる。頻度が遺伝子発現のレベルとともに増加するコードは、一般的に発現に最適なコードである。特定の生物におけるコード頻度（例えば、コード使用頻度、相対的同義語コード使用頻度）およびコード選択を決定するための、例えば、クラスター分析または対応分析および遺伝子において用いられるコードの有効数を用いる多変量解析を含む、様々な方法が公知である。（GCG Codon Preference、Genetics Computer Group Wisconsin Package 10
; CodonW、John Peden、University of Nottingham; McInerney J. O.、1998、Bioinformatics、14:372-73頁; Stenicoら、1994、Nucleic Acids Res.、22:437-46頁; Wright F.、1990、Gene、87:23-29頁を参照）。コード使用頻度表は、生物の拡大しつつあるリストについて利用可能である（例えば、Wadaら、1992、Nucleic Acids Res.、20:2111-2118頁; Nakamuraら、2000、Nucl. Acids Res.、28:292頁; Duretら、前出; HenautおよびDanchin、「Escherichia coli and Salmonella」、1996、Neidhardら編、ASM Press、Washington D. C.、2047-2066頁を参照）。コード使用頻度を得るためのデータの出所は、タンパク質をコードすることができる利用可能なヌクレオチド配列に依存する可能性がある。これらのデータセットは、タンパク質発現をコードすることが実際に公知である核酸配列（例えば、完全なタンパク質コード配列-CDS）、発現配列タグ（ESTS）またはゲノム配列の予測コード配列を含む（例えば、Mount D.、Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis、Chapter 8、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、2001; Uberbacher E. C.、1996、Methods Enzymol.、266:259-281頁; Tiwarilら、1997、Comput. Appl. Biosci.、13:263-270頁を参照）。 20
30

【0241】

「制御配列」は、本開示のポリペプチドの発現に必要なまたは有利であるすべての成分を含むと本明細書において定義する。各制御配列は、天然またはポリペプチドをコードする核酸配列と異質であってよい。そのような制御配列は、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列および転写終結区を含むが、これらに限定されない。最小限、制御配列は、プロモーターならびに転写および翻訳停止シグナルを含む。制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域を有する制御配列の連結反応を促進する特異的制限部位を導入する目的のためにリンカーを備えていてよい。

【0242】

「作動可能に連結された」は、制御配列がポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を誘導するようなDNA配列のコード配列に対する位置に制御配列が適切に配置されている構成と本明細書において定義する。

【0243】

「プロモーター配列」は、コード領域の発現について宿主細胞によって認識されている核酸配列である。制御配列は、適切なプロモーター配列を含み得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を媒介する転写制御配列を含む。プロモーターは、最適な宿主細胞中で転写活性を示す、変異体、切断型およびハイブリッドプロモーターを含む核酸配列であってよく、宿主細胞に対して同種または異種である細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

【0244】

「 $-(C_1-C_{10})$ アルキル」は、1個から10個の炭素原子を有する直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖 $-(C_1-C_{10})$ アルキルは、 $-$ メチル、 $-$ エチル、 $-n$ -プロピル、 $-n$ -ブチル、 $-n$ -ペンチル、 $-n$ -ヘキシル、 $-n$ -ヘプチル、 $-n$ -オクチル、 $-n$ -ノニルおよび $-n$ -デシルなどである。分枝アルキルは、 $-$ メチル、 $-$ エチルまたは $-$ プロピルなどの1つ以上の直鎖 $-(C_1-C_8)$ アルキル基が直鎖アルキルの $-CH_2-$ 基における1つまたは両方の水素を置換していることを意味する。分枝非環状炭化水素は、 $-$ メチル、 $-$ エチルまたは $-$ プロピルなどの1つ以上の直鎖 $-(C_1-C_{10})$ アルキル基が直鎖非環状炭化水素の $-CH_2-$ 基における1つまたは両方の水素を置換していることを意味する。代表的な分枝 $-(C_1-C_{10})$ アルキルは、イソプロピル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、3-エチルブチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、3-メチルヘキシル、4-メチルヘキシル、5-メチルヘキシル、1,2-ジメチルペンチル、1,3-ジメチルペンチル、1,2-ジメチルヘキシル、1,3-ジメチルヘキシル、3,3-ジメチルヘキシル、1,2-ジメチルヘプチル、1,3-ジメチルヘプチルおよび3,3-ジメチルヘプチルなどである。

10

20

【0245】

「 $-(C_1-C_6)$ アルキル」は、1個から6個の炭素原子を有する直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖 $-(C_1-C_6)$ アルキルは、 $-$ メチル、 $-$ エチル、 $-n$ -プロピル、 $-n$ -ブチル、 $-n$ -ペンチルおよび $-n$ -ヘキシルなどである。代表的な分枝 $-(C_1-C_6)$ アルキルは、イソプロピル、*sec*-ブチル、*iso*-ブチル、*tert*-ブチル、*iso*-ペンチル、*neo*-ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、3-エチルブチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチルおよび3,3-ジメチルブチルなどである。

30

【0246】

「 $-(C_1-C_4)$ アルキル」は、1個から4個の炭素原子を有する直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖 $-(C_1-C_4)$ アルキルは、 $-$ メチル、 $-$ エチル、 $-n$ -プロピルおよび $-n$ -ブチルなどである。代表的な分枝 $-(C_1-C_4)$ アルキルは、イソプロピル、*sec*-ブチル、*iso*-ブチルおよび*tert*-ブチルなどである。

【0247】

「 $-(C_1-C_3)$ アルキル」は、1個から3個の炭素原子を有する直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖 $-(C_1-C_3)$ アルキルは、 $-$ メチル、 $-$ エチルおよび $-n$ -プロピルである。代表的な分枝 $-(C_1-C_3)$ アルキルは、*iso*-プロピルなどである。

40

【0248】

「 $-(C_1-C_2)$ アルキル」は、1個または2個の炭素原子を有する直鎖非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖 $-(C_1-C_2)$ アルキルは、 $-$ メチルおよび $-$ エチルである。

【0249】

「 $-(C_2-C_{10})$ アルケニル」は、2個から10個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。分枝アルケニルは、 $-$ メチル、 $-$ エチルまたは $-$ プロピルなどの1つ以上の直鎖 $-(C_1-C_8)$ ア

50

ルキル基が直鎖アルケニルの $-CH_2-$ または $-CH=$ 基における1つまたは両方の水素を置換していることを意味する。代表的な直鎖および分枝(C_2-C_{10})アルケニルは、 $-$ ビニル、 $-$ アリル、 $1-$ ブテニル、 $-2-$ ブテニル、 $-$ イソブチレニル、 $-1-$ ペンテニル、 $-2-$ ペンテニル、 $-3-$ メチル $-1-$ ブテニル、 $2-$ メチル $-2-$ ブテニル、 $-2, 3-$ ジメチル $-2-$ ブテニル、 $-1-$ ヘキセニル、 $-2-$ ヘキセニル、 $-3-$ ヘキセニル、 $-1-$ ヘプテニル、 $-2-$ ヘプテニル、 $-3-$ ヘプテニル、 $-1-$ オクテニル、 $-2-$ オクテニル、 $-3-$ オクテニル、 $-1-$ ノネニル、 $-2-$ ノネニル、 $-3-$ ノネニル、 $-1-$ デセニル、 $-2-$ デセニル、 $-3-$ デセニルなどである。

【0250】

「 $-(C_2-C_6)$ アルケニル」は、2個から6個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖および分枝 $-(C_2-C_6)$ アルケニルは、 $-$ ビニル、 $-$ アリル、 $-1-$ ブテニル、 $-2-$ ブテニル、 $-$ イソブチレニル、 $-1-$ ペンテニル、 $-2-$ ペンテニル、 $-3-$ メチル $-1-$ ブテニル、 $-2-$ メチル $-2-$ ブテニル、 $-2, 3-$ ジメチル $-2-$ ブテニル、 $-1-$ ヘキセニル、 $-2-$ ヘキセニル、 $-3-$ ヘキセニルなどである。

【0251】

「 $-(C_2-C_{10})$ アルキニル」は、2個から10個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。分枝アルキニルは、 $-$ メチル、 $-$ エチルまたは $-$ プロピルなどの1つ以上の直鎖 $-(C_1-C_8)$ アルキル基が直鎖アルキニルの $-CH_2-$ 基における1つまたは両方の水素を置換していることを意味する。代表的な直鎖および分枝 $-(C_2-C_{10})$ アルキニルは、 $-$ アセチレニル、 $-$ プロピニル、 $-1-$ ブチニル、 $-2-$ ブチニル、 $-1-$ ペンチニル、 $-2-$ ペンチニル、 $-3-$ メチル $-1-$ ブチニル、 $-4-$ ペンチニル、 $-1-$ ヘキシニル、 $-2-$ ヘキシニル、 $-5-$ ヘキシニル、 $-1-$ ヘプチニル、 $-2-$ ヘプチニル、 $-6-$ ヘプチニル、 $-1-$ オクチニル、 $-2-$ オクチニル、 $-7-$ オクチニル、 $-1-$ ノニル、 $-2-$ ノニル、 $-8-$ ノニル、 $-1-$ デシニル、 $-2-$ デシニル、 $-9-$ デシニルなどである。

【0252】

「 $-(C_2-C_6)$ アルキニル」は、2個から6個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む直鎖または分枝非環状炭化水素を意味する。代表的な直鎖および分枝 $-(C_2-C_6)$ アルキニルは、 $-$ アセチレニル、 $-$ プロピニル、 $-1-$ ブチニル、 $-2-$ ブチニル、 $-1-$ ペンチニル、 $-2-$ ペンチニル、 $-3-$ メチル $-1-$ ブチニル、 $-4-$ ペンチニル、 $-1-$ ヘキシニル、 $-2-$ ヘキシニル、 $-5-$ ヘキシニルなどである。

【0253】

「 $-(C_1-C_6)$ アルコキシ」は、1つ以上のエーテル基および1個から6個の炭素原子を有する直鎖または分枝非環式炭化水素を意味する。代表的な直鎖および分枝 $-(C_1-C_6)$ アルコキシは、 $-$ メトキシ、 $-$ エトキシ、 $-$ メトキシメチル、 $-2-$ メトキシエチル、 $-5-$ メトキシペンチル、 $-3-$ エトキシブチルなどである。

【0254】

「 $-(C_3-C_{12})$ シクロアルキル」は、3個から12個の炭素原子を有する飽和単環式炭化水素を意味する。代表的な $-(C_3-C_{12})$ シクロアルキルは、 $-$ シクロプロピル、 $-$ シクロブチル、 $-$ シクロペンチル、 $-$ シクロヘキシル、 $-$ シクロヘプチル、 $-$ シクロオクチル、 $-$ シクロノニル、 $-$ シクロデシルおよび $-$ シクロドデシルである。

【0255】

「 $-(C_4-C_8)$ シクロアルキル」または「4-8員シクロアルキル環」は、4個から8個の炭素原子を有する飽和単環式炭化水素を意味する。代表的な $-(C_4-C_8)$ シクロアルキルは、 $-$ シクロブチル、 $-$ シクロペンチル、 $-$ シクロヘキシル、 $-$ シクロヘプチルおよび $-$ シクロオクチルである。

【0256】

「 $-(C_3-C_8)$ シクロアルキル」は、3 個から 8 個の炭素原子を有する飽和単環式炭化水素を意味する。代表的な $-(C_3-C_8)$ シクロアルキルは、 $-\text{シクロプロピル}$ 、 $-\text{シクロブチル}$ 、 $-\text{シクロペンチル}$ 、 $-\text{シクロヘキシル}$ 、 $-\text{シクロヘプチル}$ および $-\text{シクロオクチル}$ などである。

【0257】

「 $-(C_3-C_7)$ シクロアルキル」は、3 個から 7 個の炭素原子を有する飽和単環式炭化水素を意味する。代表的な $-(C_3-C_7)$ シクロアルキルは、 $-\text{シクロプロピル}$ 、 $-\text{シクロブチル}$ 、 $-\text{シクロペンチル}$ 、 $-\text{シクロヘキシル}$ および $-\text{シクロヘプチル}$ などである。

【0258】

「 $-(6-10\text{員})$ 複素二環」または「 $-(6-10\text{員})$ 二環式複素環」は、飽和、不飽和非芳香族または芳香族である $6-10\text{員}$ 二環式複素環を意味する。 $-(6-10\text{員})$ 複素二環は、第四級化することができる窒素；酸素；ならびにスルホキシドおよびスルホンを含む硫黄から独立に選択される 1 個から 4 個のヘテロ原子を含む。 $-(6-10\text{員})$ 複素二環は、窒素または炭素原子を介して結合させることができる。代表的な $-(6-10\text{員})$ 複素二環は、 $-3\text{-アザビシクロ}[3.1.0]$ ヘキサン、 $-\text{キノリニル}$ 、 $-\text{イソキノリニル}$ 、 $-\text{クロモニル}$ 、 $-\text{クマリニル}$ 、 $-\text{インドリル}$ 、 $-\text{インドリジニル}$ 、ベンゾ $[b]$ フラニル、ベンゾ $[b]$ チオフェニル、 $-\text{インダゾリル}$ 、 $-\text{プリニル}$ 、 $-4\text{H}-\text{キノリジニル}$ 、 $-\text{イソキノリル}$ 、 $-\text{キノリル}$ 、 $-\text{フタラジニル}$ 、 $-\text{ナフチリジニル}$ 、 $-\text{カルバゾリル}$ 、 $-\beta\text{-カルボリニル}$ 、 $-\text{インドリニル}$ 、 $-\text{イソインドリニル}$ 、 $-1, 2, 3, 4\text{-}$ テトラヒドロキノリニル、 $-1, 2, 3, 4\text{-}$ テトラヒドロイソキノリニル、ピロロピロリルなどである。

【0259】

「 $-\text{CH}_2$ (ハロ)」は、メチル基の水素の 1 つがハロゲンにより置換されたメチル基を意味する。代表的な $-\text{CH}_2$ (ハロ) 基は、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ および $-\text{CH}_2\text{I}$ などである。

【0260】

「 $-\text{CH}$ (ハロ) $_2$ 」は、メチル基の水素の 2 つがハロゲンにより置換されたメチル基を意味する。代表的な $-\text{CH}$ (ハロ) $_2$ 基は、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CHBr}_2$ 、 $-\text{CHBrCl}$ 、 $-\text{CHI}_2$ および $-\text{CHI}_2$ などである。

【0261】

「 $-\text{C}$ (ハロ) $_3$ 」は、メチル基の水素のそれぞれがハロゲンにより置換されたメチル基を意味する。代表的な $-\text{C}$ (ハロ) $_3$ 基は、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CCl}_3$ 、 $-\text{CBr}_3$ および $-\text{CI}_3$ などである。

【0262】

「 $-\text{ハロゲン}$ 」または「 $-\text{ハロ}$ 」は、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ または $-\text{I}$ を意味する。

【0263】

「 Oキソ 」、「 $=\text{O}$ 」などは、本明細書で用いているように、炭素または他の元素に二重結合した酸素を意味する。

【0264】

第 1 の基が「1 つ以上の」第 2 の基「で置換」されている場合、第 1 の基の 1 つ以上の水素原子は、対応する数の第 2 の基で置換されている。第 2 の基の数が 2 つ以上である場合、各第 2 の基は、同じまたは異なっていることがあり得る。

【0265】

一実施形態において、第 1 の基は、3 つまでの第 2 の基で置換されている。

【0266】

他の実施形態において、第 1 の基は、1 つまたは 2 つの第 2 の基で置換されている。

【0267】

他の実施形態において、第 1 の基は、1 つのみの第 2 の基で置換されている。

【0268】

本明細書で用いているように、「立体異性体」という用語は、空間におけるそれらの原子の配向のみが異なる個々の分子のすべての異性体に関する一般的用語である。これは、鏡像異性体および互いの鏡像ではない複数のキラル中心を有する化合物の異性体（「ジアステレオマー」）を含む。

【0269】

「キラル中心」という用語は、4つの異なる基が結合している炭素原子を意味する。

【0270】

「鏡像異性体」という用語は、その鏡像に重ね合わせることができず、したがって光学的に活性である（鏡像異性体は偏光面を1方向に回転させ、その鏡像は偏光面を反対の方向に回転させる）分子を意味する。

10

【0271】

「ラセミ体」という用語は、光学的に不活性である、等量の鏡像異性体の混合物を意味する。

【0272】

「分割」という用語は、分子の2つの鏡像異性体の1つの分離または濃縮または枯渇を意味する。

【0273】

「実質的に鏡像異性的に純粋」は、本明細書で用いているように、化合物の表示された鏡像異性体が、同じ化合物の他の鏡像異性体より大きい程度に存在することを意味する。したがって、特定の実施形態において、実質的に鏡像異性的に純粋な化合物は、同じ化合物の他の鏡像異性体と比べて80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の鏡像異性体過剰率で存在する。

20

【0274】

「実質的に立体異性的に純粋」は、本明細書で用いているように、化合物の表示された鏡像異性体またはジアステレオマーが、同じ化合物の他の鏡像異性体またはジアステレオマーより大きい程度に存在することを意味する。「立体選択性」について上で述べたように、鏡像異性体過剰率およびジアステレオマー過剰率は、立体異性体過剰率の類型である。したがって、特定の実施形態において、実質的に立体異性的に純粋な化合物は、同じ化合物の他の鏡像異性体またはジアステレオマーと比べて80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の立体異性体過剰率で存在する。

30

【0275】

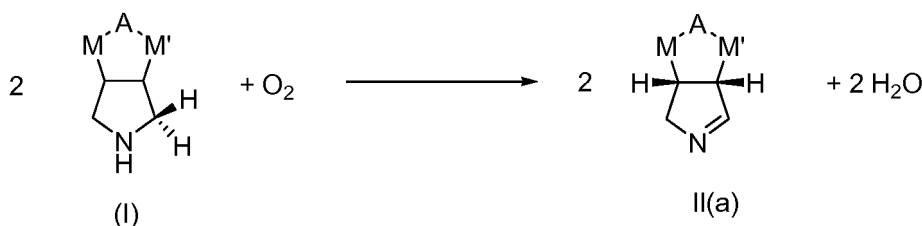
5. 4 本開示の複素二環式化合物を調製する方法

本開示の複素二環式化合物は、本明細書で開示した生物学的触媒としてのモノアミノキシダーゼを用いた下で開示する生体触媒法を用いて合成される。

【0276】

【化31】

スキーム1



40

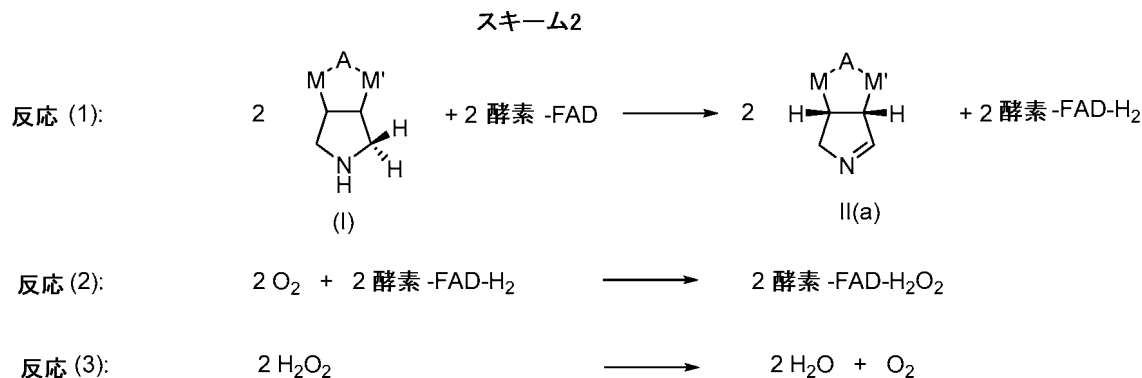
【0277】

スキーム1に、第二級アミン、すなわち、構造式Iによる複素二環式化合物を構造式I(a)の対応するイミン化合物に酸化する、本開示のモノアミノキシダーゼにより触媒される反応を示す。

【0278】

50

【化 3 2】



10

【0 2 7 9】

スキーム 2 に、一緒になってスキーム 1 に示す総括的な正味の反応を与える 3 つの素反応を示す。スキーム 2 の第 1 の反応において、第二級アミン、すなわち、構造式 I による複素二環式化合物が本開示のモノアミノキシダーゼ（フラビンアデニンヌクレオチド補因子（FAD）と複合体を形成している）により構造式 II（a）の対応するイミン化合物に酸化されて、構造式 II の対応する実質的に鏡像異性的に純粋なイミンおよび還元モノアミノキシダーゼ FAD 複合体（酵素 - FAD - H₂）が得られる。第 2 の段階において、還元モノアミノキシダーゼ（酵素 - FAD - H₂ 複合体）が分子状酸素により再酸化されて、過酸化水素（H₂O₂）が副生成物として生ずる。第 3 の反応（モノアミノキシダーゼによって触媒されない）において、過酸化水素（H₂O₂）が水と酸素に分解される。

20

【0 2 8 0】

基質である構造式 I の第二級アミンは、市販されており、または当技術分野で公知もしくは当技術分野で公知の方法および試薬から本開示に照らして容易に適応される方法および試薬を用いて容易に合成される（例えば、De la l u ら（1999）、J. H e t e r o c y c l i c C h e m.、36、681 頁；WO2007/022459；および WO2007/075790 および本明細書で引用した参考文献を参照）。

30

【0 2 8 1】

過酸化水素は、モノアミノキシダーゼ酵素を不可逆的に不活性化することができる強い酸化剤である。したがって、特定の実施形態において、過酸化水素（H₂O₂）が分子状酸素と水に分解される、上のスキーム 2 の段階 3 に示す不均化反応を促進するのに有用な化合物。特定の実施形態において、この成分は、Pd、Fe などであるが、これらに限定されない化学物質から選択され、一方、他の実施形態において、この成分は、カタラーゼ酵素などの酵素である。特定の実施形態において、反応混合物は、2 分子の過酸化水素が分解されて、2 分子の水と 1 分子の酸素が生ずる、スキーム 2 の段階 3 の不均化反応を触媒するカタラーゼ酵素をさらに含む。特定の実施形態において、カタラーゼは、約 0.01 % から約 1 %（重量／容積）、約 0.05 % から約 0.5 %（重量／容積）または約 0.1 % から約 0.2 %（重量／容積）の濃度で反応に含められるアスペルギルス・ニガーカータラーゼである。

40

【0 2 8 2】

構造式 I の化合物が揮発性液体であるこれらの例において、扱いを容易にするために、それを塩として提供することができる。この実施例の一態様において、例えば、ヘプタンに溶解した遊離塩基の 10 % 溶液に 1 当量の酢酸を加えることによって、アミン基質は酢酸塩に変換される。沈殿した塩を収集し、溶媒（例えば、塩が析出した溶媒、例えば、ヘプタン）で洗浄し、室温（約 21 °C）で減圧下で乾燥する。

【0 2 8 3】

スキーム 1 に示したように、最終的酸化剤は、分子状酸素である。水に対する酸素の溶

50

解度が限られたものであることを考慮し、温度および塩分濃度（溶質濃度）が増加するにつれて溶解度が低下することを考慮に入れると、反応のための溶液中の分子状酸素は、気相から気-液物質移動によって補給しなければならない。一般的に、実際的な反応速度を得るために供給される好ましいモノアミノオキシダーゼの活性および量は、反応が気-液物質移動の速度によって制限された状態になるのに十分である。周知のように、気-液物質移動の速度は、液体中のガスの分圧、液体中のガスの溶解度および気-液界面の面積に依存する。したがって、気-液物質移動律速反応の速度は、スパージングによるものを含む、攻撃的な気-液混合、中空インペラー吸引、向流気-液循環、垂直方向蛇行管状流などを行う、環境を工学的に操作することによって増加させることができる。さらに、環境の工学的操作において、酸素気-液物質移動律速反応の速度は、ガス全圧を増加させること、ガス中の酸素の分率を増加させること（濃縮など）、または両方の空気を精製酸素で置換することにより酸素の分圧を増加させることによって増加させることができる。特定の実施形態において、溶存酸素の濃度および／または気相からの酸素消費の速度を連続的にモニターし、有益な反応速度または完結までの総反応時間を得るために酸素供給速度、分圧、混合効率またはそれらの組合せを調節する。

10

【0284】

特定の実施形態において、反応混合物は、少なくとも1つの消泡剤も含んでいてよい。特定の実施形態において、消泡剤は、Antiform-204またはAntiform Y-30（Sigma、St. Louis MO）または同様のものなどであるが、これらに限定されない市販の物質である。他の実施形態において、反応物は、複数の消泡剤を含んでいてよい。消泡剤は、約0.01%から約1%（固体の場合には重量／容積または液体の場合には容積／容積）、約0.05%から約0.5%または約0.1%から約0.2%の濃度で反応物に含めることができる。

20

【0285】

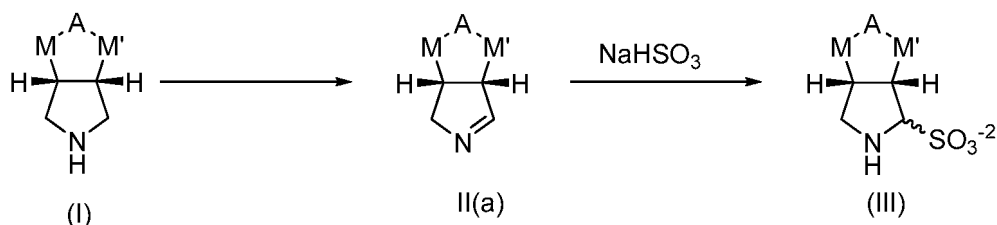
特定の実施形態において、構造式 I I の酸化イミン化合物は、反応混合物から分離し、精製し、特性を評価することができる。下で述べる他の実施形態において、構造式 I I のイミン化合物は、他の付加体または中間体に変換し、分離または精製せずに後の段階に用いることができる。

【0286】

【化33】

30

スキーム3



【0287】

特定の実施形態において、本開示のモノアミノオキシダーゼは、構造式 I I の生成物イミンにより阻害される可能性がある。したがって、特定の実施形態において、構造式 I の化合物が構造式 I I の化合物に酸化される反応は、構造式 I I のイミン化合物と反応して、スキーム 3 に示すように、本開示のモノアミノオキシダーゼを阻害する能力が低いまたは能力がない付加体を生成する物質をさらに含む。この実施形態の一態様において、この物質は、阻害量の構造式 I I のイミン化合物の蓄積を防ぐのに十分に高いが、酵素阻害量の当物質の蓄積を避けるのに十分に低い量で反応の開始時に加える、または完結的もしくは連続的に加える。一実施形態において、この物質は、水中で重亜硫酸ナトリウムに水和される、メタ重亜硫酸ナトリウムとして都合よく供給され得る重亜硫酸ナトリウムである。重亜硫酸塩と構造式 I I のイミン化合物との反応により、構造式 I I I の重亜硫酸付加体を得られる。特定の実施形態において、重亜硫酸ナトリウムは、この試薬が「即時に」

40

50

消費され、構造式 I I の潜在的に阻害性イミン生成物が構造式 I I I のより低い阻害性または非阻害性の重亜硫酸付加体として「捕捉」される速度で反応物に連続的に加える。

【0288】

モノアミノオキシダーゼがイミン生成物により阻害されるか否かにかかわらず、イミン生成物に反応する重亜硫酸塩の添加は、実際的方法に工学技術上の選択肢も与えるものである。本発明の特定のイミンは、高度に揮発性であり、それらのうち、一部のものは悪臭が強くおよび／または有毒である。遊離塩基としてのそれらの封じ込めには、ガス流のない閉鎖反応または化学的捕捉物の効率のよい凝縮（例えば、重亜硫酸塩溶液による）が必要である。それらの重亜硫酸付加体（アミノスルホネート）へのインサイツでの反応は、同じ反応容器中のシアニドとの後続反応を行う選択肢も提供すると同時にこれらの工学技術上の制約を取り除くものである。

10

【0289】

構造式 I I I の重亜硫酸付加体の生成は、高い pH で逆転させることができ、それにより、構造式 I I の対応するイミンが再生される。したがって、特定の実施形態において、スキーム 3 の反応を、pH を約 13 に上昇させるための塩基、例えば、10N NaOH の添加によりクエンチさせて、例えば、メチルtertブチルエーテル（「MBTE」）で抽出することができる構造式 I I のイミンを再生し、特定の実施形態において、蒸留により分離して、構造式 I I のイミンを無色の油として得る。

【0290】

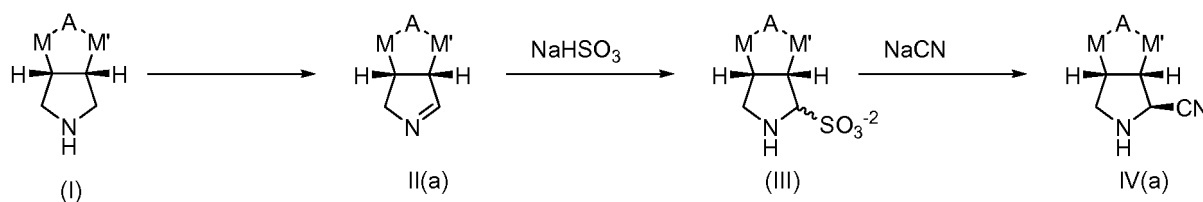
特定の実施形態において、一部は構造式 I の化合物の構造式 I I の化合物への変換のための生体触媒として用いられるモノアミノオキシダーゼの基質および生成物阻害を最小限にするまたは未然に防ぐために、構造式 I の基質、封鎖剤（例えば、重亜硫酸ナトリウム）および pH 調節剤（例えば、NaOH）の添加の速度をモニターし、制御する。

20

【0291】

【化34】

スキーム4



30

【0292】

他の実施形態において、スキーム 4 に示すように、NaCN をスキーム 3 の反応に加え、pH を約 10 に上昇させ、それにより、構造式 I I I の重亜硫酸付加体を構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物に立体選択的に変換する。この実施形態の態様において、約 1 から約 3 当量、約 1 から約 2、約 1.05 から約 1.5 当量、または約 1.1 から約 1.2 当量の NaCN（構造式 I I のイミン化合物に対して）を反応物に加えて、構造式 I I I の亜硫酸付加体を構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物に変換する。さらに、式 I I I の化合物の反応は、構造式 I V (b) のシスアミノニトリル化合物を生成する。

40

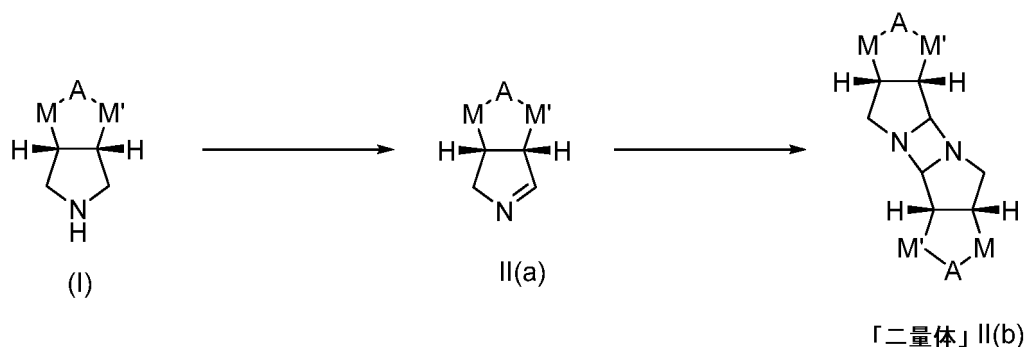
【0293】

構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物は、例えば、2-メチルテトラヒドロフラン、MTBE または酢酸イソプロピルを用いて反応混合物から抽出することができる（1:1 有機溶媒：水性反応混合物）。トランスアミノニトリル化合物は、有機溶媒抽出物、例えば、有機抽出物から回収することができ、場合による中間体のさらなる清澄化を行い、減圧下で濃縮して、構造式 I V のアミノニトリル化合物を得ることができる。

【0294】

【化 3 5】

スキーム5



10

【0 2 9 5】

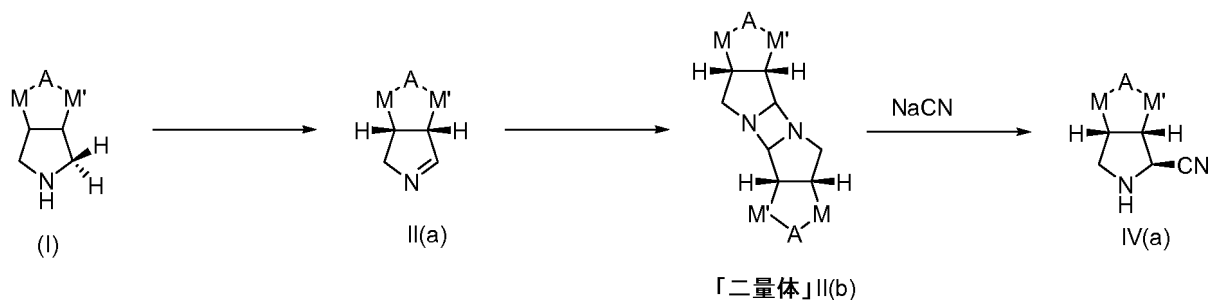
特定の実施形態において、構造式 I I のイミン化合物は、反応してスキーム 5 に示した二量体構造を形成し（例えば、Int. J. Chem. Kinet. 1998、30（2）、129-136 頁を参照）、それにより、本開示のモノアミノオキシダーゼの生成物阻害を最小限とするまたは未然に防ぐ。モノアミノオキシダーゼがイミン生成物により阻害されるか否かにかかわらず、二量体化は、実際的方法に工学技術上の選択肢も与えるものである。二量体は、たとえそうであっても、対応するイミンよりはるかに揮発性が低く、混入物揮発性イミンを工学的に処理する必要性を実質的に軽減する。さらに、二量体は、ろ過、抽出または水蒸気蒸留により反応混合物から一般的に容易に回収することができ、一般的に本方法の後続段階に直接的に用いることができる。あるいは、二量体は、一般的に酸性溶液に溶解して、所望の二環式プロリン類似体および誘導体を生成する後続段階における使用に適する単量体イミン塩溶液を得ることができる。

20

【0 2 9 6】

【化 3 6】

スキーム6



30

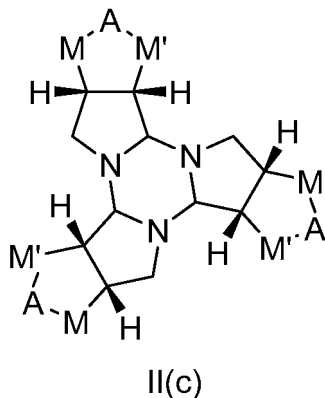
【0 2 9 7】

ある種の条件下で、ピロリジン単量体化合物のイミン（例えば、3, 4-ジヒドロ-2 H-ピロール）は、二量体を形成し、次に熱力学的に有利な三量体構造を形成する。したがって、式 I I (a) の特定の化合物は、二量体を形成するだけではなく、排他的に、または単量体および二量体化合物と若干の混合した状態で三量体（例えば、式 I I (c) の化合物）も続いて形成する。

40

【0 2 9 8】

【化 3 7】



10

【0299】

そのような三量体の形成の有利性は、置換基に依存し得る。しかし、式 I I (c) のそのような三量体化合物は、本開示の反応に用いる場合、二量体と比べて反応性の差をほとんど示さないと予想される。したがって、メカニズムによって拘束されずに、式 I I (c) の三量体の形成を受ける式 I I (a) の化合物は、二量体と同等の反応性を示すと予想される。

【0300】

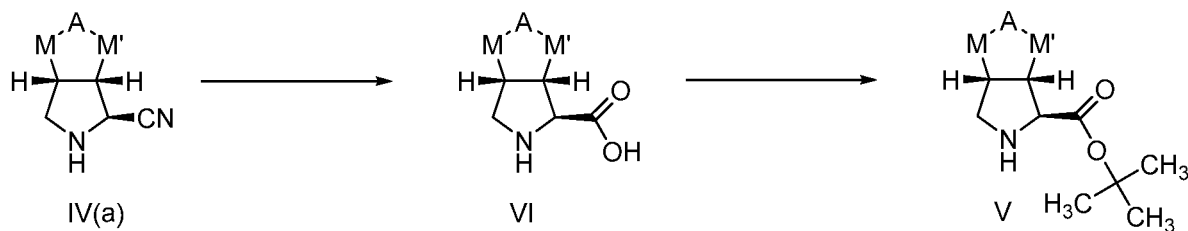
20

溶媒、例えば、MTBEまたはトルエン中への抽出後に、スキーム5により生成した二量体をNaCNおよび酸（例えば、クエン酸、酢酸もしくは塩酸）とまたはHCN（0℃）と接触させて、構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物および式 I I (b) のシスアミノニトリル化合物を得ることができる。

【0301】

【化 3 8】

スキーム7



30

【0302】

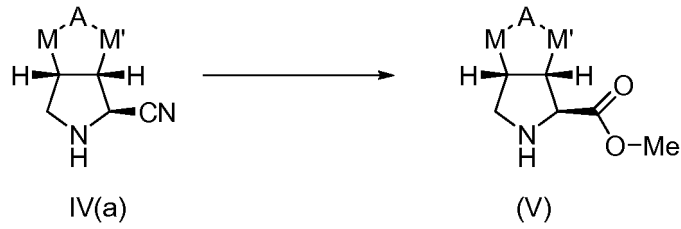
例えば、スキーム4またはスキーム6により調製された構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物は、水性酸（例えば、HClまたはH₂SO₄）と接触させて、構造式 V I のアミノ酸を得ることができる。部分R⁵が α -tertブチルである、構造式Vの対応する α -tertブチルエステルは、スキーム7に示すように、構造式V Iのアミン化合物を酸（例えば、メタンスルホン酸）およびイソブチレンまたは α -tertブチルエステル（例えば、酢酸 α -tertブチル）と接触させることによって調製される。

40

【0303】

【化 3 9】

スキーム8



【0304】

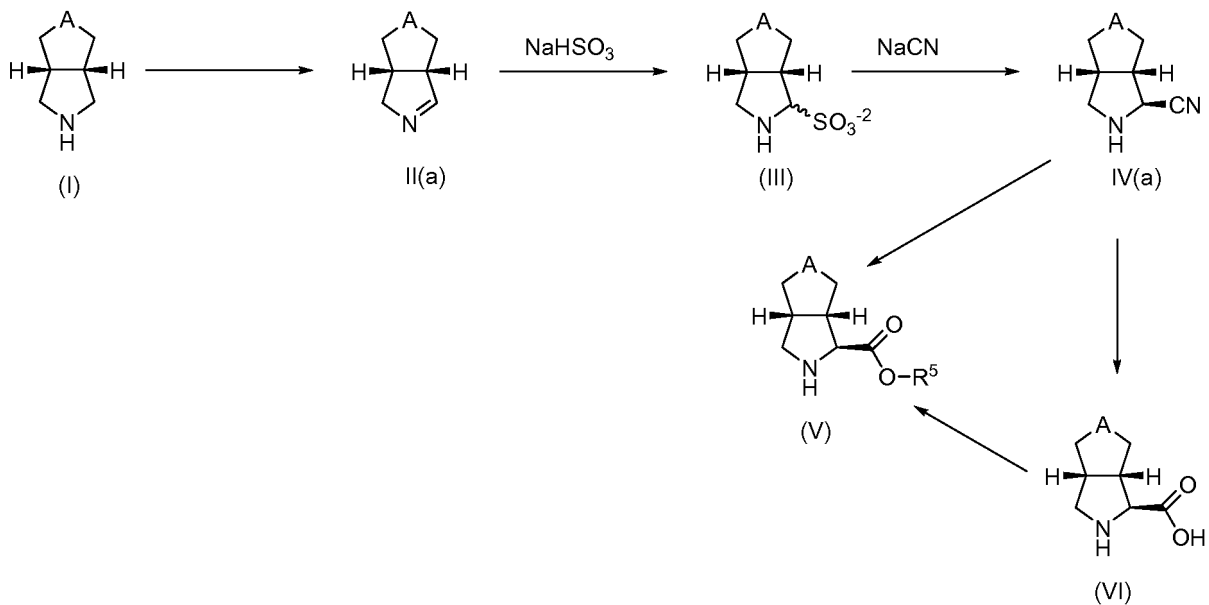
10

他の実施形態において、例えば、スキーム 4 またはスキーム 6 により調製された構造式 I V (a) のトランスアミノニトリル化合物は、スキーム 8 に示すように、ペンナー反応において HCl およびメタノールと接触させて、部分 R⁵ が -CH₃ である、構造式 V のメチルエステルを得ることができる。

【0305】

【化 4 0】

スキーム9



20

30

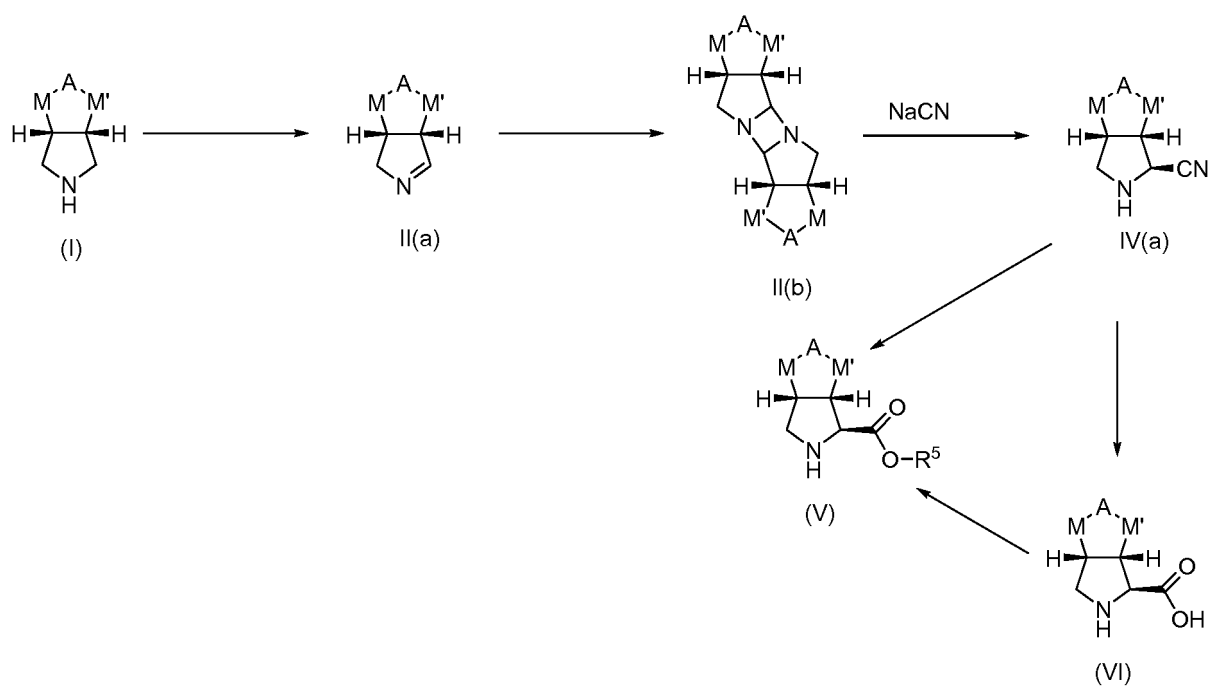
【0306】

スキーム 9 に、構造式 I I のイミン生成物が、構造式 I V のアミノニトリルへのその変換の途上で構造式 I I I の亜硫酸付加体として水溶液中に保持されている、構造式 I の第二級アミンからの構造式 V および V I による化合物の調製の全過程を示す。

【0307】

【化 4 1】

スキーム10



10

20

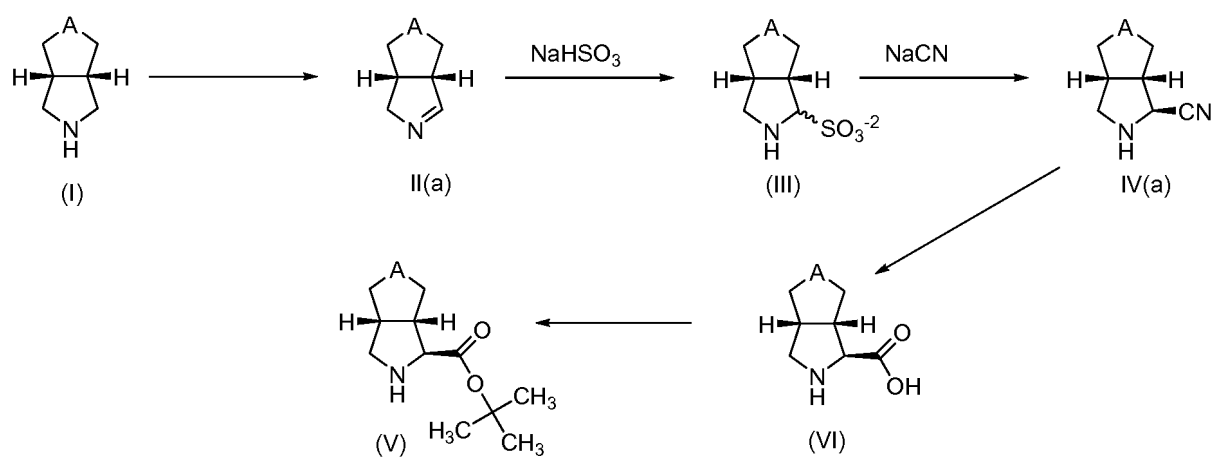
【0308】

スキーム10に、構造式IIのイミン生成物が、構造式IVのアミノニトリルへのその変換の途上で構造式II(b)の化合物に二量体化されている、構造式Iの第二級アミンからの構造式VおよびVIによる化合物の調製の全過程を示す。

【0309】

【化 4 2】

スキーム11



30

40

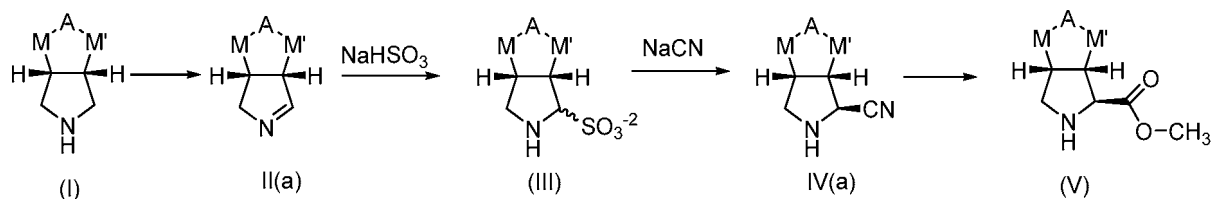
【0310】

スキーム11に、スキーム4および7の反応を合わせた構造式Iの第二級アミンからの構造式VIおよび構造式V（部分R⁵が-tertブチルである）による化合物の調製の全過程を示す。

【0311】

【化 4 3】

スキーム12



【0312】

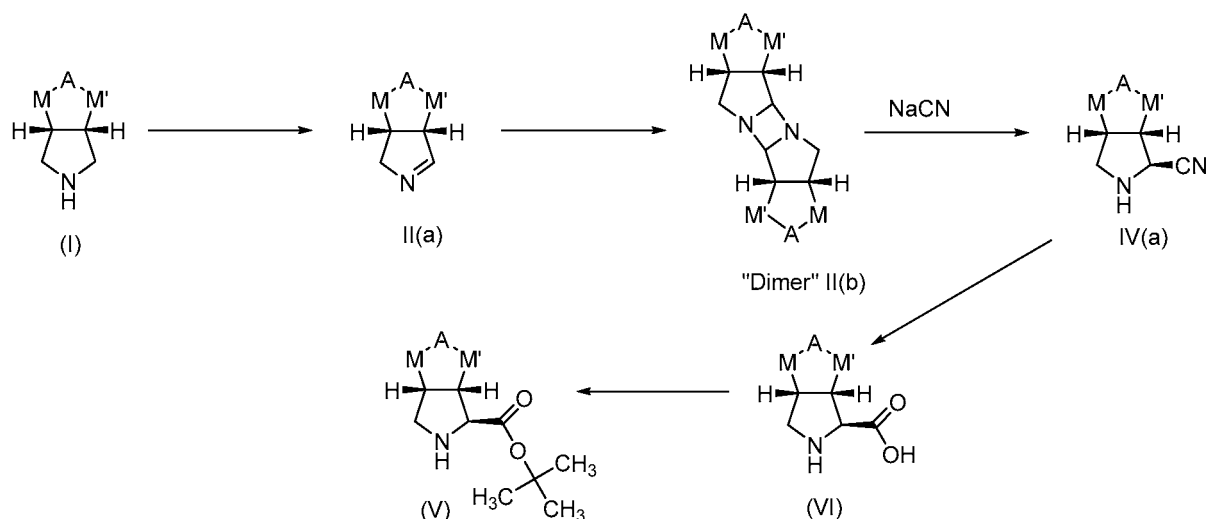
10

スキーム12に、スキーム4および8の反応を合わせた構造式Iの第二級アミンからの構造式V（部分R⁵が-CH₃である）による化合物の調製の全過程を示す。

【0313】

【化 4 4】

スキーム13



20

【0314】

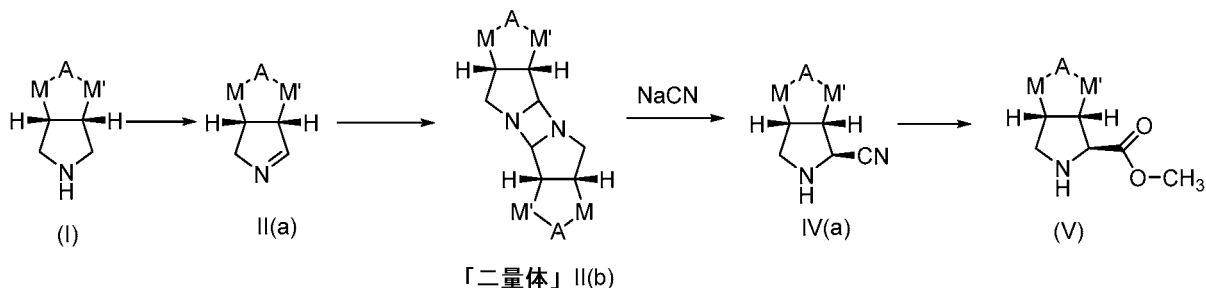
30

スキーム13に、スキーム6および7の反応を合わせた構造式Iの第二級アミンからの構造式V（部分R⁵が-t-ブチルである）による化合物の調製の全過程を示す。

【0315】

【化 4 5】

スキーム14



40

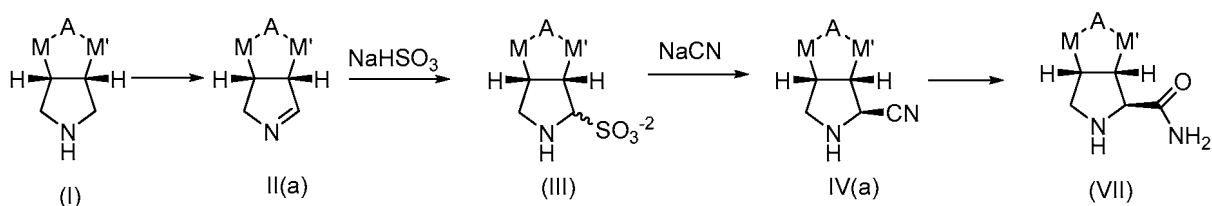
【0316】

スキーム14に、スキーム6および8の反応を合わせた構造式Iの第二級アミンからの構造式V（部分R⁵が-CH₃である）による化合物の調製の全過程を示す。

【0317】

【化 4 6】

スキーム15



【0318】

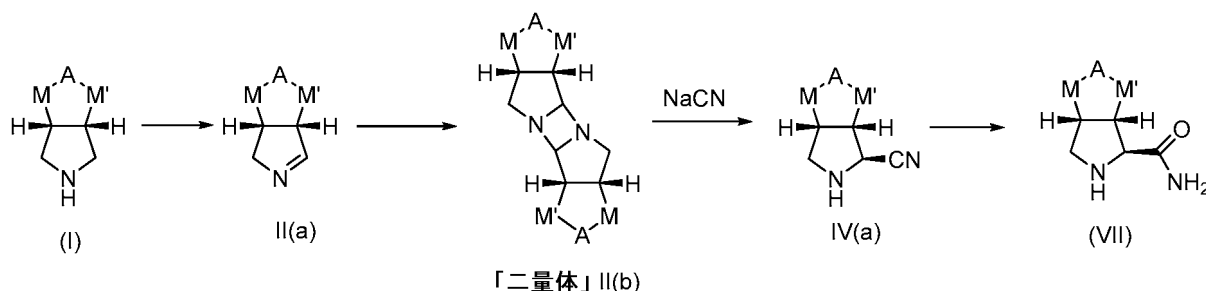
10

スキーム15に、スキーム4の反応を含む構造式Iの第二級アミンからの構造式V I Iによる化合物の調製の全過程を示す。

【0319】

【化 4 7】

スキーム16



20

【0320】

スキーム16に、スキーム6の反応を含む、構造式Iの第二級アミンからの構造式V I Iによる化合物の調製の全過程を示す。

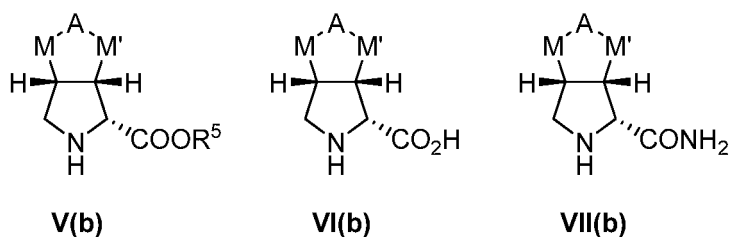
【0321】

30

他の実施形態において、式IV(a)のトランスアミノニトリル化合物を含むスキーム7-16の過程のいずれかは、式IV(b)のシスアミノニトリル化合物を用いて実施することができる。スキーム7-16に対応する反応を式IV(b)のシスアミノニトリル化合物を用いて行う場合、構造式V(b)、VI(b)およびVII(b)の結果として生じるシスアミノ酸およびアミドが生成する。

【0322】

【化 4 8】



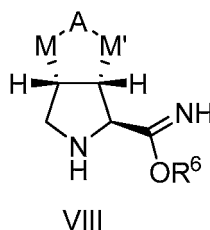
40

【0323】

メカニズムに拘束されるものではないが、スキーム8、9、10、11、12、13、14、15および16の構造式V、VI、VIIの化合物を生成する反応中にイミダート中間体が生成することが認識される。したがって、他の実施形態において、本開示は、 R^6 がHまたはアルキル基である、構造式VII Iのイミダート化合物を提供する。

【0324】

【化 4 9】



【0325】

したがって、上の方法のいくつかの実施形態において、構造式VIIのイミダート化合物は、構造式V、VI、VIIの化合物の調製に用いることができる。

10

【0326】

5. 5 モノアミノキシダーゼ酵素

本開示は、基質である構造式Iの化合物を構造式IIの化合物に立体選択的に酸化または変換することができる操作改変モノアミノキシダーゼ酵素を提供する。特定の実施形態において、本開示は、基質である化合物(1)を化合物(2)に立体選択的に酸化または変換することができる操作改変モノアミノキシダーゼ酵素を提供する。他の実施形態において、本開示は、基質である化合物(3)を化合物(4)に立体選択的に酸化または変換することができる操作改変モノアミノキシダーゼ酵素を提供する。両方の例において、本開示のモノアミノキシダーゼは、アスペルギルス・ニガー(配列番号2)もしくはアスペルギルス・オリザ(配列番号32)もしくはそのハイブリッド(配列番号6)の天然に存在する野生型モノアミノキシダーゼと比較したとき、または他の操作改変モノアミノキシダーゼ酵素(例えば、配列番号8の酵素)と比較したとき、改善された特性も示す。改善が望ましい酵素特性は、酵素活性、熱安定性、pH活性プロファイル、補因子の必要、阻害物質(例えば、生成物阻害)に対する無反応性、立体特異性、立体選択性、溶媒安定性、溶解度ならびに宿主細胞中の安定性および発現レベルを含むが、これらに限定されない。改善は、酵素活性などの単一酵素特性または酵素活性および立体選択性などの各種酵素特性の組合せに関するものであり得る。

20

【0327】

アスペルギルス・ニガーおよびアスペルギルス・オリザの天然に存在するモノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチド配列ならびにしたがって対応するアミノ酸配列は、アスペルギルス・ニガーについてはGenbankアクセッション番号L38858、アスペルギルス・オリザについてはGenbankアクセッション番号XM_001822832から入手可能である。

30

【0328】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示するモノアミノキシダーゼは、モノアミノキシダーゼの特性の改善をもたらす参照配列(例えば、天然に存在するポリペプチドまたは操作改変ポリペプチド)に対する多くの修飾を有し得る。そのような実施形態において、アミノ酸配列の修飾の数は、1つ以上のアミノ酸、2つ以上のアミノ酸、3つ以上のアミノ酸、4つ以上のアミノ酸、5つ以上のアミノ酸、6つ以上のアミノ酸、8つ以上のアミノ酸、10以上のアミノ酸、15以上のアミノ酸または20以上のアミノ酸、参照酵素配列のアミノ酸の総数の10%まで、アミノ酸の総数の20%までまたはアミノ酸の総数の30%までを含み得る。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの特性の改善をもたらす天然に存在するポリペプチドまたは操作改変ポリペプチドに対する修飾の数は、参照配列に対する約1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25または約1-30の修飾を含んでいてよい。修飾は、挿入、欠失、置換またはそれらの組合せを含み得る。

40

【0329】

いくつかの実施形態において、修飾は、参照配列に対するアミノ酸置換を含む。モノア

50

ミノキシダーゼの特性の改善をもたらし得る置換は、1つ以上のアミノ酸、2つ以上のアミノ酸、3つ以上のアミノ酸、4つ以上のアミノ酸、5つ以上のアミノ酸、6つ以上のアミノ酸、8つ以上のアミノ酸、10以上のアミノ酸または20以上のアミノ酸、参照酵素配列のアミノ酸の総数の10%まで、アミノ酸の総数の20%までまたはアミノ酸の総数の30%までであってよい。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの特性の改善をもたらす天然に存在するポリペプチドまたは操作改変ポリペプチドに対する置換の数は、参照配列の約1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25または約1-30のアミノ酸置換を含み得る。

【0330】

いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの野生型または他の操作改変ポリペプチドと比較して改善された特性は、その立体選択性の増大、すなわち、本明細書において、構造式Iの化合物の構造式IIの化合物への酸化、または特定の実施形態において化合物(1)の化合物(2)への酸化もしくは変換、または化合物(3)の化合物(4)への酸化の生成物の立体異性体過剰率の増加に関してである。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの改善された特性は、より大きい割合の基質を生成物に変換または還元するその能力の増大に関してである。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの改善された特性は、基質の生成物への変換のその速度の増加に関してである。酵素活性のこの改善は、同じ量の生成物を酸化または変換するために野生型または他の参照配列と比較して少ない量の改善されたモノアミノキシダーゼを使用する能力によって明らかにすることができる。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼの改善された特性は、その安定性または熱安定性に関してである。いくつかの実施形態において、モノアミノキシダーゼは、複数の改善された特性を有する。

【0331】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノキシダーゼは、少なくとも約95%の立体異性体過剰率および配列番号2、配列番号32または配列番号6のアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと比べて改善されている速度で、基質(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン(化合物(1))を(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン(化合物(2))に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号4、8および10に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0332】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノキシダーゼは、少なくとも約95%のジアステレオマー過剰率および配列番号2、配列番号32または配列番号6のアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと比べて改善されている速度で、基質(3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール(化合物(3))を(3aS, 6aR)-1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロール(化合物(4))に変換することができる。そのような特性を有する具体例としてのポリペプチドは、配列番号10、14、16、18、20および36に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

【0333】

下の表2および3に本明細書で開示した配列番号と関連活性の一覧を示す。下の配列は、特に指定のない限り、野性型アスペルギルス・ニガーモノアミノキシダーゼ配列(配列番号1および2)に基づいている。下の表2および3において、各行に2つの配列番号を示し、奇数は、偶数によって示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を表す。変異(すなわち、残基の変化)の数を示す欄は、配列番号1および2の野性型アスペルギルス・ニガーモノアミノキシダーゼ配列と比較したアミノ酸置換の数を意味する。各表に各状況における記号「+」「++」「+++」および「++++」の意味を示す説明文が続く。

10

20

30

40

50

【0334】

【表2】

表2：配列および化合物（1）の化合物（2）への変換に関する対応する活性の改善の一覧：

配列番号	A. ニガー (配列番号2)と 比較した変化の数	活性 ^a	% ee ^b
3/4	2	+	+++
7/8	3	+++	+++
9/10	64	++++	+++
11/12	65	++++++	+++
^a 活性：化合物（1）の化合物（2）への変換に関する A. ニガーの操作改変モノアミノキシダーゼ（配列番号2）の活性の+= 0-100%；++=100-300%；+++ =300-500%；++++=500-1000%；+++++=1000-1500%；+++++=1500-2000% ^b エナンチオ選択性：+++ =99-100%鏡像異性体過剰率			

10

20

【0335】

【表3】

表3：配列および化合物（3）の化合物（4）への変換に関する対応する活性の改善の一覧：

配列番号	A. ニガー (配列番号2)と 比較した変化の数	活性 ^a	% ee ^b
9/10	64	+	+++
13/14	65	++	+++
15/16	66	+++	+++
17/18	67	++++	+++
19/20	68	++++	+++
35/36	67	++	+++
^a 活性：化合物（3）の化合物（4）への変換に関する A. ニガーの操作改変モノアミノキシダーゼ（配列番号8）の活性の+= 0-100%；++=100-300%；+++ =300-500%；++++=500-1000%。野生型A. ニガーモノアミノキシダーゼは、 基質である化合物（3）に対する検出可能なレベルの活性を有さなかった。 ^b エナンチオ選択性：+++ =99-100%鏡像異性体過剰率			

30

40

【0336】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノキシダーゼは、配列番号2の配列を含む参照配列と比較して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、但し、このポリペプチドは、残基位置289に対応するアミノ酸残基がバリンであり、残基位置348に対応するアミノ酸残基がグルタミンであり

50

、残基位置 382 に対応するアミノ酸残基がロイシンであり、残基 465 に対応するアミノ酸残基がグリシンであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、配列番号 12 のアミノ酸配列の 1 つ以上の修飾を有し得る。修飾は、置換、欠失および挿入を含み得る。置換は、非保存的置換、保存的置換または非保存的置換と保存的置換の組合せであり得る。

【0337】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2 の配列を含む参照配列と比較して少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、但し、このポリペプチドは、残基位置 289 に対応するアミノ酸残基がバリンであり、残基位置 348 に対応するアミノ酸残基がグルタミンであり、残基位置 365 に対応するアミノ酸残基がトリプトファンであり、残基 465 に対応するアミノ酸残基がグリシンであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、配列番号 14 のアミノ酸配列の 1 つ以上の修飾を有し得る。修飾は、置換、欠失および挿入を含み得る。置換は、非保存的置換、保存的置換または非保存的置換と保存的置換の組合せであり得る。

10

【0338】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2 の配列を含む参照配列と比較して少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、但し、該ポリペプチドは、位置 99 の残基に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸であり、残基 289 に対応する残基がバリンであり、残基位置 348 に対応するアミノ酸残基がグルタミンであり、残基位置 365 に対応するアミノ酸残基がトリプトファンであり、残基 465 に対応するアミノ酸残基がグリシンであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、配列番号 16 のアミノ酸配列の 1 つ以上の修飾を有し得る。修飾は、置換、欠失および挿入を含み得る。置換は、非保存的置換、保存的置換または非保存的置換と保存的置換の組合せであり得る。

20

【0339】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2 の配列を含む参照配列と比較して少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、但し、該ポリペプチドは、残基位置 99 に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸であり、位置 135 に対応する残基がグルタミンであり、残基 289 に対応する残基がバリンであり、残基位置 348 に対応するアミノ酸残基がグルタミンであり、残基位置 365 に対応するアミノ酸残基がトリプトファンであり、残基 465 に対応するアミノ酸残基がグリシンであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、配列番号 18 のアミノ酸配列の 1 つ以上の修飾を有し得る。修飾は、置換、欠失および挿入を含み得る。置換は、非保存的置換、保存的置換または非保存的置換と保存的置換の組合せであり得る。

30

40

【0340】

いくつかの実施形態において、本開示のモノアミノオキシダーゼは、配列番号 2 の配列を含む参照配列と比較して少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、但し、該ポリペプチドは、残基位置 99 に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸であり、位置 135 に対応する残基がグルタミンであり、位置 284 に対応する残基がアスパラギン酸であり、残基 289 に対応する残基がバリンであり、残基位置 348 に対応するアミノ酸残基がグルタミンであり、位置 356 に対応するアミノ酸残基がバリンであり、残基位置 365 に対応するアミノ酸残基がトリプトファンであり、残基位置 465 に対応するアミノ酸残基がグリシンであるアミノ酸配列を含む。いく

50

つかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、配列番号 20 のアミノ酸配列の 1 つ以上の修飾を有し得る。修飾は、置換、欠失および挿入を含み得る。置換は、非保存的置換、保存的置換または非保存的置換と保存的置換の組合せであり得る。

【0341】

いくつかの実施形態において、改善されたモノアミノオキシダーゼは、表 2 および 3 に示すような配列番号 4、8、10、12、14、16、18、20 または 36 に対応するアミノ酸と少なくとも約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含み、この改善されたモノアミノオキシダーゼは、表 2 および 3 のアミノ酸配列において示した指定されたアミノ酸置換の組合せのいずれか一組を含む。いくつかの実施形態において、これらのモノアミノオキシダーゼは、他のアミノ酸残基における約 1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10 または 1-20 変異をさらに有し得る。変異は、挿入、欠失または置換またはそれらの組合せを含み得る。いくつかの実施形態において、さらなる変異は、保存的置換を含む。

【0342】

当業者により十分に理解されるように、本明細書で開示したポリペプチドは、遺伝的にコードされるアミノ酸に制限されない。遺伝的にコードされるアミノ酸に加えて、本明細書で開示したポリペプチドは、全体または一部分において天然に存在するおよび／または合成非コード化アミノ酸を含んでよい。本明細書で開示したモノアミノオキシダーゼが含んでよい特定の一般的に遭遇する非コード化アミノ酸は、遺伝的にコードされるアミノ酸の D-立体異性体；2, 3-ジアミノプロピオン酸 (Dpr)； α -アミノイソ酪酸 (Aib)； ϵ -アミノヘキサ酸 (Aha)； δ -アミノ吉草酸 (Ava)；N-メチルグリシンまたはサルコシン (MeGly または Sar)；オルニチン (Orn)；シトルリン (Cit)；t-ブチルアラニン (Bua)；t-ブチルグリシン (Bug)；N-メチルイソロイシン (MeIle)；フェニルグリシン (Phg)；シクロヘキシルアラニン (Cha)；ノルロイシン (Nle)；ナフチルアラニン (Nal)；2-クロロフェニルアラニン (Ocf)；3-クロロフェニルアラニン (Mcf)；4-クロロフェニルアラニン (Pcf)；2-フルオロフェニルアラニン (Off)；3-フルオロフェニルアラニン (Mff)；4-フルオロフェニルアラニン (Pff)；2-ブロモフェニルアラニン (Obf)；3-ブロモフェニルアラニン (Mbf)；4-ブロモフェニルアラニン (Pbf)；2-メチルフェニルアラニン (Omf)；3-メチルフェニルアラニン (Mmf)；4-メチルフェニルアラニン (Pmf)；2-ニトロフェニルアラニン (Onf)；3-ニトロフェニルアラニン (Mnf)；4-ニトロフェニルアラニン (Pnf)；2-シアノフェニルアラニン (Ocf)；3-シアノフェニルアラニン (Mcf)；4-シアノフェニルアラニン (Pcf)；2-トリフルオロメチルフェニルアラニン (Otf)；3-トリフルオロメチルフェニルアラニン (Mtf)；4-トリフルオロメチルフェニルアラニン (Ptf)；4-アミノフェニルアラニン (Paf)；4-ヨードフェニルアラニン (Pif)；4-アミノメチルフェニルアラニン (Pamf)；2, 4-ジクロロフェニルアラニン (Opef)；3, 4-ジクロロフェニルアラニン (Mpcf)；2, 4-ジフルオロフェニルアラニン (Opff)；3, 4-ジフルオロフェニルアラニン (Mpff)；ピリド-2-イルアラニン (2pAla)；ピリド-3-イルアラニン (3pAla)；ピリド-4-イルアラニン (4pAla)；ナフト-1-イルアラニン (1nAla)；ナフト-2-イルアラニン (2nAla)；チアゾリルアラニン (taAla)；ベンゾチエニルアラニン (bAla)；チエニルアラニン (tAla)；フリルアラニン (fAla)；ホモフェニルアラニン (hPhe)；ホモチロシン (hTyr)；ホモトリプトファン (hTrp)；ペンタフルオロフェニルアラニン (5fff)；スチリルカラニン (sAla)；オートリルアラニン (aAla)；3, 3-ジフェニルアラニン (Dfa)；3-アミノ-5-フェニルペンタン酸 (Afp)；ペニシラミン (Pen)；1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸 (Tic)； β -2-チエニルアラニン (Thi)；メチオニンスルホキシド (Mso)；N (

w) ニトロアルギニン (nArg) ; ホモリシン (hLys) ; ホスホノメチルフェニルアラニン (pmPhe) ; ホスホセリン (pSer) ; ホスホトレオニン (pThr) ; ホモアスパラギン酸 (hAsp) ; ホモグルタミン酸 (hGlu) ; 1-アミノシクロペンター (2 または 3) -エン-4 カルボン酸 ; ピペコリン酸 (PA) ; アゼチジン-3-カルボン酸 (ACA) ; 1-アミノシクロペンタン-3-カルボン酸 ; アリルグリシン (aOly) ; プロパギルグリシン (pgGly) ; ホモアラニン (hAla) ; ノルバリン (nVal) ; ホモロイシン (hLeu) ; ホモバリン (hVal) ; ホモイソロイシン (hIle) ; ホモアルギニン (hArg) ; N-アセチルリシン (AcLys) ; 2, 4-ジアミノ酪酸 (Dbu) ; 2, 3-ジアミノ酪酸 (Dab) ; N-メチルバリン (MeVal) ; ホモシステイン (hCys) ; ホモセリン (hSer) ; ヒドロキシプロリン (Hyp) および ホモプロリン (hPro) を含み得るが、これらに限定されない。本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼが含んでいてよいさらなる非コード化アミノ酸は、当業者に明らかである (例えば、Fasman、1989、CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology、CRC Press、Boca Raton、FL、3-70 頁 およびすべてが参照により本明細書に組み込む当文献中で引用された参考文献に記載された様々なアミノ酸を参照)。これらのアミノ酸は、L または D 立体配置であってよい。

【0343】

当業者は、本明細書で開示したモノアミノオキシダーゼは、側鎖保護基を有するアミノ酸または残基も含み得ることを認識する。この場合には芳香族カテゴリーに属するそのような保護アミノ酸の非限定的な例は、Arg (tos)、Cys (メチルベンジル)、Cys (ニトロピリジンスルフェニル)、Glu (δ -ベンジルエステル)、Gln (キサンチル)、Asn (N- δ -キサンチル)、His (bom)、His (ベンジル)、His (tos)、Lys (fmoc)、Lys (tos)、Ser (O-ベンジル)、Thr (O-ベンジル) および Tyr (O-ベンジル) を含む (保護基をカッコ内に示す) が、これらに限定されない。

【0344】

本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼが含んでいてよい立体配座上束縛されている非コード化アミノ酸は、N-メチルアミノ酸 (L 立体配置) ; 1-アミノシクロペンター (2 または 3) -エン-4-カルボン酸 ; ピペコリン酸 ; アゼチジン-3-カルボン酸 ; ホモプロリン (hPro) および 1-アミノシクロペンタン-3-カルボン酸を含み得るが、これらに限定されない。

【0345】

上述のように、操作改変モノアミノオキシダーゼを創出するために天然に存在するポリペプチドに導入される様々な修飾は、この酵素の特異的特性を標的とすることができる。

【0346】

5. 6 操作改変モノアミノオキシダーゼをコードするポリヌクレオチド

他の態様において、本開示は、本明細書で開示した操作改変モノアミノオキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを提供する。該ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドを創出するために遺伝子発現を制御する1つ以上の異種調節配列に作動可能に連結することができる。操作改変モノアミノオキシダーゼをコードする異種ポリヌクレオチドを含む発現構築体を適切な宿主細胞に導入して、対応するモノアミノオキシダーゼポリペプチドを発現させることができる。

【0347】

様々なアミノ酸に対応するコドンの知識により、タンパク質配列を利用できることが対象をコードすることができるすべてのポリヌクレオチドの記述を可能にするものである。同じアミノ酸が代替または同義コドンによりコードされる遺伝コードの縮重は、そのすべてが本明細書で開示した改善されたモノアミノオキシダーゼをコードする、極めて多数の核酸が作られることを可能にする。したがって、特定のアミノ酸配列を同定することにより、当業者は、タンパク質のアミノ酸配列を変化させない方法で1つ以上のコドンの配列

を単に修飾することによってあらゆる数の異なる核酸を作ることができよう。この点について、本開示は、可能なコドン選択に基づく組合せを選択することによって作ることができるポリヌクレオチドのそれぞれおよびすべての可能な変形形態を具体的に企図するものであり、そのようなすべての変形形態は、表 2 および 3 に示すアミノ酸配列を含む本明細書で開示したポリペプチドについて具体的に開示することを考慮すべきである。

【0348】

いくつかの実施形態において、該ポリヌクレオチドは、本明細書で述べた参照操作改変モノアミノキシダーゼのいずれかとの少なくとも約 80 % 以上の配列同一性、約 85 % 以上の配列同一性、約 90 % 以上の配列同一性、約 95 % 以上の配列同一性、約 96 % 以上の配列同一性、約 97 % 以上の配列同一性、約 98 % 以上の配列同一性または 99 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するモノアミノキシダーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、該ポリヌクレオチドは、配列番号 4、8、10、12、14、16、18、20 または 36 から選択されるアミノ酸配列を含む操作改変モノアミノキシダーゼをコードする。

10

【0349】

様々な実施形態において、コドンは、好ましくはタンパク質が産生されている宿主細胞に適合するように選択される。例えば、細菌において用いられる好ましいコドンは、細菌における遺伝子を発現させるために用いられ、酵母において用いられる好ましいコドンは、酵母における発現のために用いられ、哺乳動物において用いられる好ましいコドンは、哺乳類細胞における発現のために用いられる。例として、配列番号 1 のポリヌクレオチドは、E. コリにおける発現のためにコドン最適化されたが、アスペルギルス・ニガーの天然に存在するモノアミノキシダーゼを別にコードする。

20

【0350】

特定の実施形態において、天然配列は好ましいコドンを含み、好ましいコドンの使用がすべてのアミノ酸残基について必要であるとは限らないので、モノアミノキシダーゼのコドンの使用を最適化するためにすべてのコドンを置換する必要があるわけではない。したがって、モノアミノキシダーゼをコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、全長コード領域のコドン位置の約 40 %、50 %、60 %、70 %、80 % または 90 % 以上における好ましいコドンを含み得る。

【0351】

いくつかの実施形態において、操作改変モノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 3、7、9、11、13、15、17、19 または 35 から選択される。いくつかの実施形態において、該ポリヌクレオチドは、配列番号 5 または 31 を含むポリヌクレオチドと高度緊縮条件下でハイブリッド形成することができ、高度緊縮条件下でハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドは、機能的モノアミノキシダーゼをコードする。

30

【0352】

他の実施形態において、該ポリヌクレオチドは、本明細書で述べたモノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含むが、操作改変モノアミノキシダーゼをコードする参照ポリヌクレオチドとヌクレオチドレベルで約 80 % 以上の配列同一性、約 85 % 以上の配列同一性、約 90 % 以上の配列同一性、約 95 % 以上の配列同一性、約 98 % 以上の配列同一性または 99 % 以上の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、参照ポリヌクレオチドは、配列番号 3、7、9、11、13、15、17、19 または 35 によって示されるポリヌクレオチド配列から選択される。

40

【0353】

改善されたモノアミノキシダーゼをコードする分離ポリヌクレオチドは、ポリペプチドの発現を可能にするための様々な方法で操作することができる。ベクターへのその挿入の前の分離ポリヌクレオチドの操作は、発現ベクターによって望ましいまたは必要であり得る。組換え DNA 法を用いるポリヌクレオチドおよび核酸配列を修飾する技術は、当技術分野で周知である。指針は、Sambrookら、2001、Molecular C

50

loning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory PressおよびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. ed., Greene Pub. Associates, 1998, updates to 2006に記載されている。

【0354】

細菌宿主細胞については、本開示の核酸構築体の転写を誘導する適切なプロモーターとしては、*E. coli* lacオペロン、ストレプトミセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ遺伝子 (*dagA*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) レバンスクラゼ遺伝子 (*sacB*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) アルファーアミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) マルトジェニックアミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) アルファーアミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、バチルス・リケニフォルミス ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、バチルス・サブチリス *xyIA* および *xyIB* 遺伝子ならびに原核ベータラクタマーゼ遺伝子 (Villa-Kamaroffら、1978、Proc. Natl Acad. Sci. USA、75:3727-3731頁) から得られるプロモーターならびに *tac* プロモーター (DeBoerら、1983、Proc. Natl Acad. Sci. USA、80:21-25頁) などがある。さらなるプロモーターは、「Useful proteins from recombinant bacteria」 in Scientific American、1980、242:74-94頁および Sambrookら、前出に記載されている。

【0355】

糸状菌宿主細胞については、本開示の核酸構築体の転写を誘導する適切なプロモーターとしては、アスペルギルス・オリザ TAKA アミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー中性アルファーアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー酸安定性アルファーアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) グルコアミラーゼ (*glA*)、リゾムコール・ミエヘイリパーゼ、アスペルギルス・オリザアルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリザトリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスアセトアミダーゼおよびフサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) トリブシン様プロテアーゼ (WO 96/00787) の遺伝子から得られるプロモーターならびに NA2-tpi プロモーター (アスペルギルス・ニガー中性アルファーアミラーゼおよびアスペルギルス・オリザトリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子からのプロモーターのハイブリッド) ならびにそれらの変異型、切断型およびハイブリッドプロモーターなどがある。

【0356】

酵母宿主において、有用なプロモーターは、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) エノラーゼ (ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエガラクトキナーゼ (GAL1)、サッカロミセス・セレビシエアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP) およびサッカロミセス・セレビシエ3-ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子からのものであり得る。酵母宿主細胞の他の有用なプロモーターは、Romanosら、1992、Yeast、8:423-488頁により記載されている。

【0357】

制御配列はまた、転写を終結するために宿主細胞によって認識される配列である、適切な転写終結区配列であってよい。該終結区配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作動可能に連結されている。最適な宿主細胞において機能的であるあらゆる終結区を本明細書で開示した方法に用いることができる。

【0358】

例えば、糸状菌宿主細胞の具体例としての転写終結区は、アスペルギルス・オリザ T A K A アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスアントラニル酸シンターゼ、アスペルギルス・ニガーアルファグルコシダーゼおよびフサリウム・オキシスポルムトリブシン様プロテアーゼの遺伝子から得ることができる。

【0359】

酵母宿主細胞の具体例としての終結区は、サッカロミセス・セレビシエエノラーゼ、サッカロミセス・セレビシエシトクロム C (C Y C 1) およびサッカロミセス・セレビシエグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞の他の有用な終結区は、R o m a n o s ら、1992、前出による記載されている。

【0360】

制御配列はまた、宿主細胞による翻訳に重要である m R N A の非翻訳領域である、適切なリーダー配列であってよい。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の 5' 末端に作動可能に連結されている。最適な宿主細胞において機能的であるあらゆるリーダー配列を用いることができる。糸状菌宿主細胞の具体例としてのリーダーは、アスペルギルス・オリザ T A K A アミラーゼおよびアスペルギルス・ニデュランストリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞の適切なリーダーは、サッカロミセス・セレビシエエノラーゼ (E N O - 1)、サッカロミセス・セレビシエ 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、サッカロミセス・セレビシエアルファ因子およびサッカロミセス・セレビシエアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (A D H 2 / G A P) の遺伝子から得られる。

【0361】

制御配列はまた、核酸配列の 3' 末端に作動可能に連結され、転写されるとき、転写済み m R N A にポリアデノシン残基を付加するシグナルとして宿主細胞によって認識される配列である、ポリアデニル化配列であってよい。最適な宿主細胞において機能的であるあらゆるポリアデニル化配列を本明細書で開示した方法に用いることができる。糸状菌宿主細胞の具体例としてのポリアデニル化配列は、アスペルギルス・オリザ T A K A アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスアントラニル酸シンターゼ、フサリウム・オキシスポルムトリブシン様プロテアーゼおよびアスペルギルス・ニガーアルファグルコシダーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞の有用なポリアデニル化配列は、G u o および S h e r m a n、1995、M o l C e l l B i o、15:5983-5990 頁により記載されている。

【0362】

制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端に連結されるアミノ酸配列をコードし、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路内に誘導する、シグナルペプチドコード領域であってよい。核酸配列のコード配列の 5' 末端は、分泌されるポリペプチドをコードするコード領域のセグメントに翻訳読み枠内で自然に連結されているシグナルペプチドコード領域を本質的に含んでいてよい。あるいは、コード配列の 5' 末端は、コード配列と異質であるシグナルペプチドコード領域を含んでいてよい。異質なシグナルペプチドコード領域は、コード配列がシグナルペプチドコード領域を自然に含んでいない場合に必要であり得る。

【0363】

あるいは、異質なシグナルペプチドコード領域は、ポリペプチドの分泌を促進するために、天然シグナルペプチドコード領域を単に置換していてよい。しかし、最適な宿主細胞の分泌経路内に発現ポリペプチドを誘導するあらゆるシグナルペプチドコード領域を本明細書で開示した方法に用いることができる。

【0364】

細菌宿主細胞の有効なシグナルペプチドコード領域は、バチルス N C 1 B 1 1 8 3 7 マ

ルトジェニックアミラーゼ、バチルス・ステアロサーモフィルスアルファアミラーゼ、バチルス・リケニフォルミスサブチリシン、バチルス・リケニフォルミスベーターラクタマーゼ、バチルス・ステアロサーモフィルス中性プロテアーゼ (nprT、nprS、nprM) およびバチルス・サブチリスprSAの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、SimonenおよびPalva、1993、Microbiol Rev、57:109-137頁により記載されている。

【0365】

糸状菌宿主細胞の有効なシグナルペプチドコード領域は、アスペルギルス・オリザTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ、リゾムコール・ミエハイアスバラギン酸プロテイナーゼ、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) セルラーゼおよびフミコーラ・ラヌギノーサ (Humicola lanuginosa) リパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域であり得る。

【0366】

酵母宿主細胞の有用なシグナルペプチドは、サッカロミセス・セレビスエアルファ因子およびサッカロミセス・セレビスエインベルターゼの遺伝子から得ることができる。他の有効なシグナルペプチドコード領域は、Romanosら、1992、前出により記載されている。

【0367】

制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域であってよい。結果として得られるポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド (または場合によってチモーゲン) として公知である。プロポリペプチドは、一般的に不活性であり、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒または自己触媒開裂によって成熟活性ポリペプチドに変換させることができる。プロペプチドコード領域は、バチルス・サブチリスアルカリプロテアーゼ (aprE)、バチルス・サブチリス中性プロテアーゼ (nprT)、サッカロミセス・セレビスエアルファ因子、リゾムコール・ミエハイアスバラギン酸プロテイナーゼおよびミセリオフトラ・サーモフィラ (Myceliophthora thermophila) ラクターゼ (WO95/33836) の遺伝子から得ることができる。

【0368】

シグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端に隣接して位置し、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端に隣接して位置する。

【0369】

宿主細胞の成長に関連するポリペプチドの発現の調節を可能にする、調節配列を付加することも望ましい可能性がある。調節系の例は、調節化合物の存在を含む化学的または物理的刺激に応答して遺伝子の発現を開始または停止させるものである。原核宿主細胞において、適切な調節配列は、lac、tacおよびtrpオペレーター系などである。酵母宿主細胞において、適切な調節系は、例として、ADH2系またはGAL1系などである。糸状菌において、適切な調節配列は、TAKAアルファアミラーゼプロモーター、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼプロモーターおよびアスペルギルス・オリザグルコアミラーゼプロモーターなどである。

【0370】

調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にするものである。真核系において、これらは、メトトレキサートの存在下で増幅される、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子および重金属により増幅される、メタロチオネイン遺伝子などである。これらの場合において、本開示のモノアミンオキシダーゼをコードする核酸配列は、調節配列と作動可能に連結されることになる。

【0371】

したがって、他の実施形態において、本開示は、操作改変モノアミンオキシダーゼまた

10

20

30

40

50

はこの変異体をコードするポリヌクレオチドならびにそれらが導入される宿主の種類によってプロモーターおよび転写終結区、複製起点等などの1つ以上の発現調節領域を含む組換え発現ベクターも対象とする。上述の様々な核酸および制御配列は、制限部位におけるポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にする1つ以上の都合のよい制限部位を含み得る組換え発現ベクターを形成するために一緒に結合させることができる。あるいは、本開示の核酸配列は、核酸配列または該配列を含む核酸構築体を発現のための適切なベクターに挿入することによって発現させることができる。発現ベクターを作製するに際して、コード配列が発現のための適切な制御配列と作動可能に連結されるように、コード配列をベクターに配置する。

【0372】

10

組換え発現ベクターは、組換えDNA処置に都合よくかけることができ、ポリヌクレオチド配列の発現をもたらすことができるあらゆるベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であってよい。ベクターの選択は、一般的に、ベクターとベクターが導入される宿主細胞との適合性に依存する。ベクターは、線状または閉鎖環状プラスミドであってよい。

【0373】

発現ベクターは、自律的複製ベクター、すなわち、複製が染色体複製と無関係である、染色体外存在物として存在するベクター、例えば、プラスミド、染色体外要素、ミニ染色体または人工染色体であってよい。ベクターは、自己複製を保証するための何らかの手段を含んでいてよい。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入されるとき、ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体（単数以上）と一緒に複製されるものであってよい。さらに、宿主細胞のゲノムに導入される全DNAと一緒に含む単一ベクターもしくはプラスミドまたは2つ以上のベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンを用いることができる。

20

【0374】

本開示の発現ベクターは、好ましくは、形質転換細胞の容易な選択を可能にする、1つ以上の選択可能マーカーを含む。選択可能なマーカーは、その産物が生物致死剤またはウイルス耐性、重金属、栄養体から栄養要求性突然変異体への耐性などを与える遺伝子である。細菌の選択可能マーカーの例は、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール（実施例1）もしくはテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を与える、バチルス・サブチリスもしくはバチルス・リケニフォルミスのd a l 遺伝子またはマーカーである。酵母宿主細胞の適切なマーカーは、A D E 2、H I S 3、L E U 2、L Y S 2、M E T 3、T R P 1 および U R A 3 である。

30

【0375】

糸状菌宿主細胞において用いられる選択可能マーカーは、a m d S（アセトアミダーゼ）、a r g B（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、b a r（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、h p h（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、n i a D（硝酸レダクターゼ）、p y r G（オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、s C（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）およびt r p C（アントラニル酸シンターゼ）ならびにそれらの同等物を含むが、これらに限定されない。アスペルギルス属細胞において用いられる実施形態は、アスペルギルス・ニデュランスまたはアスペルギルス・オリザのa m d Sおよびp y r G遺伝子ならびにストレプトミセス・ハイグロスコピクス（*Streptomyces hygroscopicus*）のb a r 遺伝子を含む。

40

【0376】

本開示の発現ベクターは、好ましくは、宿主細胞のゲノムへのベクターの組込みまたはゲノムと独立に細胞中のベクターの自律性複製を可能にする要素（単数以上）を含む。宿主細胞ゲノムへの組込みのために、ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸配列または相同的もしくは非相同的組換えによるゲノムへのベクターの組込みのためのベクターの他の任意の要素に依拠することができる。

50

【0377】

あるいは、発現ベクターは、宿主細胞のゲノムへの相同的組換えによる組込みを誘導するための追加の核酸配列を含んでいてよい。追加の核酸配列は、ベクターが染色体（単数以上）における正確な位置（単数以上）において宿主細胞ゲノムに組み込まれることを可能にする。正確な位置における組込みの可能性を増大させるために、組込み要素は、相同的組換えの確率を増大させるために対応する標的配列と高度に相同的である、100から10000塩基対、好ましくは400から10000塩基対、最も好ましくは800から10000塩基対などの十分な数の核酸を好ましくは含むべきである。組込み要素は、宿主細胞のゲノムにおける標的配列と相同的である配列であってよい。さらに、組込み要素は、非コードまたはコード核酸配列であってよい。一方で、ベクターは、非相同的組換えにより宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。

10

【0378】

自律性複製のために、ベクターは、ベクターが問題の宿主細胞において自律的に複製することを可能にする複製の起点をさらに含んでいてよい。細菌の複製の起点の例は、P15Aori（図5のプラスミドに示す）またはプラスミドpBR322、pUC19、pACYC177（プラスミドがP15Aoriを有する）またはE. コリにおける複製を可能にするpACYC184およびバチルス属における複製を可能にするpUB110、pE194、pTA1060またはpAM. beta. 1の複製の起点である。酵母宿主細胞において用いられる複製の起点の例は、複製の2ミクロン起点、ARS1、ARS4、ARS1とCEN3の組合せおよびARS4とCEN6の組合せである。複製の起点は、宿主細胞において機能温度感受性にする突然変異を有するものであってよい（例えば、Ehrlich、1978、Proc Natl Acad Sci. USA、75:1433頁を参照されたい）。

20

【0379】

本開示の核酸配列の複数のコピーは、遺伝子産物の生産を増加させるために宿主細胞に挿入することができる。核酸配列のコピー数の増加は、配列の少なくとも1つの追加コピーを宿主細胞ゲノムに組み込むことにより、または適切な選択可能物質の存在下で細胞を培養することによって選択可能マーカ―遺伝子の増幅コピーを含む細胞およびしたがって核酸配列の追加コピーを選択することができる場合には、核酸配列を有する増幅性の選択可能マーカ―遺伝子を含めることにより、得ることができる。

30

【0380】

本明細書で開示した方法において用いられる発現ベクターの多くは、市販されている。適切な市販の発現ベクターは、哺乳類宿主細胞における発現のためのCMVプロモーターおよびhGHポリアデニル化部位ならびにE. コリにおける増幅のための複製のpBR322起点およびアンピシリン耐性マーカ―を含むSigma-Aldrich Chemicals（St. Louis MO）製のp3xFLAGTM（商標）発現ベクターなどである。他の適切な発現ベクターは、Stratagene（LaJolla CA）により市販されているpBluescriptII SK（-）およびpBK-CMVならびにpBR322（Gibco BRL）、pUC（Gibco BRL）、pREP4、pCEP4（Invitrogen）またはpPoly（Lathera、1987、Gene、57:193-201頁）に由来するプラスミドである。

40

【0381】

5. 7 モノアミノオキシダーゼの発現のための宿主細胞

他の態様において、本開示は、本開示の改善されたモノアミノオキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供し、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞における該モノアミノオキシダーゼの発現のために1つ以上の制御配列に作動可能に連結されている。本開示の発現ベクターによりコードされるモノアミノオキシダーゼポリペプチドを発現するのに用いられる宿主細胞は、当技術分野で周知であり、E. コリ、ラクトバシルス・ケフィル（Lactobacillus kefir）、ラクトバシルス・ブレビス（Lactobacillus brevis）、ラクトバシルス・マイノル（Lacto

50

bacillus minor)、ストレプトミセス属およびサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 細胞などの細菌細胞; 酵母細胞 (例えば、サッカロミセス・セレビシエまたはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (ATCCアクセッション番号201178)) などの真菌細胞; ドロソフィラ (*Drosophila*) S2およびスポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9細胞などの昆虫細胞; CHO、COS、BHK、293およびBowes黒色腫細胞などの動物細胞; ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上述の宿主細胞についての適切な培地および増殖条件は、当技術分野で周知である。

【0382】

モノアミノキシダーゼの発現のためのポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の様々な方法により細胞に導入することができる。技術は、とりわけ、エレクトロポレーション、微粒子銃粒子ビオンバードメント、リボソーム媒介トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクションおよびプロトプラスト融合などである。ポリヌクレオチドを細胞に導入する様々な方法は、当業者に明らかである。

【0383】

具体例としての宿主細胞は、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) W3110である。発現ベクターは、lacIリプレッサーの制御下でlacプロモーターに作動可能に連結されたプラスミドpCK110900中に改善されたモノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを作動可能に連結させることによって作製された。該発現ベクターは、複製のP15a起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含んでいた。エシェリキア・コリW3110に対象ポリヌクレオチドを含む細胞は、細胞をクロラムフェニコール選択にかけることによって分離された。

【0384】

5. 8 操作改変モノアミノキシダーゼを生成する方法

いくつかの実施形態において、本開示の改善されたモノアミノキシダーゼポリヌクレオチドおよびポリペプチドを作製するために、酸化反応を触媒する天然に存在するモノアミノキシダーゼをアスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・オリザから得る (または由来である)。いくつかの実施形態において、親ポリヌクレオチド配列は、指定された宿主細胞におけるモノアミノキシダーゼの発現を増大させるためにコドン最適化される。実例として、アスペルギルス・ニガーの野生型モノアミノキシダーゼポリペプチドをコードする親ポリヌクレオチド配列は、Genbankデータベースにおいて利用可能なアスペルギルス・ニガーモノアミノキシダーゼ配列 (Genbankアクセッション番号L38858) の公知のアミノ酸配列に基づいて調製したオリゴヌクレオチドから構築した。配列番号1と呼ぶ親ポリヌクレオチド配列は、E. コリにおける発現のためにコドン最適化し、モノアミノキシダーゼ遺伝子の発現をlacプロモーターおよびlacIリプレッサー遺伝子の制御下において、コドン最適化ポリヌクレオチドを発現ベクター中にクロニングした。E. コリにおける活性モノアミノキシダーゼを発現するクローンを同定し、遺伝子の配列を決定して、それらの同一性を確認した。示された配列 (配列番号2) は、アスペルギルス・ニガーモノアミノキシダーゼから進化させた操作改変モノアミノキシダーゼのほとんどの実験およびライブラリー構築の出発点として用いた親配列であった。

【0385】

5. 8 操作改変モノアミノキシダーゼは、上述のように、天然に存在するモノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを突然変異誘発および/または定向進化法に供することによって得ることができる。具体例としての定向進化法は、Stemmer、1994、Proc Natl Acad Sci USA、91:10747-10751頁; WO95/22625; WO97/0078; WO97/35966; WO98/27230; WO00/42651; WO01/75767および米国特許第6, 537, 746号に記載されたような突然変異誘発および/またはDNAシャフリングである。用いることができる他の定向進化法は、とりわけ、付着伸長法 (StEP)、インビ

トロ組換え (Zhaoら、1998、Nat. Biotechnol.、16:258-261頁)、変異原性PCR (Caldwellら、1994、PCR Methods Appl.、3:S136-S140頁) およびカセット突然変異誘発 (Blackら、1996、Proc Natl Acad Sci USA、93:3525-3529頁) などである。

【0386】

突然変異誘発処理後に得られるクローンを、所望の改善された酵素特性を有する操作改変モノアミンオキシダーゼについてスクリーニングする。発現ライブラリーから酵素活性を測定することは、Zhouら (Zhouら、「A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity」、1997、Anal. Biochem.、253:169-74頁) およびSzutowiczら (Szutowiczら、「Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tissues Using Peroxidase and 2, 2'-Azino (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid as Chromiogen)、1984、Anal. Biochem.、138:86-94頁」) により開示されたものなどであるが、これらに限定されないモノアミンオキシダーゼを測定するための公表された方法またはその変法を用いてモノアミンオキシダーゼ活性を測定することができるような、しかしそれに限定されない標準的な生化学手法を用いて行うことができる。酵素活性の比較は、本明細書においてさらに詳細に述べるように、または例えば、ZhouおよびSzutowiczの方法を用いて、酵素の定義された調製物、設定条件下での定義されたアッセイおよび1つ以上の定義された基質を用いて行う。一般的に、溶解物を比較する場合、アッセイに供する細胞の数およびタンパク質の量ならびに宿主細胞により産生され、溶解物中に存在する酵素の量の変動を最小限にするために同一の発現系および同一の宿主細胞の使用を決定する。所望の改善された酵素特性が熱安定性である場合、酵素活性は、酵素調製物を規定の温度のもとにおいた後、熱処理後に残された酵素活性の量を測定することによって測定することができる。次いで、モノアミンオキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを含むクローンを分離し、配列を決定して、ヌクレオチド配列の変化 (もしあるとすれば) を同定し、宿主細胞中で酵素を発現させるために用いる。

【0387】

操作改変ポリペプチドの配列が公知である場合、酵素をコードするポリヌクレオチドは、公知の合成方法に従って標準的固相法により調製することができる。いくつかの実施形態において、最大約100塩基のフラグメントを個別に合成し、次に結合させて (例えば、酵素もしくは化学的連結反応 (ligation) 法またはポリメラーゼ媒介法により)、所望の連続配列を形成することができる。例えば、本明細書で開示したポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、例えば、Beaucageら、1981、Tet Lett、22:1859-69頁により記載された古典的ホスホルアミダイト法または例えば一般的に自動合成方法で実施されているようなMatthesら、1984、EMBO J.、3:801-05頁により記載された方法を用いて化学合成により調製することができる。ホスホルアミダイト法によれば、オリゴヌクレオチドを例えば自動DNA合成装置で合成し、精製し、アニールし、連結し、適切なベクターにクローニングする。さらに、本質的にあらゆる核酸は、The Midland Certified Reagent Company、Midland、TX、The Great American Gene Company、Ramona、CA、ExpressGen Inc.、Chicago、IL、Operon Technologies Inc.、Alameda、CAおよび多くの他社などの様々な商業的供給源のいずれかから入手することができる。

【0388】

宿主細胞において発現した操作改変モノアミンオキシダーゼは、とりわけ、リゾチーム

処理、音波処理、ろ過、塩析、超遠心分離およびクロマトグラフィーなどのタンパク質精製のためのいずれか1つ以上の周知の技術を用いて、細胞および／または培地から回収することができる。E. コリなどの細菌からのタンパク質の溶解および高効率抽出用の適切な溶液は、St. Louis MOのSigma-Aldrichから商品名Cell Lytic B（商標）のもとで商業的に入手可能である。

【0389】

モノアミノオキシダーゼの分離のためのクロマトグラフィー技術は、とりわけ、逆相クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動およびアフィニティークロマトグラフィーなどである。特定の酵素を精製する条件は、実効電荷、疎水性、親水性、分子量、分子の形状などの因子に一部依存するものであり、当業者に明らかである。

10

【0390】

いくつかの実施形態において、アフィニティー法は、改善されたモノアミノオキシダーゼを分離するのに用いることができる。アフィニティークロマトグラフィー精製については、モノアミノオキシダーゼに特異的に結合する抗体を用いることができる。抗体の産生のために、ウサギ、マウス、ラット等を含むが、これらに限定されない様々な宿主細胞を、化合物を注射することによって免疫化することができる。化合物は、側鎖官能基または側鎖官能基に結合させたリンカーによりBSAなどの適切な担体に結合させることができる。宿主種によって、フロイントのアジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、ならびにBCG（カルメットゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルブムなどの潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない様々なアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができる。

20

【0391】

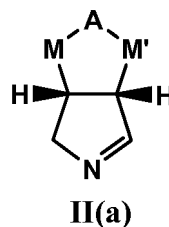
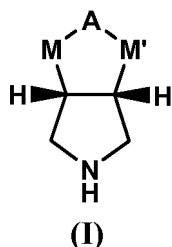
5. 9 操作改変モノアミノオキシダーゼおよびそれを用いて調製される化合物を使用する方法

本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼは、各A、MおよびM'が上述の通りである、以下の構造式Iの基質化合物の構造式II(a)の立体異性体生成物への酸化を触媒することができる。

30

【0392】

【化50】



式中、各A、MおよびM'は、上述の通りである。

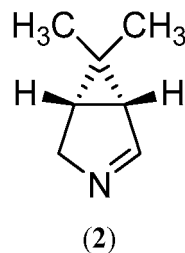
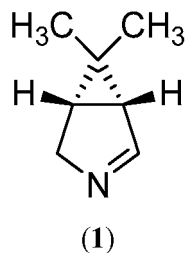
40

【0393】

特定の実施形態において、本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼは、以下の化合物(1)である基質(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン(2)である立体異性体生成物(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エンへの酸化を触媒することができる。

【0394】

【化 5 1】



【0 3 9 5】

10

基質である化合物（１）を生成物である化合物（２）に酸化する方法のいくつかの実施形態において、モノアミノオキシダーゼポリペプチドは、配列番号２の野生型Ａ．ニガー配列と比較して、少なくとも次のアミノ酸置換を有さなければならない：（１）残基４６５がグリシンであり、（２）残基２８９がバリンであり、（３）残基３８４がグルタミンであり、（４）残基３８２がロイシンである。

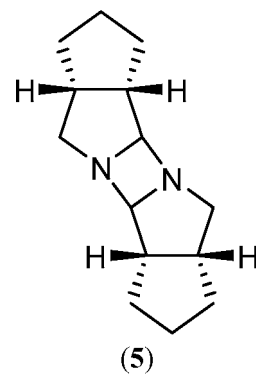
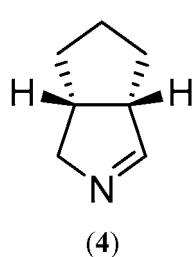
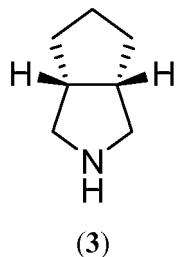
【0 3 9 6】

他の特定の実施形態において、本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼは、以下の化合物（３）である基質（３ a R, 6 a S）－オクタヒドロシクロペンタ〔c〕ピロールの、さらに二量体化を受けて化合物（５）を形成することができる化合物（４）である立体異性体生成物（３ a S, 6 a R）－１, 3 a, 4, 5, 6, 6 a－ヘキサヒドロシクロペンタ〔c〕ピロールへの酸化を触媒する。

20

【0 3 9 7】

【化 5 2】



30

【0 3 9 8】

基質である化合物（３）を生成物である化合物（４）に酸化する方法の一実施形態において、モノアミノオキシダーゼポリペプチドは、配列番号１の野生型Ａ．ニガー配列と比較して、次のアミノ酸置換の少なくとも１つを有さなければならない：（１）残基４６５がグリシンであり、（２）残基２８９がバリンであり、（３）残基３８４がグルタミンであり、（４）残基３６５がトリプトファンである。基質である化合物（３）を生成物である化合物（４）に還元する方法の他の実施形態において、モノアミノオキシダーゼポリペプチドは、配列番号１の野生型Ａ．ニガー配列と比較して、次のアミノ酸置換の少なくとも２つを有さなければならない：（１）残基４６５がグリシンであり、（２）残基２８９がバリンであり、（３）残基３８４がグルタミンであり、（４）残基３６５がトリプトファンであり、（５）残基９９がグルタミン酸である。他の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、配列番号１の野生型Ａ．ニガー配列と比較して、次のアミノ酸置換の少なくとも３つを有さなければならない：（１）残基４６５がグリシンであり、（２）残基２８９がバリンであり、（３）残基３８４がグルタミンであり、（４）残基３６５がトリプトファンであり、（５）残基９９がグルタミン酸であり、（４）残基１３５がグルタミンである。さらなる実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、配列番号１

40

50

の野生型 A. ニガー配列と比較して、少なくとも次のアミノ酸置換を有さなければならない：（１）残基 465 がグリシンであり、（２）残基 289 がバリンであり、（３）残基 99 がグルタミン酸であり、（４）残基 135 がグルタミンであるおよび／または残基 248 がアスパラギン酸である。

【0399】

基質を生成物に酸化する方法の一実施形態において、基質は、約 99 % を超える立体異性体過剰率の生成物に酸化され、モノアミノオキシダーゼは、配列番号 4、8、10、12、14、16、18 または 20 に対応する配列を含む。

【0400】

基質を生成物に還元する方法の他の実施形態において、約 25 g / L を超える基質および約 5 g / L 未満のポリペプチドを用いて行う場合、基質の少なくとも約 50 % が約 24 時間未満で生成物に変換され、ポリペプチドは配列番号 4、8、10、12、14、16、18 または 20 に対応するアミノ酸配列を含む。

【0401】

他の実施形態において、本明細書に記載したモノアミノオキシダーゼのいずれか 1 つは、ウイルス感染の治療に有用なプロテアーゼ阻害剤である Schering 505034（（1R, 2S, 5S）-N-（4-アミノ-1-シクロブチル-3, 4-ジオキソブタン-2-イル）-3-（（S）-2-（3-tert-ブチルウレイド）-3, 3-ジメチルブタノイル）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボキサミド）（Malcolmら（2006）、Antimicrob. Agents Chemother.、50（3）：1013-20頁）の合成の中間体の製造に用いることができる。Schering 505034の合成における重要な段階は、構造式 I の化合物の構造式 II の化合物への、またはより具体的には化合物（1）の化合物（2）への変換である。したがって、本開示は、本開示のモノアミノオキシダーゼポリペプチドを用いて化合物（1）を化合物（2）に変換する段階を含む、Schering 505034の製造の方法を提供する。Schering 505034の製造のための本明細書で開示した方法は、上のスキーム 3、4、5、6、8、9、10、12 および 14 に関して示し、述べた段階の 1 つ以上も含み得る。

【0402】

他の実施形態において、本明細書に記載したモノアミノオキシダーゼのいずれか 1 つは、ウイルス感染の治療に有用なプロテアーゼ阻害剤である VX-950（（N-（（S）-1-シクロヘキシル-2-（（S）-1-（（1S, 3aR, 6aS）-1-（（R）-3-（2-（シクロプロピルアミノ）-2-オキソアセチル）ヘキサノイル）ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロール-2（1H）-イル）-3, 3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イルアミノ）-2-オキソエチル）ピラジン-2-カルボキサミド（Perniら（2006）、Antimicrob. Agents Chemother.、50（3）：899-909頁）の合成の中間体の製造に用いることができる。VX-950の合成における重要な段階は、構造式 I の化合物の構造式 II の化合物への、またはより具体的には化合物（3）の化合物（4）への変換である。したがって、本開示は、本開示のモノアミノオキシダーゼポリペプチドを用いて化合物（3）を化合物（4）に変換する段階を含む、VX-950の製造の方法を提供する。VX-950の製造のための本明細書で開示した方法は、上のスキーム 3、4、5、6、7、9、10、11 および 13 に関して示し、述べた段階の 1 つ以上も含み得る。

【0403】

当業者により公知であるように、モノアミノオキシダーゼ触媒オキシダーゼ反応は、一般的に補因子を必要とする。本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼにより触媒される酸化反応も一般的に補因子であるフラビン-アデニンヌクレオチド（FAD）を必要とする。本明細書で用いているように、「補因子」という用語は、モノアミノオキシダーゼと共同して作用する非タンパク質化合物を意味する。一般的に、モノアミノオキシダーゼに非共有結合または共有結合で結合することができる、酸化型の補因子を反応混合物に加え

る。酸化型 FAD は、還元型 FAD-H₂ から分子状酸素により再生成させることができる。他の実施形態において、酸化型 FAD は、FAD および NAD (P) H を得るように NAD (P) により再生成させることができた。NAD (P) は、次に、NAD (P) H 依存性アルコールデヒドロゲナーゼ／ケトンレダクターゼを用いてケトンのアルコールへの還元によって再生成させることができた。

【0404】

本明細書で述べたモノアミノキシダーゼ触媒酸化反応は、一般的に溶媒中で行う。適切な溶媒は、水、有機溶媒（例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、1-オクタノール、ヘプタン、オクタン、メチルtert-ブチルエーテル (MTBE)、トルエンなど）およびイオン性液体（例えば、テトラヒドロホウ酸 1-エチル 4-メチルイミダゾリウム、テトラヒドロホウ酸 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム、ヘキサフルオロリン酸 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムなど）などである。いくつかの実施形態において、水および水性共溶媒系を含む水性溶媒を用いる。

【0405】

具体例としての水性共溶媒系は、水および 1 つ以上の有機溶媒を有する。一般的に、水性共溶媒系の有機溶媒成分は、それがモノアミノキシダーゼ酵素を完全に不活性化しないようなものを選択する。適切な共溶媒系は、本明細書で述べたものなどの酵素活性アッセイを用いて、候補溶媒系中で問題とする定義された基質を用いて特定の操作改変モノアミノキシダーゼ酵素の酵素活性を測定することによって容易に特定することができる。

【0406】

水性共溶媒系の有機溶媒成分は、水性成分と混和性を有し、単一液相をもたらすものであってよく、または水性成分と部分的に混和性を有しまたは非混和性を有し、2 つの液相をもたらすものであってよい。一般的に、水性共溶媒系を用いる場合、水が有機溶媒中に分散するまたはその逆である、二相性であることを選択する。一般的に、水性共溶媒系を用いる場合、水相から容易に分離することができる有機溶媒を選択することが望ましい。一般的に、共溶媒系における水と有機溶媒との比は、一般的に約 90 : 10 から約 10 : 90 (容積／容積) までの有機溶媒対水および 80 : 20 から 20 : 80 (容積／容積) までの有機溶媒対水の範囲にある。共溶媒系は、反応混合物に加える前にあらかじめ形成させてよく、または反応容器中でインサイツで形成させてよい。

【0407】

水性溶媒（水または水性共溶媒系）は、pH 緩衝性または非緩衝性であってよい。一般的に、酸化は、約 10 以下、通常約 5 から約 10 の範囲内の pH で行うことができる。いくつかの実施形態において、酸化は、約 9 以下、通常約 5 から約 9 の範囲内の pH で行う。いくつかの実施形態において、酸化は、約 8 以下、しばしば約 5 から約 8 の範囲内、通常約 6 から約 8 の範囲内の pH で行う。酸化は、約 7.8 以下または 7.5 以下の pH でも行うことができる。あるいは、酸化は、中性 pH、すなわち、約 7 で行うことができる。

【0408】

酸化反応の過程中、反応混合物の pH は変化し得る。構造式 I の一般的なアミンは中性 pH およびその近くではプロトン化されているが、構造式 II のイミン生成物は中性 pH およびその近くでは一般的にプロトン化されていない。したがって、反応を中性 pH またはその近くで行う一般的実施形態において、プロトン化アミンの非プロトン化イミンへの酸化により、プロトンが水溶液中に放出される。反応混合物の pH は、反応の過程において塩基を加えることによって所望の pH にまたは所望の pH 範囲内に維持することができる。あるいは、pH は、緩衝剤を含む水性溶媒を用いることによって制御することができる。所望の pH 範囲を維持するための適切な緩衝剤は、当技術分野で公知であり、例えば、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤などである。緩衝または塩基添加の組合せも用いることができる。

【0409】

酸の中和用の適切な塩基は、有機塩基、例えば、アミン、アルコキシドなどならびに無

10

20

30

40

50

機塩基、例えば、水酸化物塩（例えば、 NaOH ）、炭酸塩（例えば、 NaHCO_3 ）、重炭酸塩（例えば、 K_2CO_3 ）、塩基性リン酸塩（例えば、 K_2HPO_4 、 Na_2PO_4 ）などである。反応の過程にわたってアミンのイミンへの酸化により放出されるプロトン中和するための好ましい塩基は、アミン基質自体である。変換の過程と同時の塩基の添加は、反応混合物のpHをモニターしながら手作業で、またはより好都合には自動滴定装置をpHスタットとして用いることにより、行うことができる。部分的緩衝能と塩基添加の組合せも過程の制御に用いることができる。一般的に、酸化の過程にわたり非緩衝または部分的緩衝反応混合物に添加される塩基は、水溶液中に添加する。

【0410】

本明細書で述べた立体選択的酸化反応を行うに際して、操作改変モノアミノオキシダーゼは、精製酵素、モノアミノオキシダーゼをコードする遺伝子で形質転換した全細胞および／または細胞抽出物および／またはこのような細胞の溶解物の形で反応混合物に加えることができる。操作改変モノアミノオキシダーゼをコードする遺伝子で形質転換した全細胞または細胞抽出物および／またはこの溶解物は、固体（例えば、凍結乾燥、噴霧乾燥など）または半固体（例えば、粗ペースト）などの種々の異なる形で用いることができる。

10

【0411】

細胞抽出物または細胞溶解物は、沈殿（硫酸アンモニウム、ポリエチレンジアミン、熱処理など）に続く凍結乾燥前の脱塩処理（例えば、限外ろ過、透析など）によって部分的に精製することができる。細胞調製物のいずれかは、例えば、グルタルアルデヒドなどの公知の架橋剤を用いた架橋または固相（例えば、Eupergit Cなど）への固定化により安定化することができる。

20

【0412】

固体反応物（例えば、酵素、塩等）は、粉末（例えば、凍結乾燥、噴霧乾燥など）、溶液、乳濁液、懸濁液などの種々の異なる形で反応に供給することができる。反応物は、当業者に公知である方法および装置を用いて容易に凍結乾燥または噴霧乾燥することができる。例えば、タンパク質溶液は、少しずつ -80°C で凍結し、次に予冷された凍結乾燥チャンバーに加えた後、真空をかけることができる。試料からの水の除去の後に、真空の解除および凍結乾燥試料の回収の前に温度を一般的に2時間にわたり 4°C に上昇させる。

【0413】

酸化反応に用いられる反応物の量は、所望の生成物の量および同時に用いられるモノアミノオキシダーゼ基質の量によって一般的に異なる。一般的に、基質は、約 50mg ／リットルから約 5g ／リットルのモノアミノオキシダーゼを用いて約 5g ／リットルから 50g ／リットルの濃度で用いることができる。当業者は、所望の生産性のレベルおよび生産の規模に合うようにこれらの量をどのようにして変化させるかを容易に理解する。カタラーゼ、消泡剤および重亜硫酸ナトリウムまたはメタ重亜硫酸ナトリウムなどの場合による物質の適切な量は、常用の実験によって容易に決定することができる。

30

【0414】

反応物を加える順序は重要ではない。反応物は、同時に一緒に溶媒（例えば、単相性溶媒、二相性水性共溶媒系など）に加えることができ、あるいは、反応物の一部を別個に加え、一部を異なる時点に一緒に加えることができる。特定の実施形態において、反応物の成分の1つ以上は、モノアミノオキシダーゼの基質および／または生成物阻害を最小限にするまたは未然に防ぐレベルで反応に連続的に加える（「供給する」）ことができる。特定の実施形態において、モノアミノオキシダーゼは、反応の過程にわたって間隔をおいて、例えば約1時間ごとに、約2時間ごとに、約3時間ごとに、または約4時間ごとに加えることができる。

40

【0415】

本明細書で述べたモノアミノオキシダーゼ触媒酸化反応を行う適切な条件は、操作改変モノアミノオキシダーゼと基質を実験的pHおよび温度で接触させ、例えば本明細書に示す実施例で述べた方法を用いて生成物を検出することを含むが、これに限定されない常用の実験により容易に最適化することができる様々な条件を含む。

50

【0416】

モノアミンオキシダーゼ触媒酸化は、約5℃から約75℃まで範囲の温度で一般的に行う。いくつかの実施形態において、反応は、約20℃から約55℃まで範囲の温度で行う。さらに他の実施形態において、反応は、約20℃から約45℃まで、約30℃から約45℃まで、または約40℃から約45℃までの範囲の温度で行う。反応はまた、周囲条件下（約21℃）で行うことができる。

【0417】

酸化反応は、一般的に、基質の本質的に完全またはほぼ完全な酸化が得られるまで、進行させる。基質の生成物への酸化は、公知の方法を用いて基質および／または生成物を検出することによってモニターすることができる。適切な方法は、ガスクロマトグラフィー、HPLCなどである。変換率は、一般的に約50%を超え、約60%を超える可能性もあり、約70%を超える可能性もあり、約80%を超える可能性もあり、90%を超える可能性もあり、しばしば約97%を超える。

【0418】

6. 実施例

本開示の様々な特徴および実施形態は、例示するものであって、限定するものではない、以下の代表的な実施例で例示する。

【実施例1】

【0419】

野生型モノアミンオキシダーゼ遺伝子の取得および発現ベクターの構築

モノアミンオキシダーゼコード化遺伝子は、参照により本明細書に組み込む、米国仮出願第60/848,950号の実施例1に記載されたモノアミンオキシダーゼの報告されたアミノ酸配列およびコドン最適化アルゴリズムに基づいてE. コリ(W3110 fhuAまたはUM2)における発現のためにデザインした。遺伝子は、例えば、42ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドを用いて合成し、lacプロモーターの制御下で発現ベクターpCK110900（米国特許出願公開第20060195947号における図3に示されている）にクローニングした。該発現ベクターは、P15a複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含む。得られたプラスミドを標準的方法を用いてE. コリW3110中に形質転換した。コドン最適化遺伝子の例およびコード化ポリペプチドも表4に示す。野生型モノアミンオキシダーゼの活性は、Zhouら（Zhouら、「A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity」、1997、Anal. Biochem.、253:169-174頁）およびSzutowiczら（Szutowiczら、「Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tissues Using Peroxidase and 2,2'-Azino(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) as Chromogen」、1984、Anal. Biochem.、138:86-94頁）により開示されたものを含む、当技術分野で公知の方法またはその変法を用いて確認した。酵素活性の比較は、本明細書で詳細にさらに述べたように、または例えば、ZhouおよびSzutowiczの方法を用いて、酵素の定義された調製物、設定条件下での定義されたアッセイおよび1つ以上の定義された基質を用いて行った。一般的に、溶解物を比較する場合、宿主細胞により産生され、溶解物中に存在する酵素の量の変動を最小限にするために同一の発現系および同一の宿主細胞を使用するのみならず、アッセイに供した細胞の数およびタンパク質の量も決定した。

【0420】

【表 4】

表 4：代表的なモノアミノキシダーゼに関する略語、供給源および引用					
モノアミノキシダーゼ	酵素が最初に同定された微生物	Genbank アクセッション番号	G I 番号	ポリヌクレオチド配列番号	ポリペプチド配列番号
MAON	アスペルギルス・ニガー	L 3 8 8 5 8	619754	1	2
MAO3	アスペルギルス・オリザ	XM_001822832	169776835	31	32

10

【0421】

本開示の操作改変モノアミノキシダーゼをコードするポリヌクレオチドを、E. コリ W 3 1 1 0 における発現のためにベクター p C K 1 1 0 9 0 0 に同様にクローニングする。

【実施例 2】

【0422】

モノアミノキシダーゼ粉末の製造；振とうフラスコ法

モノアミノキシダーゼ粉末は、次のように振とうフラスコ培養から製造した：目的とするモノアミノキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドを含む E. コリの単一微生物コロニーを、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコールおよび 1 % グルコースを含む 50 ml の Luria Bertani プロス中に接種する。恒温槽中で 250 rpm で振とうしながら細胞を 30℃ で一夜（少なくとも 16 時間）増殖させる。培養は、1 リットルフラスコ中で 250 ml の 2XYT（16 g / l バクトートリプトン、10 g / L 酵母エキス、5 g / L NaCl、pH 7.0）、1 mM MgSO_4 、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール中に 0.2 の 600 nm での光学濃度（OD 600）まで希釈し、30℃ で増殖させる。培養の OD 600 が 0.6 から 0.8 であるときにモノアミノキシダーゼ遺伝子の発現を 1 mM IPTG により誘導し、一夜（少なくとも 16 時間）温置する。細胞を遠心分離（5000 rpm、15 分、4℃）により収集し、上清を捨てる。細胞ペレットを等容積の冷（4℃）100 mM トリエタノールアミン（塩酸塩）緩衝液、pH 7.0（場合によって 2 mM MgSO_4 を含む）を用いて再懸濁し、上のように遠心分離により収集する。洗浄済み細胞を 2 容積の冷 トリエタノールアミン（塩酸塩）緩衝液、pH 7.0 に再懸濁し、温度を 4℃ に維持しながら French Press に 12000 psi で 2 回通す。細胞デブリを遠心分離（9000 rpm、45 分、4℃）により除去する。透明な溶解物上清を収集し、-20℃ で保存する。凍結透明溶解物の凍結乾燥によって、粗モノアミノキシダーゼ酵素の乾燥粉末が得られる。

20

30

【実施例 3】

【0423】

モノアミノキシダーゼの製造；発酵法

モノアミノキシダーゼ粉末は、次のように発酵により製造した：曝気攪拌 15 L 発酵槽中で、0.88 g / L 硫酸アンモニウム、0.98 g / L のクエン酸ナトリウム、12.5 g / L のリン酸水素二カリウム三水和物、6.25 g / L のリン酸二水素カリウム、6.2 g / L の Tastone-154 酵母エキス、0.083 g / L のクエン酸第二鉄アンモニウムならびに 2 g / L の塩化カルシウム二水和物、2.2 g / L の硫酸亜鉛七水和物、0.5 g / L の硫酸マンガニー水和物、1 g / L の硫酸銅七水和物、0.1 g / L のモリブデン酸アンモニウム四水和物および 0.02 g / L の四ホウ酸ナトリウム十水和物を含む 8.3 mL / L の微量元素溶液を含む 6.0 L の増殖培地を 30℃ の温度にする。発酵槽に目的とするモノアミノキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドを含む E. コリ W 3 1 1 0 の後期指数培養を接種し、実施例 3 で述べたように振とうフラスコ中で 0.5 の

40

50

開始OD600から2.0に増殖させる。発酵槽を500 1500rpmで攪拌し、溶存酸素レベルを30%以上の飽和度に維持するために空気を1.0-15.0L/分で発酵容器に供給する。培養のpHは、20容積/容積%水酸化アンモニウムの添加により7.0に制御する。培養の増殖は、500g/Lセロース(cerelose)、12g/L塩化アンモニウムおよび10.4g/L硫酸マグネシウム七水和物を含む供給溶液を加えることにより維持する。培養が50のOD600に達したならば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトシド(IPTG)を1mMの最終濃度まで加えることにより、モノアミノキシダーゼの発現を誘導する。次いで、培養をさらに14時間増殖させる。収集するまで培養を4℃に冷却し、4℃に維持する。Sorval RC12BP遠心分離機で4℃で、5000Gで40分間遠心分離することにより、細胞を収集する。収集した細胞は、次の下流回収工程に直接用いるまたはこのような使用まで4℃で保存する。

10

【0424】

細胞を下流回収工程に直接用いなければならない場合、細胞ペレットを、湿潤細胞ペーストの各容積に対して2容積の4℃の100mMトリエタノールアミン(塩酸塩)緩衝液、pH6.8に再懸濁する。2段階ホモジナイジングバルブアセンブリを取り付けたホモジナイザーに懸濁液を12000psigの圧力を用いて通すことによって、細胞内モノアミノキシダーゼを細胞から放出させる。破壊直後に細胞ホモジネートを4℃に冷却する。10重量/容積%ポリエチレンジオキシエチレンの溶液、pH7.2を溶解物に0.5重量/容積%の最終濃度まで加え、30分間攪拌する。得られた懸濁液を標準的実験室用遠心分離機で5000Gで30分間遠心分離することにより清澄化する。透明な上清をデカントし、30Kdの分子量カットオフを有するセルロース限外ろ過膜を用いて10倍濃縮する。最終濃縮物を浅い容器中に分注し、-20℃で凍結し、粉末に凍結乾燥する。このモノアミノキシダーゼ粉末は、-80℃で保存する。

20

【実施例4】

【0425】

6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン(化合物(1))の(1R,5S)-6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン(化合物(2))への変換の分析方法

6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンの変換および6,6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン生成物の立体異性体純度を下で述べるキラルGC法により決定した。溶出の順序は次の通りであった：基質(1)(保持時間約7分)、所望の(1R,2S)-イミン(2)(約10.6分)、望ましくない(1R,2S)イミン(約11.0分)；カラム：Supelco Betadex 225(部品番号24348)、.25mm×30m×.25μm；オープン温度：85℃等温；キャリアー流量：1.1mL/分；注入量：4μL；注入スプリット：100:1；注入部温度=200℃；FID検出。

30

【実施例5】

【0426】

オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール(化合物(3))の(3aS,6aR)-1,3a,4,5,6,6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロール(化合物(4))への変換の分析方法

40

オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロールの変換および生成物の立体異性体純度を下で述べるキラルGC法により決定した。溶出の順序は次の通りであった：基質(3)(保持時間約2.7分)、所望の(3aS,6aR)イミン(4)(約5.5分)、望ましくない(3aR,6aS)-イミン(約5.8分)。イミン(4)のイミン二量体は、注入部口においてイミンに熱分解する。カラム：Supelco Betadex 225(部品番号24348)、.25mm×30m×.25μm；オープン温度：120℃等温；キャリアー流量：1.1mL/分；注入量：4μL；注入スプリット：100:1；注入部温度=200℃；FID検出。

【実施例6】

50

【0427】

6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン (化合物 (1)) の酸化に関する野生型モノアミノキシダーゼの評価

本明細書で開示した野生型モノアミノキシダーゼを、6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン (化合物 (1)) を6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサ-2-エン (化合物 (2)) に酸化するそれらの能力についてスクリーニングした。空気中の50 mL 3頸フラスコに25 mLの100 mM pH 3. 0リン酸カリウム緩衝液および330 μ Lの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサンを加えて、均一な溶液を得た。pHを濃 H_3PO_4 により約7. 3に調整した。pH調整済み溶液に60 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrich; カタログ番号C-3515) およびpH 8. 0リン酸カリウム緩衝液中150 mgの配列番号2 (A. ニガー) または配列番号32 (A. オリザ) を有する野生型モノアミノキシダーゼ粉末 (実施例2の振とうフラスコ法により調製した) を加えた。得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌した。pHは、1-5 μ Lずつの1 N NaOHのフィードバック制御添加により7. 2に維持した。(アミン反応物は中性pHにおいてプロトン化されており、イミン生成物はプロトン化されない。この作用により、pHを維持するために中和されなければならないプロトンが放出される。)

10

【0428】

pHを約14に至らせる10 N NaOHで反応をクエンチさせ、相分離のために遠心分離を用いて混合物を $CDCl_3$ で抽出した。A. ニガー野生型モノアミノキシダーゼを用いた反応からの $CDCl_3$ 溶液の ^1H -NMR分析で、アミン(1)のイミン(2)への約20%の変換が示された。A. オリザ野生型モノアミノキシダーゼを用いた反応は、A. ニガー野生型モノアミノキシダーゼを用いた反応の約2倍の量のNaOH溶液を消費したことから、約2倍量のアミン(1)が変換されたことがわかった。

20

【0429】

実施例4の方法によるキラルGC分析により、所望の(1R, 5S)-イミン(2)が示された。望ましくない(1S, 5R)-イミン鏡像異性体は検出されなかった。

【0430】

この実施例は、これらの野生型モノアミノキシダーゼが6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン (化合物 (1)) に対して低い活性を有し、それを所望の(1R, 5S)-イミン(2)に変換させることを示している。

30

【実施例7】

【0431】

オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (3)) の酸化に関する野生型モノアミノキシダーゼの評価

本明細書で開示した野生型モノアミノキシダーゼを、(オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (3))) を(3aS, 6aR) 1, 3a, 4, 5, 6, 6aヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (4)) に酸化するそれらの能力についてスクリーニングした。空気中の50 mL 3頸フラスコに25 mLの100 mM pH 8. 0リン酸カリウム緩衝液および375 mgのオクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール塩酸塩を加え、1 N NaOHでpHを約7. 3に調整した。pH調整済み溶液に60 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrichから購入; カタログ番号C-3515) およびpH 8. 0リン酸カリウム緩衝液中150 mgの配列番号2 (A. ニガー) を有する野生型モノアミノキシダーゼ粉末 (実施例2の振とうフラスコ法により調製した) を加えた。得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌した。pHは、1-5 μ Lずつの1 N NaOHのフィードバック制御添加により7. 2に維持した。24時間後にNaOH消費はほとんどまたは全く認められなかった。pHを約14に至らせる10 N NaOHで反応をクエンチさせ、混合物を $CDCl_3$ で抽出した。遠心分離 (5分間6000 rpm) により相分離した後、 $CDCl_3$ 溶液の ^1H -NMR分析で、アミン(3)のイミン(4)への変換はほとんどまたは全く示されなかった。

40

50

【0432】

この実施例は、野生型モノアミンオキシゲナーゼが、オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (3)) に対するたとえあったとしても非常にわずかな活性を有することを示している。

【実施例 8】

【0433】

6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン (化合物 (1)) に対するモノアミンオキシダーゼ活性の高処理能力アッセイ

10 定向進化により得られ、進化モノアミンオキシゲナーゼ遺伝子を含むプラスミドライブラリーを E. コリ中に形質転換し、1% グルコースおよび 30 μ g/mL クロラムフェニコール (CAM) を含む Luria-Bertani (LB) ブロス上で平板培養する。30°C で少なくとも 16 時間温置した後、Q-bot (商標) ロボットコロニー採取装置 (Genetix USA, Inc., Beaverton, OR) を用いてコロニーを採取し、180 μ L の Terrific ブロス (TB)、1% グルコース、30 μ g/mL クロラムフェニコール (CAM) および 2 mM MgSO₄ を含む 96 ウェルシャローウェルマイクロタイタープレート中に入れる。200 rpm で振とうしながら細胞を 30°C で一夜増殖させる。次いで、この培養の 20 μ L を、350 μ L の Terrific ブロス (TB)、2 mM MgSO₄ および 30 μ g/mL CAM を含む 96 ディープウェルプレート中に移す。250 rpm で振とうしながらディープウェルプレートを 30°C 20 で 2.5 から 3 時間温置した後 (OD₆₀₀ 0.6-0.8)、イソプロピル β -D チオガラクトシド (IPTG) を 1 mM の最終濃度まで加えることにより、細胞培養による組換え遺伝子発現を誘導する。次いで、プレートを 250 rpm で振とうしながら 30°C で 15-23 時間温置する。

【0434】

細胞を遠心分離によりペレットにし、400 μ L の溶解緩衝液に再懸濁し、室温で少なくとも 2 時間振とうすることによって溶解した。溶解緩衝液は、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0、1 mg/mL リゾチームおよび 500 μ g/mL 硫酸ポリミキシン B を含んでいた。細胞デブリを遠心分離によりペレットにした。

【0435】

30 モノアミンオキシダーゼ活性は、20 μ L の適切に希釈された透明溶解物上清を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、4 U/mL A. ニガーカタラーゼ (Sigma-C3515) および 40 mM 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン (この酢酸塩として供給された) を含む 180 μ L のアッセイ混合物を含む 96 ディープウェルマイクロタイタープレートのウェルに移すことによって測定した。アッセイプレートを密封し、室温で 4 時間振とうした。500 μ L の 1:1 アセトニトリル:水を加えて反応をクエンチさせ、プレートを遠心分離した。遠心分離した後、実施例 4 による方法による HPLC 分析のために 150 μ L の上清をシャロープレートに移した。

【0436】

40 HPLC 条件: 0.5 mL/分の 60:40 40 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリルの移動相を用いた 40°C の 2.1 $\times$ 75 mm Zorbax Eclipse XD B-C-18 3.5 μ m クロマトグラフィーカラム。イミンは、約 1 分 (254 nm) に溶出した。イミンのみを検出することができ、変異体の活性順位付けをイミンシグナルの絶対ピーク面積を用いて行った。

【0437】

あるいは、100 μ L の 10 N NaOH を用いてアッセイ反応をクエンチさせ、1:1 容積/容積 MTBE で抽出し、実施例 4 の方法によるキラル GC 分析にかけた。

【実施例 9】

【0438】

オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (3)) に対するモノアミンオキシダーゼ活性の高処理能力アッセイ

10

20

30

40

50

96 ウェルプレート上のモノアミノキシダーゼ変異体を含む溶解物を実施例8で述べたように調製した。

【0439】

モノアミノキシダーゼ活性は、50 μ L の透明溶解物を、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、4 U/mL A. ニガーカタラーゼ (Sigma-C3515) および 50 mM オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールを含む 450 μ L のアッセイ混合物を含む 96 ディープウェルマイクロタイタープレートのウェルに移すことによって測定した。アッセイプレートを密封し、室温で 16 時間振とうした。プレートを遠心分離し、実施例5による HPLC 分析のために 100 μ L の上清をシャローウェルプレートのウェル中の 100 μ L のアセトニトリル中でクエンチさせた。

10

【0440】

100 μ L のアセトニトリルを加えることにより反応をクエンチさせ、プレートを遠心分離した。遠心分離した後、実施例4による方法による HPLC 分析のために 100 μ L の上清を 100 μ L のアセトニトリルに加え、シャロープレートに移した。

【0441】

HPLC 条件：0.5 mL/分の 70:30 40 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリルの移動相を用いた 40°C の 2.1 $\times$ 75 mm Zorbax Eclipse XDB C-18 3.5 μ m 粒子径カラム。イミンは、約 1.3 分 (254 nm) に溶出した。イミンのみを検出することができ、変異体の順位付けをイミシングナルの絶対ピーク面積を用いて行った。

20

【0442】

あるいは、100 μ L の 10 N NaOH を用いてアッセイ反応をクエンチさせ、1:1 容積/容積 MTBE で抽出し、実施例5のキラル GC 分析にかけた。

【0443】

この実施例は、オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール (化合物 (3)) の酸化について改善されたモノアミノキシダーゼ変異体を同定するために用いられた方法を記載している。

【実施例10】

【0444】

(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサ-2-エン (化合物 (2)) の調製規模製造

30

300 rpm のオーバーヘッド攪拌機を取り付けた 500 mL 4 頸フラスコに約 25°C の 150 mL の Milli-Q 水および 1.2 mL (約 1.0 g; 約 9 mmol) の 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサンを加えて、pH が 11.8 の均一溶液を得た。pH が 7.5 に達するまで Na₂S₂O₅ を少しずつ加えた。無色溶液に 300 μ L の Antifoam-204 (Sigma カタログ番号 A-6226) および 600 μ L の A. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrich; カタログ番号 C-3515) を加えて、pH 7.5 の無色溶液を得た。この溶液に配列番号 10 を有する 1.5 g のモノアミノキシダーゼ粉末 (実施例3による発酵により製造) を加えて、黄色溶液を得た。空気スパーキングプローブを挿入したところ (空気流量約 60 mL/分)、反応混合物の pH は直ちに低下し始めた。2 N NaOH のフィードバック制御投与により pH を維持した。約 30 分後に、pH は安定な状態のままであり、さらなる塩基の投与は行われなかった。さらに 10 分 (合計 40 分) 後に、120 mL の 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサン NaHSO₃ 溶液 (20.8 g の 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサンを 150 mL の dH₂O に加え、pH 7.2 に達するのに十分な Na₂S₂O₅ を加えることによって調製した) を反応物に 0.25 mL/分の速度で加えた。反応混合物の pH は直ちに低下し始め、2 N NaOH の投与が再開された。約 8 時間 (9 時間の合計反応時間) 後に 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサンおよび NaHSO₃ の溶液の添加を完了した。塩基の添加を続け、基質の添加を完了した後に塩基の添加速度を増加させた。200 μ L の分割

40

50

試料を採取し、200 μ Lの8N NaOHでクエンチし（アミノスルホネートを破壊して遊離イミンを得るため）、600 μ LのCDCl₃で抽出した。CDCl₃抽出物の¹H-NMR分析により、基質（1）のアザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン化合物（2）への完全な変換が示された（¹H-NMR（300 MHz, CDCl₃）スペクトル： δ 7.42（s, 1H, N=C-H）、3.81（dd; J=6.1, 17.8; 1H）、3.50（dd; J=2.1, 17.8; 1H）、2.06（m; 1H）、1.62（m, 1H）、1.03（s, 3）、0.80（s, 3H））。

【0445】

キラルGC分析により、（1R, 5S）鏡像異性体（2）が示され、（1S, 2R）鏡像異性体は検出できなかった。

【0446】

反応混合物は、アミノニトリルへのシアン化反応のために「そのまま」用いた。

【実施例11】

【0447】

空気の静的ブランケットのもとでの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン（1）の（1R, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン（2）へのモノアミノキシダーゼ触媒脱対称化

空気中の50 mL 3頸フラスコに25 mLの100 mM pH 3.0リン酸カリウム緩衝液および330 μ Lの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンを加えて、均一な溶液を得た。濃H₃PO₄を用いてpHを約7.5に調整した。pH調整済み溶液に、60 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Sigma Aldrich; カタログ番号C-3515）およびpH 8.0リン酸カリウム緩衝液中配列番号4、6または8を有する150 mgのモノアミノキシダーゼ粉末（実施例2による方法により調製）を加えた。得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌した。pHは、1-5 μ Lずつの1N NaOHのフィードバック制御添加により7.4に維持した。次いで、pHを約14に至らせる10N NaOHで反応をクエンチさせた。混合物の試料をCDCl₃で抽出した。遠心分離（6000 rpmで5分間）による相分離後に、¹H-NMR分析により、アミン（1）のイミン（2）への少なくとも95%の変換が示された。実施例4によるキラルGC分析により、（1R, 5S）-イミン鏡像異性体（2）が示された。（1S, 2R）鏡像異性体は検出されなかった。

【実施例12】

【0448】

酸素のブランケットのもとでの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン（1）の（1R, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサ-2-エン（2）へのモノアミノキシダーゼ触媒脱対称化

空気中の50 mL 3頸フラスコに25 mLの100 mM pH 3.0リン酸カリウム緩衝液および330 μ Lの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンを加えて、均一な溶液を得た。濃H₃PO₄を用いてpHを約7.5に調整した。pH調整済み溶液に、60 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Sigma Aldrich; カタログ番号C-3515）およびpH 8.0リン酸カリウム緩衝液中配列番号4、6または8の150 mgのポリペプチドのモノアミノキシダーゼ粉末（実施例2による方法により調製）を加えた。ヘッドスペースを酸素流でフラッシュし、得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌した。pHは、1-5 μ Lずつの1N NaOHのフィードバック制御添加により7.2に維持した。次いで、pHを約14に至らせる10N NaOHで反応をクエンチさせた。混合物の試料をCDCl₃で抽出した。遠心分離（6000 rpmで5分間）による相分離後に、¹H-NMR分析により、アミン（1）のイミン（2）への少なくとも95%の変換が示された。実施例4によるキラルGC分析により、（1R, 5S）-イミン鏡像異性体（2）が示された。（1S, 2R）鏡像異性体は検出されなかった。

【実施例13】

【0449】

重亜硫酸塩の存在下での空気スパーキングを用いた6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン(1)の(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサ-2-エンへのモノアミノオキシダーゼ触媒脱対称化

100mLフラスコに40mLのdH₂Oおよび1. 8mLの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサンを加えて、pHが約11. 4の均一な溶液を得た。この溶液に2. 7gのNa₂S₂O₅を加えて、均一な溶液とし、約1mLの8N NaOHを加えることによりpHを約7. 5に調整した。この溶液に60μLのAntifoam-204 (Sigmaカタログ番号A-6226)、120μLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrich; カatalog番号C-3515) および10mLの100mM pH8. 0リン酸カリウム緩衝液中配列番号8のポリペプチドの300mgのモノアミノオキシダーゼ粉末 (実施例2による方法により調製) を加えた。空気をフリットガラスを通して反応混合物中にスパーキングし、得られた淡黄色溶液を空気スパーキングにより24時間室温 (約21℃) で24時間攪拌した。pHは、1μLずつの2. 5N NaOHのフィードバック制御添加により7. 4に維持した。反応をクエンチさせ、イミン-重亜硫酸付加体 (アミノスルホネート) をpHを約14に至らせる10N NaOHで破壊して遊離イミンを得て、生成物をMTBE中への抽出により抽出分離した。相分離の後、蒸留により(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサ-2-エンは86%の収率で分離された。CDC1₃中¹H-NMRによる分析 (実施例10と同様の) により、化合物(1)のイミン化合物(2)への変換が確認された。実施例4の方法によるキラルGC分析により、(1R, 5S)-イミン鏡像異性体(2)が示された。(1S, 2R)鏡像異性体は検出されなかった。

【0450】

このようにして得られた(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサ-2-エンをD₂O中1. 0当量のNaHSO₃で処理した。¹H-NMR分析により、重亜硫酸付加体への定量的な変換が示された(¹H-NMR (300MHz, D₂O) スペクトル: δ4. 8 (d, J=1, 1H (NC(H)SO₃; 主要ジアステレオマー)、4. 5 (d, J=5, 1H (NC(H)SO₃; 微量ジアステレオマー)、3. 4-3. 6 (m, 2H; 微量ジアステレオマー)、3. 25 (dd, J=3, 10, 1H; 主要ジアステレオマー)、3. 05 (dd, 1H; J=1, 10; 主要ジアステレオマー)、1. 65 (m, 1H; 主要および微量ジアステレオマー)、1. 55 (m, 1H; 主要および微量ジアステレオマー)、1. 22 (s, 3H; 微量ジアステレオマー)、1. 15 (s, 3H; 微量ジアステレオマー)、1. 10 (s, 3H; 主要ジアステレオマー)、1. 00 (s, 3H; 微量ジアステレオマー)。

【実施例14】

【0451】

空気スパーキングならびに基質および重亜硫酸塩の同時添加を用いた6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサンの(1R, 5S)-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサ-2-エンへのモノアミノオキシダーゼ触媒脱対称化

300rpmのオーバーヘッド攪拌機を取り付けた室温 (約21℃) の500mL 4頸フラスコに150mLのMilli-Q水および1. 2mL (約1. 0g; 約9mmol) の6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサンを加えて、pHが11. 8の均一溶液を得た。pHが7. 5に達するまでNa₂S₂O₅を少しずつ加えた。無色溶液に300μLのAntifoam-204 (Sigmaカタログ番号A-6226) および600μLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrich; カatalog番号C-3515) を加えて、pH7. 5の無色溶液を得た。この溶液に配列番号8のポリペプチドの1. 5gのモノアミノオキシダーゼ粉末 (実施例3により調製) を加えて、黄色溶液を得た。空気スパーキングプローブを挿入し、空気を反応物中に約60mL/分の速度でスパーキングしたところ、反応混合物のpHは直ちに低下し始めたことが認められた。2N NaOHのフィードバック制御添加によりpHを維持した。約30分後に

、pHは安定な状態のままであったので、さらなる塩基の添加は行わなかった。さらに10分（合計40分）後に、120mLの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン/NaHSO₃溶液（20. 8gの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサンと150mLのdH₂OおよびpH7. 2に達するのに十分なNa₂S₂O₅）を反応混合物に0. 25mL/分の速度で加えた。反応混合物のpHが直ちに低下し始め、2N NaOHの添加が再開された。約8時間（9時間の合計反応時間）後に6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン/NaHSO₃の添加を完了した。塩基の添加を続け、基質添加を完了した後に塩基の添加速度を増加させた。pHを約14に至らせる（およびイミン-重亜硫酸付加体を破壊する）10N NaOHで反応をクエンチさせ、混合物をMTBEで抽出した。相分離後、MTBE溶液の蒸留により（1R, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサ-2-エンが72%の収率で分離された。CDCl₃中¹H-NMR分析（実施例10と同様に）により、化合物（1）のイミン化合物（2）への変換が確認された。実施例4の方法によるキラルGC分析により、（1R, 5S）-イミン鏡像異性体（2）が示された。（1S, 2R）鏡像異性体は検出されなかった。

10

【実施例15】**【0452】**

（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルの調製（静的基質モード）

100mLフラスコに40mLのdH₂Oおよび1. 8mLの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサンを加えて、pHが約11. 4の均一溶液を得た。この溶液に2. 7gのNa₂S₂O₅を加えて、均一溶液とし、約1mLの8N NaOHでpHを約7. 5に調整した。この溶液に60μLのAnti foam-204（Sigmaカタログ番号A-6226）、120μLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Sigma Aldrich；カタログ番号C-3515）および10mLの100mM pH8. 0リン酸カリウム緩衝液中配列番号8のポリペプチドの300mgのモノアミノオキシダーゼ粉末（実施例2による方法により調製）を加えた。空気をフリットガラスを通して反応混合物中に約10mL/分の速度でスパーキングし、得られた淡黄色溶液を空气中で24時間室温（約21℃）で24時間攪拌した。終始、pHを1μLずつの2. 5N NaOHのフィードバック制御添加により7. 4に維持した。24時間後に、1. 0g（1. 3当量）のNaCNを（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-スルホネートを次いで含む反応混合物に加えた。室温（約21℃）でさらに15分間攪拌した後、混合物をMTBEで抽出した。（2-Me-THFも抽出に用いることができる。）相分離および溶媒除去後に、1. 78g（収率90%）の（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルが淡黄色固体として分離された。CDCl₃中¹H-NMRによる分析により、（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルの調製が確認された（¹H-NMR（300MHz, CDCl₃）スペクトル：δ3. 92（d, J=1. 2, 1H, NC（H）（CN））、3. 25（m, 1H）、2. 96（dd, J=2. 1, 17. 0）、1. 48（dd；J=1, 2, 12. 2；1H）、1. 42（m, 1H）、1. 13（s, 3H）、1. 11（s, 3H））。

20

30

40

【0453】

（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-スルホネートを含む反応混合物をこのようにして生成させ、室温で3. 0当量のNaCNで12時間処理したとき、約25%の望ましくないシス立体異性体（1R, 2R, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルが所望のトランス（1R, 2S, 5S）立体異性体とともに混合物中に認められた。CDCl₃中¹H-NMRにより、シス-アミノニトリルメチンプロトンが4. 22ppmにおける二重線（J=4. 2）として示された。

50

【実施例 16】

【0454】

(1R, 2S, 5S) - 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボニトリルの調製 (連続基質添加モード)

段階 1。オーバーヘッド攪拌機 (300 rpm) を取り付けた室温 (約 21℃) の 500 mL 4 頸フラスコに 150 mL の Milli-Q 水および 1.2 mL (約 1.0 g および 9 mmol) の 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサンを加えて、pH が 11.8 の均一溶液を得た。pH が 7.5 に達するまで $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ を少しずつ加えた。無色溶液に 300 μL の Antifoam-204 (Sigma カタログ番号 A-6226) および 600 μL の A. ニガーカタラーゼ懸濁液 (Sigma Aldrich; カタログ番号 C-3515) を加えて、pH 7.5 の無色溶液を得た。この溶液に配列番号 12 を有する 300 mg のモノアミノキシダーゼ粉末 (実施例 3 の方法により調製) を加えて、黄色溶液を得た。空気スパーキングプローブ (約 60 mL/分の空気流速) を挿入したところ、反応混合物の pH は直ちに低下し始めた。2N NaOH のフィードバック制御添加により pH を維持した。約 40 分後に、pH は安定な状態のままであり、さらなる塩基の添加は行われなかった。さらに 10 分 (合計 50 分) 後に、150 mL の 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン NaHSO_3 溶液 (26.1 g の 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサンと 160 mL の dH_2O および pH 7.2 に達するのに十分な $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) を反応混合物に 0.12 mL/分の速度で加えた。反応混合物の pH は直ちに低下し始め、2N NaOH の添加が再開された。約 21 時間 (約 22 時間の合計反応時間) 後に 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン/ NaHSO_3 の添加を完了した。塩基の添加を基質添加を完了した後高い速度で続けた。24 時間後に、 ^1H NMR 分析により反応が完結したと判断された。

【0455】

段階 2。24 時間後に、 ^1H - NMR 分析により反応が完結したと判断され、10.0 g の NaCN (1.11 当量) を反応混合物に加えて、pH 9.9 の乳白色反応混合物を得た。24 時間後に、 ^{13}C NMR 分析により反応が完結したと判断された。30 分後に、反応物を 300 mL の MTBE で抽出した。下の水相を排出し (約 250 mL)、上の有機層を 6 g (直径 2" × 高さ 1/4") の Celite (商標) を通してろ過した。Celite (商標) を 300 mL の MTBE で洗浄し、Celite (商標) の洗浄に用いた MTBE を用いて、水相を抽出した。有機相を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下で 40℃ で 1 時間濃縮して、白色固体を得た。白色固体をさらに減圧下で 30 分間乾燥して、23.9 g (収率 95%) の (1R, 2S, 5S) - 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボニトリルを得た。

【実施例 17】

【0456】

6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボン酸メチルエステルの調製

実施例 16 または 17 に従って調製した (1R, 2S, 5S) - 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボニトリルを、PCT 国際出願公開 WO 2007/075790 に記載された手順により対応する実質的に鏡像異性的に純粋な (1R, 2S, 5S) - 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボン酸メチルエステルに変換する。

【実施例 18】

【0457】

(1R, 2S, 5S) - 6, 6 - ジメチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 2 - カルボニトリルの調製、アミノニトリルのトランス/シス比に対する NaCN 当量および反応時間の影響

手順は、配列番号 8 のモノアミノキシダーゼ粉末を実施例 3 の方法により調製したこ

とを除いて、NaCNの添加まで実施例15のものと同一である。24時間後、表5に示すようにNaCNを反応混合物に少しずつ加えた（1.0当量のNaCNは720mgの95%NaCNであった）。各規定の時間間隔の後、200 μ Lの分割試料を採取し、1mLのCDCl₃で抽出し、次いで¹H-NMRにより分析した。（（1R, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボニトリルの所望の2Sおよび望ましくない2Rエピマーの間の比）間のトランス/シス比をアミノニトリルメチンプロトン共鳴の¹H-NMR積分（トランス=3.92ppmにおける二重線；シス=4.22ppmにおける二重線）により決定した。

【0458】

【表5】

10

表5

時間 [分]	添加した NaCN [当量]	総NaCN [当量]	前の 添加以来の 時間 [分]	PH	変換% [¹ H-NMR]	トランス/ シス [¹ H-NMR]
0	1.0	1.0	0	10.5	ND ¹	ND
20	---	1.0	20	10.5	92	>100 ²
60	---	1.0	60	10.6	92	>100
90	0.5	1.5	30	10.8	97	>100
150	---	1.5	60	10.8	96	26
210	0.5	2.0	60	11.0	98	19
230	1.0	3.0	20	11.1	98	16
350	---	3.0	120	11.2	98	12

20

¹ND=測定されず ²>100はシスメチン共鳴が検出されないことを意味する。

【0459】

最終分割試料を採取した後、反応混合物を100mLの酢酸エチルで抽出し、粗砂を通してろ過して、透明相分離物を得た。20mLのヘプタンを有機相に加えた。40℃で1時間のロータリー真空蒸発により、有機相を蒸発乾固した。¹H-NMR分析により、トランス/シス比が12:1のままであったことが示された。

30

【実施例19】

【0460】

（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボニトリルの調製：方法の頑健性

段階1。オーバーヘッド攪拌機（300rpm）を取り付けた室温（約21℃）の500mL4頸フラスコに150mLのMilli-Q水および1.2mL（約1.0gおよび9mmol）の6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンを加えて、pHが11.8の均一溶液を得た。pHが7.5に達するまでNa₂S₂O₅を少しずつ加えた。無色溶液に300 μ LのAntifoam-204（Sigmaカタログ番号A-6226）および600 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Sigma Aldrich；カタログ番号C-3515）を加えて、pH7.5の無色溶液を得た。この溶液に配列番号12を有する300mgのモノアミノオキシダーゼ粉末（実施例3の方法により調製）を加えて、黄色溶液を得た。空気スパーキングプローブ（約60mL/分の空気流速）を挿入したところ、反応混合物のpHは直ちに低下し始めた。2N NaOHのフィードバック制御添加によりpHを維持した。約40分後に、pHは安定な状態のままであり、さらなる塩基の添加は行われなかった。さらに10分（合計50分）後に、150mLの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンNaHSO₃溶液（26.1gの6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンと160mLのdH₂OおよびpH7.2に達するのに十分なNa₂S₂O₅）を反応混合物に0.12

40

50

mL／分の速度で加えた。反応混合物のpHは直ちに低下し始め、2N NaOHの添加が再開された。約21時間（約22時間の合計反応時間）後に6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン/NaHSO₃の添加を完了した。塩基の添加を基質添加を完了した後に高い速度で続けた。24時間後に、¹H-NMR分析により反応が完結したと判断された。

【0461】

段階2。24時間後に、13.5gのNaCN（1.5当量）を反応混合物に加えて、pH9.9の乳白色反応混合物を得た。混合物を室温で15および45分間攪拌した後に200μLの分割試料を採取した。分割試料を1mLのCDCl₃で抽出し、抽出物を¹H-NMRにより分析した。シス立体異性体は、両時点において¹H-NMR検出限界未

10

【0462】

NaCN添加以来約60分後に、反応物を300mLのMTBEで抽出した。下の水相を排出し（約250mL）、上の有機層を6g（直径2"×高さ1/4"）のCelite（商標）を通してろ過した。Celite（商標）を300mLのMTBEで洗浄し、Celite（商標）の洗浄に用いたMTBEを用いて、水相を抽出した。有機相を合わせ、ロータリー真空エバポレーターを用いて減圧下で40℃で1時間濃縮して、白色固体を得た。白色固体をさらに減圧下で30分間乾燥して、22.5g（収率90%）の（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルを得た。シス（2R）エピマーは、¹H-NMR検出限界未

20

【0463】

この実施例は、このアミノニトリルがpH9.9で、0.5当量過剰なシアニドの存在下で室温で1時間の後に立体異性的に純粋な形のままであることを示している。

【実施例20】

【0464】

（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルの調製：方法の頑健性

段階1。手順は、実施例18の段階1と同一である。

【0465】

段階2。24時間後に、11.0gのNaCN（1.22当量）を反応混合物に加えて、pH9.9の乳白色反応混合物を得た。室温で10分間攪拌した後に200μLの分割試料を採取し、1mLのCDCl₃で抽出した。抽出物溶液の¹H-NMR分析により、トランスアミノニトリルである（1R, 2S, 5S）-6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-2-カルボニトリルへの完全な変換が示され、シス2R立体異性体は検出できなかった。

30

【0466】

反応混合物を室温でさらに16時間攪拌した。16時間後の¹H-NMR分析により、約15:1のトランス/シスアミノニトリル比が示された（トランス/シス比は、アミノニトリルメチンプロトン：トランス=3.92ppmにおける二重線；シス=4.22ppmにおける二重線の¹H-NMR積分により決定した）。

40

【実施例21】

【0467】

静的空気中でのオクタヒドロシクロペンタ[c]ピロールの（3aS, 6aR）-1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロールへのモノアミノオキシダーゼ触媒脱対称化

空気中の50mL 3頸フラスコに25mLの100mM pH8.0リン酸カリウム緩衝液および375mgのオクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール塩酸塩を加えた後、1N NaOHを加えることによってpHを約7.5に調整した。pH調整済み溶液に60μLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Sigma Aldrich；カタログ番号C-3515）およびpH8.0リン酸カリウム緩衝液中配列番号4を有する150mgのモノ

50

アミノキシダーゼ粉末（実施例2の方法により調製した）を加えた。得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌し、この間に1-5 μ Lずつの1N NaOHのフィードバック制御添加によりpHを7.4に維持した。pHを約14に至らせる10N NaOHで反応をクエンチさせ、生成物をCDCl₃中への抽出によって分離し、変換を¹H-NMRにより分析したところ、1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロールの生成が示された。

【0468】

この実施例において用いた配列番号4を有するモノアミノキシダーゼを高処理能力スクリーニングにおいて同定したとき、実施例5のキラルGCアッセイ方法により、それがオクタヒドロシクロペンタ[c]ピロールを所望の(3aR, 6aS)-イミン(4)に酸化したことが示された。(3aS, 6aR)鏡像異性体は、検出されなかった。

10

【実施例22】

【0469】

(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボニトリルの調製

空气中の50mL 3頸フラスコに25mLの100mM pH8.0リン酸カリウム緩衝液および400mgのオクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール塩酸塩、500mgのNa₂S₂O₅を加え、10N NaOHによりpHを約7.5に調整した。pH調整済み溶液に30 μ LのA. ニガーカタラーゼ懸濁液(Sigma Aldrich; カタログ番号C-3515)およびpH8.0リン酸カリウム緩衝液中配列番号10を有する300mgのモノアミノキシダーゼ粉末（実施例2の方法により調製した）を加えた。得られた淡黄色の溶液を空气中で24時間攪拌し、この間に1-5 μ Lずつの1N NaOHのフィードバック制御添加によりpHを7.5に維持した。48時間攪拌した後、300mgのNaCNを反応混合物に加えたところ、pHが約9.9に上昇した。室温(約21°C)でさらに1時間攪拌した後、混合物を酢酸エチルで抽出した。相分離および溶媒蒸発後、316mgのオクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボニトリルが分離された(収率82%)。¹H-NMRにより、約90%の(1S, 3aR, 6aS)、「トランス」および約10%の(1R, 3aR, 6aS)エピマー、「シス」が示された(¹H-NMR(300MHz, CDCl₃)スペクトル: δ 3.95(d, J=6.6, シスアミノニトリルメチンH)、3.62(d, J=1.2; トランスアミノニトリルメチンH)、3.15(m, 1H)、2.71(m, 2H)、2.62(m, 1H)、1.63-1.93(m, 3H)、1.55(m, 1H)、1.22-1.45(m, 3H))。

20

30

【実施例23】

【0470】

(3aR, 6aS)-1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ[c]ピロール(化合物(4))およびこの対応する二量体(化合物(5))の調製規模製造

20°Cで、300rpmで攪拌されたジャケット付き3L 3頸フラスコに500mLのdH₂Oおよび20mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール水中溶液を加えた。濃H₃PO₄でpHを約7.6に調整して、無色均一溶液を得た。この溶液に2.0mLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液(Sigma Aldrich; カタログ番号C-3515)および配列番号16のポリペプチドの5.0gのモノアミノキシダーゼ粉末（実施例3の方法により調製した）を加えて、淡黄色の溶液を得た。容器のヘッドスペースに約0.2L/分の乾燥空気を通気した。反応物のpHは、380mLが添加されるまで、20-100 μ Lずつの25重量%オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール水中溶液のフィードバック制御添加により7.5に維持された。(中性溶液中のアミンはプロトン化されており、イミンはプロトン化されない。プロトンは、反応により放出され、pHを維持するために中和されなければならない。この実施例においては、アミン自体がpHスタットの滴定剤として用いられる塩基である。) 380mLの25重量%オクタヒ

40

50

ドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液が添加された後、pHは、反応を完結させる（最初の5 g（45 mmol）の基質に対応するために1 N NaOHのフィードバック制御添加により維持された。さらなるNaOHの消費が認められなくなった後、スラリーの分割試料を採取し、ろ過し、固体を風乾した。

【0471】

種々の溶媒に溶解させた固体の¹H-NMRスペクトルは、溶液中種々の割合のイミン（3aR, 6aS）オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール（4）およびこの二量体（5）を示した。D₆-DMSO中¹H-NMR（300 MHz）は、二量体を示し、遊離イミンは検出されなかった（スペクトル：δ 3.11（t, J = 8.2; 1H）、2.45（m, 1H）、2.33（m, 1H）、1.85（dd, J = 7.2, 8.1, 1H）、1.31-1.58（m, 7H））。CDCl₃中¹H-NMR（300 MHz）は、イミンと二量体の混合物を示した（スペクトル：δ 3.22（m, 1H）、2.65（m, 1H）、2.30-2.40（m, 2H）、1.89（m, 1H）、1.50-1.70（m, 5H）、1.43（m, 1H））。17% D₃PO₄/D₂O中¹H-NMR（300 MHz）は、プロトン化イミン単量体のみを示した（スペクトル：δ 7.6-8.2（br, 1H）、3.5-3.8（br, 1H）、2.8-3.5（br, 2H）、2.2-2.8（br, 1H）、0.5-1.7（br, 6H））。

【0472】

反応混合物の大部分に100 mLの濃HClを加えて、pHが約0（二量体をプロトン化イミンに破壊しない）の黄色懸濁液を得た。黄色懸濁液を4℃で8000で10分間遠心分離した。得られた黄色上清をデカントし、反応容器に戻した。白色ペースト（遠心分離によりペレット化）を100 mLのdH₂Oに再懸濁し、ろ紙でろ過した。残留物をdH₂O（1×100 mL）で洗浄した。（3aS, 6aR）-1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロール塩酸塩を含む、このようにして得られたすべての酸性水溶液を合わせ、アミノニトリルへのシアン化反応に直接用いた。

【0473】

この実施例で用いた配列番号16を有するモノアミノオキシダーゼを高処理能力スクリーニングにおいて固定したとき、実施例5のキラルGCアッセイにより、それがオクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールを所望の（3aR, 6aS）-イミン（4）に酸化したことが示された。（3aS, 6aR）鏡像異性体は、検出されなかった。

【実施例24】

【0474】

静的空気または酸素中でのオクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールの（3aS, 6aR）-1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロールおよびこの対応する二量体へのモノアミノオキシダーゼ触媒脱対称化；抽出による生成物の分離

20℃で、300 rpmで攪拌されたジャケット付き3 L 3頸フラスコに500 mLのdH₂Oおよび20 mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液を加えた。濃H₃PO₄でpHを約7.6に調整して、無色均一溶液を得て、これに2.0 mLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液（Novozyme；「Catalyzyme 101」）および配列番号16のポリペプチドの5.0 gのモノアミノオキシダーゼ粉末（実施例3の方法により調製した）を加えて、淡黄色の溶液を得た。容器のヘッドスペースに約0.2 L/分の乾燥空気を通気した。反応物のpHは、380 mLが添加されるまで、20-100 μLずつの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液のフィードバック制御添加により7.5に維持された。（中性溶液中のアミンはプロトン化されており、イミンはプロトン化されない。プロトンは、反応により放出され、pHを維持するために中和されなければならない。この実施例においては、アミン自体がpHスタットの滴定剤として用いられる塩基である。）380 mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液が添加された後、pHは、反応を完結させる（最初の5 g（45 mmol）の基質に対応する）ために1 N NaOHの添加により維持された。さらなるNaOHの消費が認められなくなった後、1800 mLのMTBEを、その後に4

5℃に加熱した不均一反応混合物に加えた。C e l l i t e（商標）によるろ過の後、下の水相を捨て、上の有機相を10%クエン酸で抽出し、(3a S, 6a R) - 1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロール塩酸塩を含む酸性水溶液を実施例29の方法による(1R, 2S, 5S) - 6, 6-ジメチル-3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサン-2-カルボン酸の調製に直接用いた。

【実施例25】

【0475】

(3a R, 6a S) オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール（化合物(3)）の二量体の調製規模製造

空气中30℃で、300rpmで攪拌されたジャケット付き500mL 3頸フラスコに100mLのdH₂Oおよび2.0mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液(0.5gの基質)を加えた。濃H₃PO₄でpHを約7.8に調整して、無色均一溶液を得た。この溶液0.2mLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液(Novozyme; 「Catalyzyme 101」)および配列番号36のポリペプチドの0.25gのモノアミノキシダーゼ粉末(実施例3の方法により調製した)を加えた。反応物のpHが直ちに低下し、pHは、25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液のフィードバック制御添加によりpH7.7に維持された。2時間後、さらに0.25gのモノアミノキシダーゼ粉末を加えた。(3a R, 6a S) オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールの二量体が反応物から沈殿し始め、反応混合物は、実験中に白色スラリーになった。さらに2時間(合計4時間)後に、ヘッドスペースに約0.6mL/分の酸素を通気し、酸素通気を実験中維持した。24時間の合計反応時間の後、さらに0.5gのモノアミノキシダーゼを加えた。48.5時間の合計反応時間の後、合計32.3mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液を加えた(反応した総基質は8.58gであった)。反応混合物をショートパス蒸留ヘッド(short path distillation head)を取り付けた500mL 1頸フラスコに移し、一式を加熱マントルに入れた。加熱マントルを160℃に加熱することにより、二量体が氷浴中に浸漬したレシービングフラスコに水蒸気蒸留し始めた。蒸気相の温度は、約96℃であった。約30分後に、反応物の約1/2が蒸留し、蒸気相の温度は、約98℃であった。この時点で蒸留を中止した。レシービングフラスコ中の白色固体の水中懸濁液を粗フリット漏斗によりろ過し、白色固体を2時間風乾して、7.17g(収率84%)の(3a R, 6a S) オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールの二量体を得た。

【実施例26】

【0476】

静的空气中でのオクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールの(3a S, 6a R) - 1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロールおよびこの対応する二量体へのモノアミノキシダーゼ触媒脱対称化; 水蒸気蒸留による生成物の分離

20℃で、300rpmで攪拌されたジャケット付き3L 3頸フラスコに500mLのdH₂Oおよび20mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液を加えた。濃H₃PO₄でpHを約7.6に調整して、無色均一溶液を得て、これに2.0mLのA. ニガーカタラーゼ懸濁液(Novozyme; 「Catalyzyme 101」)および配列番号16のポリペプチドの5.0gのモノアミノキシダーゼ粉末(実施例3の方法により調製した)を加えて、淡黄色の溶液を得た。容器のヘッドスペースに約0.2L/分の乾燥空気を通気した。反応物のpHは、20-100μLずつの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液のフィードバック制御添加により7.5に維持された。(3a R, 6a S) オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールの二量体が反応物から沈殿し始め、反応混合物が白色スラリーになった。380mLの25重量%オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール水中溶液を加えた後、水蒸気蒸留(蒸留器ヘッド温度約98℃)により生成物を反応混合物から分離した。レシーバーポットに(3a S, 6a R) - 1, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロールの二量体の水中懸濁液が含まれていた。1.1-1.2当量の濃HClをレシーバーポ

ットに加えて二量体を破壊し、(3 a S, 6 a R) - 1, 3 a, 4, 5, 6, 6 a - ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロール塩酸塩の水中均一溶液を得た。この溶液は、実施例 27 において (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボニトリルを調製するのに直接用いた。

【実施例 27】

【0477】

(1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボニトリルの調製

実施例 26 で調製した (3 a S, 6 a R) - 1, 3 a, 4, 5, 6, 6 a - ヘキサヒドロシクロペンタ [c] ピロール塩酸塩の水性酸性溶液を 0℃ に冷却し、300 rpm で攪拌した。0℃ の冷却溶液に 3 mL / 分の 100 mL の d H₂ O 中 50 g の Na C N を加えた。(シアニドによる塩酸塩溶液の中和によって H C N がインサイツで発生した。) Na C N の添加を開始してから 2 時間後に、1000 mL のトルエン (氷浴中で予冷した) を加えて、二相性混合物を得、これに K₂ C O₃ の飽和溶液を、水相の pH が 9.8 に達するまで、10 mL / 分の速度で加えた。次いで、下の水相をカニユーレを用いて除去し、廃棄する前に漂白剤で処理した (残りのシアニドを破壊するため)。上の有機懸濁液 / 乳濁液を C e l i t e (商標) 545 の 20 g の床 (高さ約 1 / 4 " × 直径約 3 ") を通して室温 (約 21℃) で約 15 分間にわたりろ過して、約 1000 mL の無色有機相および約 300 mL の黄色水相ならびに約 100 mL の「ラグ相 (r a g p h a s e)」 (上の有機相と下の水相との間にある中間層) を得た。C e l i t e (商標) パッドをトルエン 2 × 100 mL で洗浄した。溶液を分液漏斗中で合わせ、水相およびラグ層を排出させ、廃棄のために漂白剤で処理した。有機相から有機相の分割試料を採取し、蒸発乾固した。¹ H - N M R (300 M H z, C D C l₃) 分析により、(1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボニトリル (「トランス」) およびこの 1 R エピマー (「シス」) が約 30 : 1 の比率で存在することが示された (¹ H - N M R (300 M H z, C D C l₃) スペクトル: δ 3.95 (d, J = 6.6, シスアミノニトリルメチン H)、3.62 (d, J = 1.2; トランスアミノニトリルメチン H)、3.15 (m, 1 H)、2.71 (m, 2 H)、2.62 (m, 1 H)、1.63 - 1.92 (m, 3 H)、1.55 (m, 1 H)、1.22 - 1.45 (m, 3 H))。有機相を約 0℃ に冷却し、250 mL の濃 H C l (氷浴中で予冷した) で 2 回抽出した。この後、完全で、即時的な相分割が起こった。(抽出が発熱性であったため、抽出溶液を予冷することが必要であった。溶液の温度は、約 4℃ からほぼ室温まで上昇した。(1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボニトリル塩酸塩を含む合わせた濃縮 H C l 抽出物 (合計約 600 mL) を合わせ、実施例 28 において (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボン酸塩酸塩を作製するのに直接用いた。

【実施例 28】

【0478】

6.1 実施例 28 (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボン酸塩酸塩の調製

実施例 27 からの (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボニトリル塩酸塩溶液を加熱して 24 時間還流し、この後、約 300 mL の水 / H C l を蒸留させ、残りの溶液を約 50 - 60℃ に冷却した。温溶液を 500 mL のトルエンに加え、残りの水 (約 100 - 120 mL) をトルエン共沸物として蒸留させた。すべての水が除去された後、得られた褐色固体および淡黄色トルエンの重質スラリー懸濁液を室温 (約 21℃) に冷却した。固体をろ過漏斗上に収集し、トルエン (2 × 200 mL) で洗浄した。黄褐色固体を 2 時間風乾し、真空中でさらに一夜乾燥して、159 g (オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロールからの総収率 72%) の (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール - 1 - カルボン酸塩酸塩を N H₄ C l 副生成物との 1 : 1 混合物として得た。

【0479】

D₂Oに溶解した塩混合物の¹H-NMRにより、約17:1のトランス/シス(1S/1R)比が示された(¹H-NMR(300MHz, D₂O)スペクトル: δ4.32(d, J=5.5; シス-アミノ酸メチン)、3.85(d, J=2.3; トランス-アミノ酸メチン)、3.50(m, 1H)、3.65-3.88(m, 3H)、1.20-1.80(m, 6H))。

【実施例29】

【0480】

6.2 実施例29(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸塩酸塩からの(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸t-ブチルエステルシュウ酸1:1塩の調製

段階1: 磁気攪拌棒を備えた1650mL厚肉ガラス圧力ビン(Ace Glass, Inc.、8648-157)に実施例28において調製した75g(306.9mmol)の(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸塩酸塩/塩化アンモニウム混合物、375mLのジクロロメタンおよび497mLの酢酸t-ブチルを入れた。得られた混合物を周囲温度(約21℃)で激しく攪拌し、大きい凝集物を破壊して自由攪拌懸濁液を得た。この懸濁液を食塩水-氷浴を用いて0℃の内部温度に冷却し、75.4mL(1162mmol)のメタンスルホン酸を15分間にわたって1滴ずつ加えた。この間に内部温度が5℃に上昇した。圧力ビンを密封し、反応混合物を18時間にわたって激しく攪拌しながら周囲温度(約21℃)に加温した。この間に反応混合物は、琥珀色溶液中白色無機塩の懸濁液になった。混合物を氷浴中で冷却し、圧力ビンに注意深く通気し、蓋を取り外した。混合物を3Lフラスコに移し、攪拌しながら氷浴中で冷却した。400mLの50%(重量:重量)水中NaOHを、混合物の温度を20℃未満に維持しながら、35分間にわたって混合物に加えた。攪拌を停止し、相を分離させた。有機相(約850mL)を除去し、別個の容器に移した。残りの水相およびラゲ層(pH13、約800mL)を375mLのジクロロメタンで抽出した。有機相を合わせ(約1250mL)、水(2×225mL)で洗浄した。得られた有機相をろ過して、ラゲ層および不溶性物質を除去し、ロータリー真空蒸発により溶媒を除去して、48.3gの暗琥珀色の油を得た。油の¹H-NMRスペクトルは、(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸t-ブチルエステルを示した。

【0481】

同じ手順に従った第2の調製により、50.6gのトランス-(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸t-ブチルエステル油が生成した。

【0482】

段階2: 段階1による2回の調製からの97.9g(463.3mmol)の(1S, 3aR, 6aS)-オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロール-1-カルボン酸t-ブチルエステルを750mLの酢酸t-ブチルに溶解し、オーバーヘッド機械的攪拌、温度計、滴下漏斗および還流冷却器を装着した3L4頸フラスコに入れた。周囲温度(約21℃)で攪拌しながら、44.0g(488.6mmol)のシュウ酸の750mLの2-プロパノール中溶液を37分間にわたって1滴ずつ加えた(混合物の温度は31℃に上昇した)。約50mLのシュウ酸溶液の添加後に固体が沈殿し始め、450mLの添加後に濃厚な懸濁液が生じた。500mLのシュウ酸溶液の添加後に、沈殿した固体が再溶解して、暗黄色溶液が得られた。固体が600mLのシュウ酸溶液の添加後に再び速やかに沈殿し、シュウ酸の添加の終了まで存続した。次いで、この懸濁液を78℃に加熱して薄い懸濁液とし、これを攪拌しながら受動的に周囲温度(約21℃)に冷却させた。冷却を開始してから16時間後に、沈殿固体をろ過により収集し、イソプロパノール(450mL)、酢酸イソプロピル(450mL)およびメチルト-ブチルメチルエーテル(450mL)で連続的に洗浄した。固体を真空オーブン(30℃、25"真空、N₂流)中で乾燥して、

118. 1 g の (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸 t-ブチルエステルシュウ酸 1 : 1 塩 ((1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸塩酸塩からの収率 64 %) を高密度、黄褐色の自由流動性粉末 (GC 分析により純度 99.7 %) として得た。これは、(1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸 t-ブチルエステルシュウ酸 (1 : 1) 塩の予想された ¹H-NMR スペクトルを示した。

【0483】

(1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸 t-ブチルエステルシュウ酸 (1 : 1) 塩の再結晶化：上の段階 2 からの黄褐色粉末 (118. 1 g、391. 9 m モル) およびイソプロパノール (1950 mL) を、機械的攪拌、温度計および還流冷却器を備えた 3 L 4 頸フラスコに入れた。懸濁液を攪拌し、74 °C に加熱し、塩を完全に溶解して、黄色溶液を得た。攪拌を遅くし、溶液を受動的に周囲温度 (約 21 °C) に冷却させた。冷却を開始してから 20 時間後に、沈殿固体をろ過によって収集し、イソプロパノール (1 L)、酢酸イソプロピル (1 L) およびメチル t-ブチルメチルエーテル (1 L) で連続的に洗浄した。固体を真空オーブン (40 °C、28 " 真空、N₂ 流) 中で乾燥して、110. 45 g の (1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸 t-ブチルエステルシュウ酸 1 : 1 塩 ((1 S, 3 a R, 6 a S) - オクタヒドロシクロペンタ [c] ピロール-1-カルボン酸塩酸塩からの収率 59.7 %) を GC 分析による 99.9 % 純度の微細な灰色がかった白色の針状物として得た。キラル GC 分析により、所望の (1 S, 3 a R, 6 a S) - 立

10

20

【0484】

本開示において引用したすべての特許、特許刊行物および他の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【配列表】

2011525533000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/048255
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07D 487/04(2006.01); C07D 487/02(2006.01); C07D 403/12(2006.01); C07D 403/02(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) C07D 487/04; A61K 31/40; C07D 207/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7288565 B2 (OSAMU KANIE et al.) 30 October 2007 See entire document	1-48
A	WO 2007-029086 A2 (RANBAXY LABORATORIES LIMITED et al.) 15 March 2007 See entire document	1-48
☐ 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 08 MARCH 2010 (08.03.2010)		Date of mailing of the international search report 09 MARCH 2010 (09.03.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Dong Wook Telephone No. 82-42-481-8163 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/048255

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7288565 B2	30.10.2007	JP 04-363183 B2	28.08.2009
		US 2004-0147591 A1	29.07.2004
		WO 03-008379 A1	30.01.2003
WO 2007-029086 A2	15.03.2007	EP 1931633 A2	18.06.2008
		US 2008-0300251 A1	04.12.2008
		WO 2007-029086 A3	18.05.2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 リアン, ジャック

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94402、サン・マテオ、サウス・フレモント・ストリート・513

(72)発明者 ニューマン, リサ・エム

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95112、サン・ノゼ、ジャクソン・ストリート・655

(72)発明者 ジャン, シュイン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94555、フレモント、メイバード・サークル・34279

(72)発明者 ラロンド, ジェームズ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94306、パロ・アルト、ジョージア・アベニュー・615

(72)発明者 クレイ, マイケル・デー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロー・パーク、アビー・アベニュー・2095、アパートメント・6

(72)発明者 ジュウ, ジュイン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94086、サニーバイル、カーソン・ドライブ・955

(72)発明者 グルーバー, ジョン・エム

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95762、エル・ドラド・ヒルズ、ゲージ・コート・111

(72)発明者 コールベック, ジェフリー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94025、メンロー・パーク、ウェイブリー・ストリート・240、ナンバー・5

(72)発明者 マンガー, ジョン・デー, ジュニア

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94065-8483、レッドウッド・シティ、レッドウッド・シヨアズ・パークウェイ・950、ユニット・エヌ・101

(72)発明者 マビナハリ, ジャグデイシュ

シンガポール国、シンガポール・689674、チョア・チユー・カン・ループ・73、ナンバー・03-10

(72)発明者 シエルドン, ロジャー

オランダ国、エヌ・エル-6997・ホーフ・ケツペル、デ・ワイ・5

Fターム(参考) 4B064 AE48 CA21 DA01

4C050 AA01 AA07 BB02 CC04 DD01 EE02 FF01 GG01 HH01

4C204 BB01 BB04 CB06 CB08 DB01 DB27 EB01 EB02 FB01 GB01

GB03 GB11 GB13 GB21 GB24 GB32