



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109486784 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201811449438.2

C12P 17/10(2006.01)

(22)申请日 2018.11.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109486784 A

CN 101356266 A, 2009.01.28,
CN 104328094 A, 2015.02.04,
CN 107034246 A, 2017.08.11,
CN 106520719 A, 2017.03.22,
CN 105950581 A, 2016.09.21,
CN 107058256 A, 2017.08.18,
CN 104480155 A, 2015.04.01,
CN 106801043 A, 2017.06.06,
WO 2016168708 A1, 2016.10.20,
CN 105441404 A, 2016.03.30,
高新星.w-转氨酶分子改造研究进展.《生物工程学报》.2018,

(43)申请公布日 2019.03.19

(73)专利权人 江南大学
地址 214000 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

Gomm和O'Reilly.Transaminases for chiral amine synthesis.《CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY》.2018,

(72)发明人 廖祥儒 翟李欣 赖英杰 殷方荣
蔡宇杰 管政兵

审查员 张丹丹

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 张勇

权利要求书1页 说明书6页
序列表4页 附图2页

(51)Int.Cl.
C12N 9/10(2006.01)
C12N 15/54(2006.01)
C12P 13/00(2006.01)
C12P 13/04(2006.01)

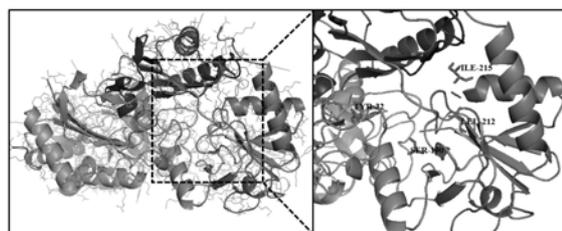
(54)发明名称

一种能催化西他沙星五元环关键中间体的ω-转氨酶突变体

工业上手性合成西他沙星五元环关键中间体的应用。

(57)摘要

本发明公开了一种能催化西他沙星五元环关键中间体的ω-转氨酶突变体,属于基因工程和酶工程技术领域。本发明通过对ω-转氨酶晶体结构中B因子较高的氨基酸进行定点突变,即将ω-转氨酶32位置处的Y突变成L,190位置处的S突变成A,212位置处的L突变成M,215位置处的I突变成M,得到了一种可以催化西他沙星五元环关键中间体的ω-转氨酶突变体。本发明突变体Y32L/S190A/L212M/I215M催化效率Kcat/Km为0.64min⁻¹·mM⁻¹,催化(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine生成5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one时,突变体的5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one最大转化率为79.02%。本发明得到的突变体适用于在



CN 109486784 B

1. 一种 ω -转氨酶突变体,其特征在于,所述 ω -转氨酶突变体的氨基酸序列为SEQ ID NO:5 所示的序列。
2. 编码权利要求 1 所述突变体的基因。
3. 一种含有权利要求2所述基因的核苷酸序列的重组质粒载体。
4. 根据权利要求3所述的重组质粒载体,其特征在于,所述重组质粒载体是在 pET 系列、pGEX 系列、pCold 系列或 pUB 中的任意一种质粒载体的基础上构建得到的。
5. 表达权利要求 1 所述突变体的基因工程菌。
6. 权利要求1所述突变体、或编码权利要求 1 所述突变体的基因、或表达权利要求 1 所述突变体的基因工程菌在食品、化工或者制备药物领域中的应用,所述应用为催化(S)-5-benzyl-5-azaspiro [2.4] heptan-7-amine合成西他沙星五元环关键中间体。

一种能催化西他沙星五元环关键中间体的 ω -转氨酶突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能催化西他沙星五元环关键中间体的 ω -转氨酶突变体,属于基因工程和酶工程技术领域。

背景技术

[0002] 2008年日本第一制药三共株式会社开发的广谱喹诺酮类抗菌药——西他沙星(Sitafloxacin Hydrate)对许多临床常见耐氟喹诺酮类菌株具有良好杀菌作用,用于治疗严重难治性感染性疾病。与其他喹诺酮药物相比,本品的日治疗费用低,治疗效果和安全性好。但其合成工艺中的关键技术难点是不对称合成西他沙星五元环关键中间体。该工艺的不稳定、成本高、难以放大生产的技术限制严重限制了西他沙星的生产。相较于手性胺类药物的化学合成方法,其生物合成方法的酶不对称催化以其底物专一性、立体选择性强、反应条件温和、环境友好等优势受到关注。因此酶不对称催化的生物合成方法更具有研究和应用价值。

[0003] 转氨酶(aminotransferase, transaminase)属于转移酶类,通常用于催化氨基由氨基供体化合物转移至氨基受体化合物。根据不同可变区的差异,将文献报道的不同来源的转氨酶的蛋白质序列进行比较和聚类分析,再根据亲水位点的叠加和迭代对比,我们可以将转氨酶分为4类。其中 ω -转氨酶属于第二亚族,常用于制备手性胺及非天然氨基酸,如 β -氨基酸。因为 ω -转氨酶的大口袋结合区域比天冬氨酸转氨酶(AspATs)和芳香族转氨酶(AroATs)稍大,所以它可能能够结合比天然氨基酸体积较大的底物。转氨酶催化的反应主要有不对称合成和动力学拆分,利用酶催化合成手性胺类化合物,不仅可以大大的提高产率,还可以避免原料的浪费,以制得大量的光学纯度较高的手性胺类化合物。 ω -转氨酶不仅可以应用于对外消旋体的拆分,还可以催化前体酮底物不对称合成手性胺类化合物。 ω -转氨酶在制备手性胺类化合物范围较广,因此更具有应用价值。

[0004] 在蛋白质分子改造中,目前常用的方法有理性设计、非理性设计和半理性设计。三种方法的主要区别在于是否充分了解酶蛋白分子结构以及是否需要使用生物信息学软件进行计算和预测。其中理性设计具有实验成本低、简单方便和时间短等优点。

[0005] 虽然 ω -转氨酶有着巨大的应用和研究价值,但是从野生菌中筛选出的 ω -转氨酶无法特异性催化西他沙星五元环关键中间体,使之无法进一步将该 ω -转氨酶应用于工业生产中,大大降低了开发和运用。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明将来自Bacillus pumilus W3的 ω -转氨酶(一种来自短小芽孢杆菌的 ω -转氨酶及在生物胺化中的应用.201811219769.7)进行异源表达和定点突变改造,使改造后的 ω -转氨酶能够特异性催化西他沙星五元环关键中间体,对 ω -转氨酶的工业化应用及推广具有深远的技术指导意义。

[0007] 本发明的 ω -转氨酶突变体,与亲本 ω -转氨酶相比能够特异性催化西他沙星五元

环关键中间体。所述亲本基因与短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* W3) ω -转氨酶基因 (Sequence ID:MH196528) 一致,所述作为突变用的质粒模板为携带天然 ω -转氨酶编码基因的载体ota3/pCold II (申请号:CN201811219769.7)。

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种能够特异性催化西他沙星五元环关键中间体的 ω -转氨酶突变体,所述突变体的氨基酸序列包括:在SEQ ID NO:1的氨基酸序列的基础上同时将第32位置的酪氨酸突变成亮氨酸,第190位置的丝氨酸突变成丙氨酸,第212位置的亮氨酸突变成甲硫氨酸,和第215位置的异亮氨酸突变成甲硫氨酸而得到的氨基酸序列,命名为Y32L/S190A/L212M/I215M。

[0009] 在一种实施方式中,所述 ω -转氨酶突变体的氨基酸序列,如SEQ ID NO:5所示的序列。

[0010] 在一种实施方式中,所述 ω -转氨酶突变体的核苷酸序列,包括SEQ ID NO:2所示的序列。

[0011] 本发明的第二个目的是一种制备所述突变体的方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 设计定点突变所用引物,以携带 ω -转氨酶编码基因的载体为模板进行突变并构建Y32L/S190A/L212M/I215M突变体的质粒载体;

[0013] (2) 将序列正确的重组质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3) 得到重组菌,将重组菌发酵培养,得到的发酵上清液即含有 ω -转氨酶突变体。

[0014] 在一种实施方式中,所述发酵是将重组菌于37°C培养至OD₆₀₀=0.6,然后降温至15°C并加入终浓度0.4mM的IPTG进行诱导,培养24h时离心获得上清酶液。

[0015] 在一种实施方式中,所述制备方法还进一步包括使用AKTA蛋白纯化仪和HisTrap FF crude 1ml的镍柱对发酵上清液中的 ω -转氨酶进行纯化。

[0016] 本发明的第三个目的是提供一种含有所述突变体的氨基酸序列的重组质粒载体。

[0017] 在一种实施方式中,所述质粒载体,是pET系列、pGEX系列、pCold系列或pUB中的任意一种。

[0018] 本发明还要求保护编码所述突变体的基因以及表达所述突变体的基因工程菌。

[0019] 本发明也要求保护所述突变体、编码所述突变体的基因、表达所述突变体的基因工程菌在食品、化工或者制备药物方面的催化合成相关手性胺的应用,尤其是在制备西他沙星药物中的应用。

[0020] 在一种实施方式中,所述应用,包括催化氨基由氨基供体化合物转移至氨基受体化合物。

[0021] 所述应用,包括可以选择性催化并可以手性合成手性胺,比如(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine以及其他非天然氨基酸。

[0022] 本发明的有益效果:

[0023] 本发明的 ω -转氨酶突变体是以来源于*Bacillus pumilus*的R型 ω -转氨酶为基础进行突变的,构建的 ω -转氨酶突变体Y32L/S190A/L212M/I215M具有特异性催化西他沙星五元环关键中间体的性能。酶动力学分析显示,本发明的突变体Y32L/S190A/L212M/I215M的K_m值为4.88±0.20mM;催化效率K_{cat}/K_m为0.64min⁻¹mM⁻¹。催化(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine生成5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one时,本发明突变体的5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one最大转化率为79.02%。而 ω -转氨酶亲本并不能

催化该西他沙星五元环关键中间体(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine。因此,本发明的 ω -转氨酶突变体比亲本更适合 ω -转氨酶在催化(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine等手性胺过程中的应用。

附图说明

[0024] 图1:天然 ω -转氨酶三维模拟结构;

[0025] 图2:西他沙星五元环关键中间体的化学结构;

[0026] 图3:天然 ω -转氨酶及突变体纯酶SDS-PAGE凝胶电泳;其中,泳道1代表蛋白分子量标准,泳道2为突变体Y32L/S190A/L212M/I215M,泳道3为天然 ω -转氨酶。

具体实施方式

[0027] 实施例1: ω -转氨酶定点突变体的制备及构建

[0028] 来源于*Bacillus pumilus* W3的 ω -转氨酶1种定点突变体Y32L/S190A/L212M/I215M:

[0029] 本发明中,以相似度最高的thermophilic archaea转氨酶晶体结构(PDB ID: 5E25)为模板,通过Swiss-Model在线服务器构建了*Bacillus pumilus* W3 ω -转氨酶(ω -BPAT)的三维模拟结构(图1)。通过氨基酸一级序列比对发现,thermophilic archaea转氨酶和 ω -BPAT两者之间相似度达到51.21%,符合同源建模的参数,因此可以认为 ω -BPAT有着thermophilic archaea转氨酶相似的三维结构。根据软件分析预测的结果,利用PCR介导的定点突变方法构建突变体Y32L/S190A/L212M/I215M。

[0030] 定点突变体的制备方法,根据*Bacillus pumilus* W3 ω -转氨酶的序列(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示),分别设计并合成引入定点突变的引物,对 ω -转氨酶Y32,S190,L212和I215位置同时进行定点突变,测定DNA编码序列,分别测序确认 ω -转氨酶突变体的编码基因是否正确;将突变体基因连接到适当的表达载体(pET系列、pGEX系列、pCold系列或pUB中任意一种)中并导入大肠杆菌中进行表达,得到相应的 ω -转氨酶定点突变体。

[0031] 定点突变体编码基因的PCR扩增:利用PCR技术,以表达载体ota3/pCold II为模板。

[0032] 引入Y32L/S190A/L212M/I215M定点突变的突变引物为:

[0033] BPTA-F1:5'-TTGGCGCAATGGAGGGTATGACCCGCAACGCAATTA-3'(SEQ ID NO:3)

[0034] BPTA-R1:5'-CGGGTCATACCCTCCATTGCGCCAATATAACCTGGC-3'(SEQ ID NO:4)

[0035] BPTA-F2:5'-GTAGCCGAAGGGGCGGCTGATAATGTTTTTATCTAT-3'(SEQ ID NO:6)

[0036] BPTA-R2:5'-CATTATCAGCCGCCCTTCGGCTACATATCCTTGAT-3'(SEQ ID NO:7)

[0037] BPTA-F3:5'-CATGGGTTCTTACTTGGCGATGGGGTCTTCGAAGGC-3'(SEQ ID NO:8)

[0038] BPTA-R3:5'-CCCCATCGCCAAGTAAGAACCCATGGTTCGTATACAG-3'(SEQ ID NO:9)

[0039] PCR扩增程序设定为:首先,95°C预变性3min;然后进入25个循环:95°C变性20s,60°C退火20s,72°C延伸1min 40s;最后72°C延伸10min,4°C保温。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

[0040] PCR产物纯化后,加入DPn I,37°C,水浴1h,降解模板,然后将突变片段组装,之后转化*E. coli* JM109,挑取阳性克隆,LB液体培养基培养8-10h,保甘油管,送去测序。测序正确的突变体(氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示、核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示),从甘油管

接种至LB培养基,过夜培养,提取质粒,将质粒转化表达宿主大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞,得到能够表达突变体Y32L/S190A/L212M/I215M重组菌株。

[0041] 实施例2:天然 ω -转氨酶和其定点突变体的表达与纯化

[0042] 挑取转入表达宿主大肠杆菌BL21 (DE3) 的阳性单克隆于LB液体培养基(含30 μ g/mL 氨苄青霉素)生长8~10h,按5%接种量将种子发酵液接到LB液体培养基(含30 μ g/mL 氨苄青霉素);大肠杆菌在37 $^{\circ}$ C摇床培养2h,至OD₆₀₀=0.6左右,突变体Y32L/S190A/L212M/I215M重组菌株加入0.05mM终浓度的IPTG诱导胞外表达,并在15 $^{\circ}$ C摇床继续培养发酵24h后,将发酵液于4 $^{\circ}$ C、8000g离心10min除菌体,收集离心发酵上清液。在磁力搅拌子低速搅拌下,向突变体发酵上清液中缓慢加入60% (NH₄)₂SO₄,4 $^{\circ}$ C放置盐析过夜。4 $^{\circ}$ C、10000g离心20min,收集沉淀。用50mmol/L pH 5.3柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液复溶沉淀后,在50mmol/L pH 5.3柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中透析过夜,期间更换2-3次透析缓冲液,通过0.22 μ m膜过滤后制成上样样品。采用AKTA avant蛋白纯化仪进行重组蛋白的纯化,整个纯化过程温度控制为4 $^{\circ}$ C。阳离子交换色谱纯化步骤:(1)平衡:用5倍体积的50mmol/L pH 5.3柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液平衡强阳离子交换色谱柱;(2)上样:预先处理好的样品以1mL/min的流速上样;(3)洗脱:包括洗脱未吸附物质、杂蛋白和目的蛋白,流速1.0mL/min,洗脱液为含有1M NaCl的50mmol/L pH 5.3的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,进行线性洗脱,检测波长为280nm,分批收集含蔗糖异构酶酶活的洗脱液;洗脱过程只出现一个目的蛋白洗脱峰,后续测酶活及SDS-PAGE蛋白电泳发现,无论是野生型,还是突变体,峰顶收集的酶液为最纯的部分。如图3所示。

[0043] 实施例3:酶活分析方法

[0044] ω -转氨酶酶活测定方法参照Gao, S. (Gao, S., Su, Y., Zhao, L., Li, G., Zheng, G., 2017. Characterization of a (R)-selective amine transaminase from *Fusarium oxysporum*. *Process. Biochem.* 63, 130-136.)。

[0045] 取适量菌体上清液(或者纯化稀释酶液),加入500 μ L磷酸二氢钠/磷酸氢二钠缓冲液(100mM, pH7.0),该缓冲液中含有20mM (R)- α -phenethylamine (or (S)- α -phenethylamine), 20mM丙酮酸钠, 0.1mM pyridoxal 5'-phosphate (PLP), 混匀, 45 $^{\circ}$ C分别反应15min, 然后加入同等量的乙酸乙酯终止反应。测定反应前后溶液在254nm处的吸光度。

[0046] 在上述条件下,1分钟内催化1 μ mol相关酮类所需要的酶量,定义为一个酶活单位(U/ml)。通过 ΔA_{254} 计算 ω -转氨酶酶活。 $U/ml = (\Delta A/min) * (V*/rvb)$; $\Delta A/min$ -吸光度变化; V -反应体系体积(ml); r -摩尔消光系数($cm^2/\mu mol$); v -样品量(ml); b -比色杯光程(cm),上述用量可按比例增加或减少。

[0047] 经测定,天然酶对底物(R)- α -phenethylamine的粗酶活为1.1760U/mL,而对(S)- α -phenethylamine没有酶活;本发明的重组突变 ω -转氨酶则对(R)- α -phenethylamine (or (S)- α -phenethylamine)都没有活性。

[0048] 实施例4:突变体在西他沙星五元环关键中间体(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine生产中的应用

[0049] ω -转氨酶可以分为R- ω -转氨酶和S- ω -转氨酶,不同类型的 ω -转氨酶可以催化的底物类型不同,因此可以产生具有不同光学特性的产物。本实施例以(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine (或(R)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine)为氨

基供体,丙酮酸钠为氨基受体,检测所获得的重组酶及突变重组酶对其的催化能力,从而判断该酶是否可以特异性高效催化(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine,以确定其在西他沙星五元环关键中间体工业合成中的应用。

[0050] 手性合成催化实验:取适量纯化稀释酶液,加入500 μ L磷酸二氢钠/磷酸氢二钠缓冲液(100mM,pH7.0),该缓冲液中含有20mM(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine(或(R)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine),20mM丙酮酸钠,0.1mM pyridoxal 5'-phosphate(PLP),混匀,45 $^{\circ}$ C分别反应15min,然后加入同等量的乙酸乙酯终止反应。12,000 \times g离心1min,取上层有机相,0.22 μ m滤膜过滤,进行高效液相(HPLC)检测,检测产物为5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one。

[0051] 检测条件:

[0052] 柱子:Agilent C18 column(250*4.6mm,Agilent,USA);流动相:乙腈/水(95/5,v/v);流速:1mL/min;检测波长:220nm。

[0053] 表1

	对照样	试验样
[0054]	手性催化合成 天然 ω -转氨酶	ω -转氨酶 Y32L / S190A / L212M / I215M 突变体

[0055] 对照样:以(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine为底物,在上述反应条件下检测天然 ω -转氨酶对其的催化能力。

[0056] 试验样:以(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine为底物,在上述反应条件下检测 ω -转氨酶Y32L/S190A/L212M/I215M突变体对其的催化能力。

[0057] 数据表明该重组酶对实验组(以 ω -转氨酶Y32L/S190A/L212M/I215M突变体为催化剂)的催化活性优于对照组(以天然 ω -转氨酶为催化剂)。上述数据表明该重组 ω -转氨酶Y32L/S190A/L212M/I215M突变体具有高效选择性合成西他沙星五元环关键中间体的功能,有较大应用潜力(见表2)。

[0058] 表2

酶	(S)-5-benzyl-5-azaspiro [2.4] heptan-7-amine	(R)-5-benzyl-5-azaspiro [2.4] heptan-7-amine
	酶活(U/mg) ^a	酶活 (U/mg) ^a
[0059] 天然 ω -转氨酶	-	-
ω -转氨酶突变体 Y32L / S190A / L212M / I215M	32.2805	-

[0060] 酶活(U/mg):1分钟内催化1 μ mol相关酮类所需要的酶量,定义为一个酶活单位(U/mg)。

[0061] 实施例5: ω -转氨酶突变体的动力学参数测定

[0062] ω -转氨酶的动力学参数测定方法参照Gao,S.(Gao,S.,Su,Y.,Zhao,L.,Li,G.,Zheng,G.,2017.Characterization of a(R)-selective amine transaminase from *Fusarium oxysporum*.Process.Biochem.63,130-136.)。

[0063] 本实施例测定了实施例2纯化得到酶突变体Y32L/S190A/L212M/I215M(氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示)在45 $^{\circ}$ C下的动力学参数。具体实施方法为:取适量菌体上清液(或者

纯化稀释酶液),加入500 μ L磷酸二氢钠/磷酸氢二钠缓冲液(100mM,pH7.0),该缓冲液中含有不同浓度的(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine(具体浓度梯度参照上述文献),20mM丙酮酸钠,0.1mM pyridoxal 5'-phosphate (PLP),混匀,45 $^{\circ}$ C分别反应15min,然后加入同等量的乙酸乙酯终止反应。动力学研究的结果如表3所示。

[0064] 结果显示,突变体Y32L/S190A/L212M/I215M的 K_m 值为4.88mM。此外,Y32L/S190A/L212M/I215M的催化常数 K_{cat} 为3.1 min^{-1} 。突变体Y32L/S190A/L212M/I215M的催化效率 K_{cat}/K_m 为0.64 $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ 。

[0065] 如图1所示,Y32L/S190A/L212M/I215M处于 ω -转氨酶的催化中心和异构区域,突变可能会导致催化中心和异构区域的其他部分区域的结构扩大,使得更大的底物可以进入到催化中心,从而可能会对酶的底物特异性及动力学参数产生积极的影响。

[0066] 表3 ω -转氨酶突变体的动力学参数

	酶	转化率 (%)	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
[0067]	Y32L / S190A / L212M / I215M	79.02	4.88 \pm 0.20	3.1 \pm 0.29	0.64

[0068] 转化率是指将(S)-5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-amine变成5-benzyl-5-azaspiro[2.4]heptan-7-one的转化效率。

[0069] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 江南大学
 [0003] <120> 一种能催化西他沙星五元环关键中间体的 ω -转氨酶突变体
 [0004] <160> 9
 [0005] <170> PatentIn version 3.3
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 304
 [0008] <212> PRT
 [0009] <213> 人工序列
 [0010] <400> 1
 [0011] Met Glu Asp Gln Lys Glu Gln Trp Ile Phe Leu Asn Asp Glu Leu Val
 [0012] 1 5 10 15
 [0013] Lys Lys Glu Asp Ala Lys Ile Ser Val Tyr Asp His Gly Phe Leu Tyr
 [0014] 20 25 30
 [0015] Gly Asp Gly Val Phe Glu Gly Ile Arg Val Tyr Asn Gly Asn Ile Phe
 [0016] 35 40 45
 [0017] Arg Met Lys Glu His Leu Asp Arg Leu Tyr Asp Ser Ala Arg Ser Ile
 [0018] 50 55 60
 [0019] Met Leu Asn Ile Pro Tyr Ser Leu Glu Glu Leu Thr Glu Lys Met Ile
 [0020] 65 70 75 80
 [0021] His Thr Val Glu Arg Asn Gly Leu Lys Asp Ala Tyr Ile Arg Leu Val
 [0022] 85 90 95
 [0023] Val Ser Arg Gly Ala Gly Asp Leu Gly Leu Asp Pro Asn Asn Cys Gly
 [0024] 100 105 110
 [0025] Arg Ala Asn Thr Val Ile Ile Val Glu Pro Leu Ala Ile Phe Pro Lys
 [0026] 115 120 125
 [0027] His Leu Tyr Glu Thr Gly Ile Asp Ile Val Thr Val Pro Thr Arg Arg
 [0028] 130 135 140
 [0029] Asn Arg Pro Asp Val Leu Ser Pro Lys Val Lys Ser Leu Asn Tyr Leu
 [0030] 145 150 155 160
 [0031] Asn Asn Ile Leu Val Arg Ile Glu Ala His Met Ala Gly Val Ser Glu
 [0032] 165 170 175
 [0033] Ala Leu Met Leu Asn Asp Gln Gly Tyr Val Ala Glu Gly Ser Ala Asp
 [0034] 180 185 190
 [0035] Asn Val Phe Ile Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Thr Pro Pro Gly Tyr
 [0036] 195 200 205
 [0037] Ile Gly Ala Leu Glu Gly Ile Thr Arg Asn Ala Ile Met Glu Ile Ala
 [0038] 210 215 220

[0039]	Glu Asp Leu Gly Tyr Glu Val Lys Glu Glu Pro Phe Thr Arg His Asp			
[0040]	225	230	235	240
[0041]	Val Tyr Thr Ala Glu Glu Val Phe Leu Thr Gly Thr Ala Ala Glu Val			
[0042]		245	250	255
[0043]	Ile Ala Val Val Lys Val Asp Gly Arg Met Ile Gly Glu Gly Lys Pro			
[0044]		260	265	270
[0045]	Gly Phe His Thr Asn Lys Leu Leu Glu Gln Phe Arg Lys Arg Val Val			
[0046]		275	280	285
[0047]	Glu Glu Gly Glu Lys Val Val Phe Thr Asp Glu Asn Ile His Ala Ser			
[0048]		290	295	300
[0049]	<210> 2			
[0050]	<211> 915			
[0051]	<212> DNA			
[0052]	<213> 人工序列			
[0053]	<400> 2			
[0054]	atggaggatc agaaggaaca gtggatcttt ctgaacgatg agctggtgaa gaaggaagac	60		
[0055]	gcaaaaatct ctgtatacga ccatgggttc ttacttggcg atggggtcct cgaaggcatt	120		
[0056]	cgtgtctaca acggcaatat ctccgatg aaagaacatt tggaccgcct ttacgatagc	180		
[0057]	gcacgtagta ttatgttgaa tatcccgtat tcaactgaag agctgacaga aaagatgatt	240		
[0058]	cacacagttg agcgtaacgg tttgaaggat gcttacatcc gcttggctgt gtctcgcgga	300		
[0059]	gcgggcgact tgggattaga cccgaacaat tgtggctcgcg ccaatactgt tatcattggt	360		
[0060]	gaacctctgg caatctccc gaaacatttg tacgagaccg gcatcgacat tgtaacgggt	420		
[0061]	cccaccgcc gtaatcgtcc cgatgtcctt tcgccaaaag taaaatctct taattatctg	480		
[0062]	aacaacatcc ttgttcgcat tgaggccac atggcaggtg taagtgaagc gttaatgctt	540		
[0063]	aatgatcaag gatatgtagc cgaagggcg gctgataatg tttttatcta taaaaaggt	600		
[0064]	aaactgtaca ctccgccagg ttatattggc gcaatggagg gtatgaccgc caacgcaatt	660		
[0065]	atggagattg cggaagatct tgggtacgag gtcaaggaag agcctttcac gcgcatgac	720		
[0066]	gtctatacag cagaggaagt tttcttacc ggtacggctg ctgaggtcat cgcagttgta	780		
[0067]	aaggttgacg gacgcatgat tggcgaagga aagccggggt tccacactaa caaattactt	840		
[0068]	gaacaattcc gcaaacgct agtggaggag ggagagaagg ttgtctttac ggatgaaaat	900		
[0069]	atccatgcgt cgtaa	915		
[0070]	<210> 3			
[0071]	<211> 36			
[0072]	<212> DNA			
[0073]	<213> 人工序列			
[0074]	<400> 3			
[0075]	ttggcgcaat ggagggtatg acccgcaacg caatta	36		
[0076]	<210> 4			
[0077]	<211> 36			

[0078] <212> DNA
 [0079] <213> 人工序列
 [0080] <400> 4
 [0081] cgggtcatac cctccattgc gccaatataa cctggc 36
 [0082] <210> 5
 [0083] <211> 304
 [0084] <212> PRT
 [0085] <213> 人工序列
 [0086] <400> 5
 [0087] Met Glu Asp Gln Lys Glu Gln Trp Ile Phe Leu Asn Asp Glu Leu Val
 [0088] 1 5 10 15
 [0089] Lys Lys Glu Asp Ala Lys Ile Ser Val Tyr Asp His Gly Phe Leu Leu
 [0090] 20 25 30
 [0091] Gly Asp Gly Val Phe Glu Gly Ile Arg Val Tyr Asn Gly Asn Ile Phe
 [0092] 35 40 45
 [0093] Arg Met Lys Glu His Leu Asp Arg Leu Tyr Asp Ser Ala Arg Ser Ile
 [0094] 50 55 60
 [0095] Met Leu Asn Ile Pro Tyr Ser Leu Glu Glu Leu Thr Glu Lys Met Ile
 [0096] 65 70 75 80
 [0097] His Thr Val Glu Arg Asn Gly Leu Lys Asp Ala Tyr Ile Arg Leu Val
 [0098] 85 90 95
 [0099] Val Ser Arg Gly Ala Gly Asp Leu Gly Leu Asp Pro Asn Asn Cys Gly
 [0100] 100 105 110
 [0101] Arg Ala Asn Thr Val Ile Ile Val Glu Pro Leu Ala Ile Phe Pro Lys
 [0102] 115 120 125
 [0103] His Leu Tyr Glu Thr Gly Ile Asp Ile Val Thr Val Pro Thr Arg Arg
 [0104] 130 135 140
 [0105] Asn Arg Pro Asp Val Leu Ser Pro Lys Val Lys Ser Leu Asn Tyr Leu
 [0106] 145 150 155 160
 [0107] Asn Asn Ile Leu Val Arg Ile Glu Ala His Met Ala Gly Val Ser Glu
 [0108] 165 170 175
 [0109] Ala Leu Met Leu Asn Asp Gln Gly Tyr Val Ala Glu Gly Ala Ala Asp
 [0110] 180 185 190
 [0111] Asn Val Phe Ile Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Thr Pro Pro Gly Tyr
 [0112] 195 200 205
 [0113] Ile Gly Ala Met Glu Gly Met Thr Arg Asn Ala Ile Met Glu Ile Ala
 [0114] 210 215 220
 [0115] Glu Asp Leu Gly Tyr Glu Val Lys Glu Glu Pro Phe Thr Arg His Asp
 [0116] 225 230 235 240

[0117] Val Tyr Thr Ala Glu Glu Val Phe Leu Thr Gly Thr Ala Ala Glu Val
 [0118] 245 250 255
 [0119] Ile Ala Val Val Lys Val Asp Gly Arg Met Ile Gly Glu Gly Lys Pro
 [0120] 260 265 270
 [0121] Gly Phe His Thr Asn Lys Leu Leu Glu Gln Phe Arg Lys Arg Val Val
 [0122] 275 280 285
 [0123] Glu Glu Gly Glu Lys Val Val Phe Thr Asp Glu Asn Ile His Ala Ser
 [0124] 290 295 300
 [0125] <210> 6
 [0126] <211> 36
 [0127] <212> DNA
 [0128] <213> 人工序列
 [0129] <400> 6
 [0130] gtagccgaag gggcggctga taatgttttt atctat 36
 [0131] <210> 7
 [0132] <211> 36
 [0133] <212> DNA
 [0134] <213> 人工序列
 [0135] <400> 7
 [0136] cattatcagc cgccccttcg gctacatata cttgat 36
 [0137] <210> 8
 [0138] <211> 36
 [0139] <212> DNA
 [0140] <213> 人工序列
 [0141] <400> 8
 [0142] catgggttct tacttggcga tggggtcttc gaaggc 36
 [0143] <210> 9
 [0144] <211> 36
 [0145] <212> DNA
 [0146] <213> 人工序列
 [0147] <400> 9
 [0148] ccccatcgcc aagtaagaac ccatggtcgt atacag 36

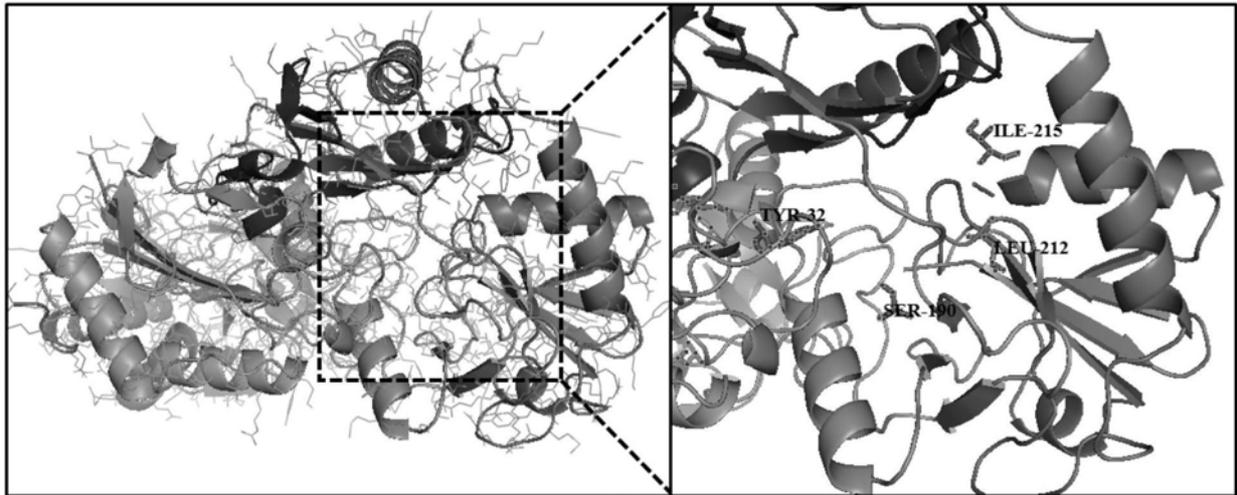


图1

5-benzyl-5-azaspiro [2.4] heptan-7-one

(S)-5-benzyl-5-azaspiro [2.4] heptan-7-amine

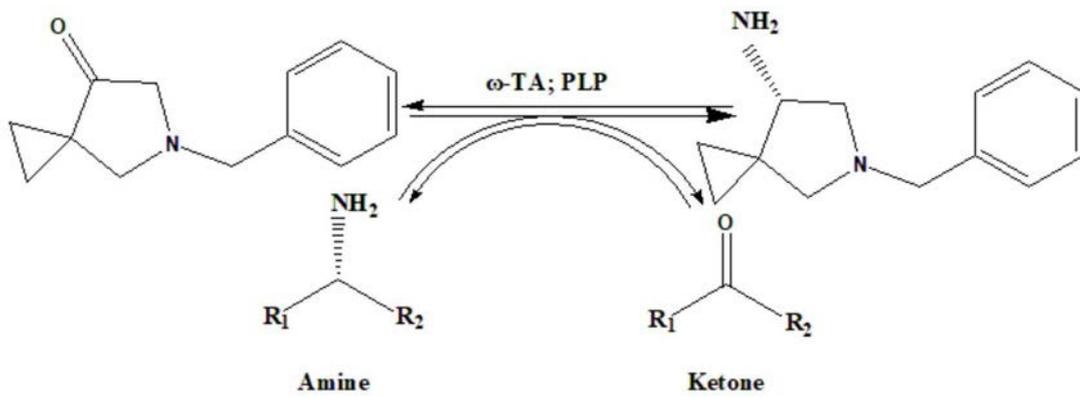


图2

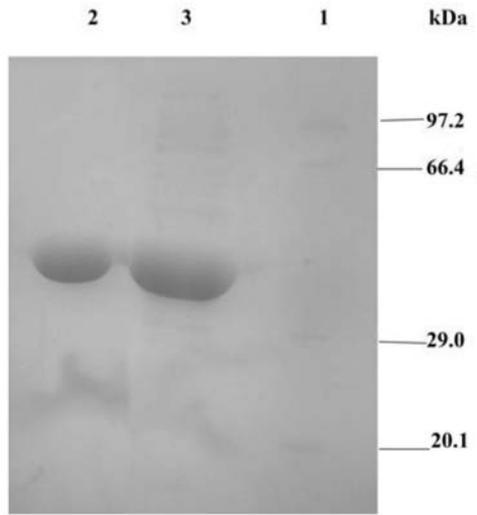


图3