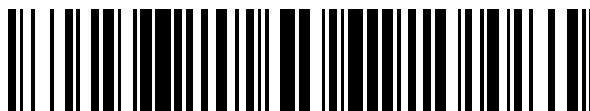


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 568**

51 Int. Cl.:

C07D 211/60 (2006.01)

C07D 498/08 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

C07B 61/00 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013** **PCT/JP2013/084097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14098188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013** **E 13864003 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 2889288**

54 Título: **Método para producir un derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico**

30 Prioridad:

20.12.2012 JP 2012278314

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.12.2018

73 Titular/es:

**API CORPORATION (100.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 1010047, JP**

72 Inventor/es:

**MAEDA, TOMOKO;
UEHARA, HISATOSHI;
SAITO, YASUYO y
MURAI, MASATO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 693 568 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PRODUCIR UN DERIVADO DE ÁCIDO CIS-5-HIDROXI-2-PIPERIDINCARBOXÍLICO, Y MÉTODO PARA PURIFICAR ÁCIDO CIS-5-HIDROXI-2-PIPERIDINCARBOXÍLICO

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un método industrial para producir un derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (que también se llama ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico). La presente invención también se refiere a un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] El ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico es un intermedio útil para productos farmacéuticos. Sin embargo, dado que este compuesto tiene 2 carbonos asimétricos, están presentes 4 tipos de isómeros, y la síntesis selectiva de un solo tipo de isómero, o tipo único de diastereómero, es muy difícil. Por lo tanto, es necesaria la mejora de la pureza por separación de los isómeros innecesarios o purificación por conversión química.

[0003] Por ejemplo, se han descrito métodos para obtener ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico mediante la introducción de un grupo hidroxilo en ácido 2-piperidincarboxílico por reacción de hidroxilación usando un microorganismo o enzima. Sin embargo, se ha descrito que un compuesto que tiene un grupo hidroxilo sustituido en otra posición, tal como un compuesto hidroxilado en la posición 3, se puede producir como un subproducto además del compuesto de interés, cis-5-hidroxi- Ácido 2-piperidincarboxílico (Documento no-patente 1). La separación del subproducto no se describe en el documento. También se ha descrito un procedimiento en el que se sintetiza ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico a partir de 5-hidroxilisina mediante reacción enzimática (Documento de Patente 1), pero el documento no describe la separación de los isómeros *cis/ trans* generados. En un informe que describe la síntesis de ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico a partir de 5-hidroxilisina por un método similar al método del Documento de Patente 1 (Documento de Patente 2), los isómeros se separan usando una columna de intercambio iónico. Dado que este método requiere el uso de cantidades excesivas de un relleno y eluyente con respecto al sustrato, el método no es realista desde el punto de vista de la producción industrial.

[0004] Por lo tanto, no existe un método conocido mediante el cual se pueda obtener selectivamente un estereoisómero necesario con ácido de cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de alta pureza sintetizado usando un microorganismo o enzima.

[0005] Se conocen métodos de síntesis química que utilizan, como material, L-aminoácido, en el que se puede fijar la estereoquímica de uno de los dos carbonos asimétricos, el carbono de posición 2. Por ejemplo, se ha reportado un método que usa ácido L-pirolglutámico como material (Documento de Patente 3). Este método requiere el uso de un catalizador de iridio, que es caro, para la formación de un anillo de piperidina, lo cual es problemático. También se han descrito métodos que utilizan ácido L-glutámico como material (documentos no-patente 2 y 3) y un método que utiliza un derivado de prolina como material (documento no-patente 4), pero todos estos métodos requieren el uso de un diazo-compuesto, que tiene un alto riesgo, y también requieren un proceso complejo de varios pasos. Además, para la separación del ácido (2S, 5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, la reacción se lleva a cabo a través del ácido 5-oxo-2-piperidincarboxílico para obtener preferentemente el compuesto (2S, 5S) por su reducción (Documento no-patente 4). Esto requiere separación usando una columna de gel de sílice para la eliminación de impurezas tales como isómeros. Debido a la carga de este proceso, este método no es industrialmente satisfactorio.

[0006] También se sabe que el ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil- 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y sus ésteres se lactonizan para dar bencilo (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato (documentos no-patente 4 y 5). Estos documentos sobre lactonización no mencionan las impurezas como los isómeros, y los efectos de la purificación por estos métodos no han sido claros. El documento no de patente 4 describe que se obtuvo (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo como una sustancia oleosa después de la purificación con una columna de gel de sílice. El Documento no-patente 5 describe que se produce la cristalización de (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo, pero dado que la lactonización se lleva a cabo utilizando ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico como un material, el comportamiento de las impurezas tales como los isómeros y el efecto de la purificación no están claros. Existe un informe que describe la separación de una mezcla *cis / trans* de N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de metilo por tratamiento con ácido (Documento no-patente 3), pero, dado que el compuesto era un éster de ácido carboxílico, era imposible para separar lactona obtenida del isómero *cis* del éster del isómero *trans* mediante un método simple tal como extracción con disolvente. Además, el Documento no-patente 3 no describe el rendimiento en este proceso. Cuando los presentes inventores estudiaron este método, el rendimiento de la lactona fue bajo debido a la aparición de una notable reacción secundaria entre lactona obtenida del isómero *cis* ((1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2. 2] octano-5-carboxilato de bencilo) y el isómero *trans* residual (éster del ácido (2S, 5R) -)-N-benciloxicarbonil- 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico).

[0007] Como se describió anteriormente, existen problemas para ser resueltos para la producción industrial de ácido altamente puro cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por un método económico.

DOCUMENTOS DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

[Documentos de patente]

[0008]

Documento de Patente 1: JP 4590981 B

Documento de Patente 2: JP 2010-88395 A

Documento de Patente 3: WO 2010 /126820

[Documentos no-patente]

[0009]

Documento no-patente 1: Adv.Synth.Catal., 2011, 353, 1375.

Documento no-patente 2: Chem. Commun., 1996, 349.

Documento no-patente 3: Tetrahedron Lett., 1988, 29, 2231.

Documento no-patente 4: Tetrahedron: Asym., 2006, 17, 2479.

Documento no-patente 5: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1959, 78, 648.

RESUMEN DE LA INVENCION

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

[0010] La presente invención tiene como objeto proporcionar un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, que es un intermedio útil para productos farmacéuticos, y un método para producir su derivado.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

[0011] Los presentes inventores estudiaron intensamente para resolver los problemas descritos anteriormente. Como resultado, los presentes inventores resolvieron los problemas mediante un proceso de reacción de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de baja pureza que contiene impurezas con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para inducir un derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, resolviendo así los problemas.

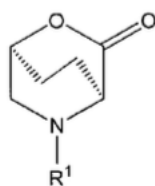
[0012] En un modo más específico, los presentes inventores descubrieron que las impurezas tales como los isómeros se pueden separar haciendo reaccionar el ácidocis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en una lactona cuyo grupo amino está protegido, y luego realizar la extracción de cristalización y / o disolvente. Es decir, los estudios de los presentes inventores revelaron que el derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en la presente invención se puede convertir selectivamente en lactona por reacción con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y que esta lactona se puede cristalizar bajo condiciones específicas. Los presentes inventores desarrollaron luego un método en el que la lactona se cristaliza para lograr la eliminación de impurezas tales como isómeros que tienen baja capacidad de cristalización.

[0013] En otro modo específico, los presentes inventores descubrieron que las impurezas tales como isómeros que tienen un grupo carboxilo se pueden eliminar por extracción con disolvente después de reaccionar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y luego con un alcohol en presencia de un catalizador ácido para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un éster cuyo grupo amino está protegido. Es decir, los presentes inventores estudiaron para desarrollar un método en el que, en presencia de un catalizador ácido, el derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se convierte selectivamente en lactona, y la lactona reacciona con un alcohol presente en el sistema de reacción para convertir eficientemente y selectivamente el isómero *cis* en un éster mientras se suprime una reacción secundaria, seguido por la eliminación de impurezas residuales tales como isómeros que tienen un grupo carboxilo por extracción con disolvente.

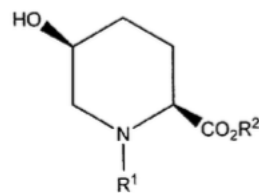
[0014] Los presentes inventores descubrieron entonces que se puede obtener ácido altamente puro-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico hidrolizando la lactona y / o éster resultante para dar ácido-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y luego retirando el grupo protector del grupo amino, completando así la presente invención.

[0015] Esto es, la presente invención se puede resumir de la siguiente manera, (donde R¹ representa un grupo

protector para un grupo amino, y R^2 representa un grupo alquilo $C_1 - C_6$).



(1)



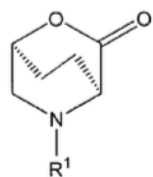
(2)

[1] Un método para producir derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, comprendiendo el método una etapa de reacción del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y/o anhídrido de ácido para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto (s) de Fórmula (1).

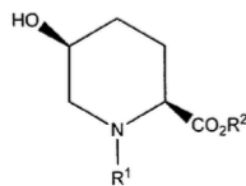
[2] Un método para producir el derivado del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que comprende una etapa de reacción del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y luego con un alcohol en presencia de un catalizador ácido, para convertir el ácido cis-5 hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto de Fórmula (2).

[3] Un método para regenerar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, comprendiendo el método los pasos de:

convertir ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y/o Fórmula (2) según los métodos mencionados arriba (en donde R^1 representa un grupo protector para un grupo amino, y R^2 representa un grupo alquilo $C_1 - C_6$); y
convertir el compuesto(s) de Fórmula (1) y/o Fórmula (2) en ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.



(1)



(2)

[4] El método para producir un derivado del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según cualquiera de [1] a [2], en el que el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico es ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico sintetizado por reacción bacteriana y / o reacción enzimática.

[5] El método para regenerar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según [3], en el que el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico es ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico sintetizado por reacción bacteriana y / o reacción enzimática.

[6]] Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, comprendiendo el método una etapa de hacer reaccionar una mezcla que contiene ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y una impureza con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, o con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido y un alcohol, para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2), separando el compuesto(s) y luego convirtiendo el (los) compuesto(s) separado(s) en ácido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[7] El método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de acuerdo con [6], en el que la impureza es ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo.

[8] El método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de acuerdo con [7], en el que el ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo es ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[9] El método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de acuerdo con uno cualquiera de [6] a [8], en el que la etapa de separar el (los) compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2) se lleva a cabo por cristalización o extracción por disolvente.

[10]] El método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según cualquiera de [6] a [9], en el que la mezcla que contiene ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y una impureza es una mezcla sintetizada por reacción bacteriana y / o reacción enzimática.

EFFECTO DE LA INVENCION

[0016] Mediante el método de la presente invención, se puede proporcionar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico altamente puro y sus derivados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0017]**

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra las rutas para purificar el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico a partir del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que puede contener una impureza(s). La ruta 1 es una ruta en la que el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hace reaccionar con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para dar un compuesto de Fórmula (1) directamente o vía ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y el compuesto se convierte a continuación en ácido 5 - hidroxi-2-piperidincarboxílico. La ruta 2 es una ruta en la que el ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hace reaccionar con un catalizador ácido para dar un compuesto de Fórmula (1), y el compuesto se convierte luego en ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por hidrólisis. La ruta 3 es una ruta en la que el ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hace reaccionar con un alcohol en presencia de un catalizador ácido para dar un compuesto de Fórmula (2), y el compuesto se convierte luego en ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por hidrólisis.

La Fig.2. es un diagrama que muestra el resultado del análisis por HPLC de hidroxilisinas obtenidas con lisina hidroxilasas recombinantes.

La Fig. 3 es un diagrama que muestra el resultado del análisis por HPLC de hidroxilisinas obtenidas con lisina hidroxilasas recombinantes.

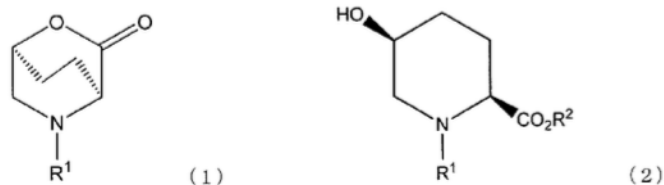
20

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[0018] La presente invención se describe a continuación en detalle.

25 **[0019]** En la presente invención, los ejemplos del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico incluyen ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, ácido (2R,5R) -5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y mezclas de éstos. El ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede ser un compuesto racémico. El ácido cis-5-hydroxy-2-piperidincarboxílico puede estar formando una sal con un ácido o base.

30 **[0020]** El método para producir el derivado del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de la presente invención comprende una etapa de conversión del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2)



35 **[0021]** En la Fórmula (1) y la Fórmula (2), R^1 representa un grupo protector para un grupo amino, y los ejemplos específicos del grupo protector incluyen los siguientes grupos. Sin embargo, el grupo protector no está limitado a estos ejemplos.

40 **[0022]** Ejemplos del grupo protector para el grupo amino incluyen grupos acilo tales como formilo, acetilo, cloroacetilo, dicloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, propionilo, benzoilo y 4-clorobenzoilo; grupos alcóxicarbonilo tales como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, terc-butoxicarbonilo, benciloxycarbonilo y aliloxycarbonilo; grupos arilalquilo tales como bencilo, 4-metoxibencilo, 4-bromobencilo y 1-fenetilo; y grupos sulfonilo tales como metanosulfonilo, p-toluenosulfonilo y 2-nitrobenzenosulfonilo.

45 **[0023]** Entre éstos, se prefieren los grupos acilo y los grupos alcóxicarbonilo ya que estos grupos se pueden eliminar fácilmente; acetilo, cloroacetilo, trifluoroacetilo, benzoilo, terc-butoxicarbonilo y benciloxycarbonilo son más preferidos; y acetilo, terc-butoxicarbonilo y benciloxycarbonilo son aún más preferidos dado que estos son industrialmente económicos. Como grupo protector es especialmente preferible benciloxycarbonilo ya que el benciloxycarbonilo puede eliminarse por hidrogenación sin dejar un componente no volátil, y la carga de purificación del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede, por lo tanto, reducirse.

[0024] En la Fórmula (2), R^2 representa un alquilo C_1-C_6 , y los ejemplos específicos de R^2 incluyen grupos alquilo primarios tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo; grupos alquilo secundarios tales como isopropilo, isobutilo, isopentilo, ciclopentilo y ciclohexilo; y grupos alquilo terciarios tales como terc-butilo. Entre estos, se

prefieren metilo, etilo, isopropilo, butilo y terc-butilo, y son más preferidos el etilo y el isopropilo.

[0025] En la presente invención, el derivado del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede ser el (los) compuesto(s) de la Fórmula (1) y / o la Fórmula (2) en sí mismo(s).

[0026] Los ejemplos específicos del compuesto de Fórmula (1) incluyen bencilo 5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato, terc-butil 5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato y 5-acetil-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano.

[0027] Los ejemplos específicos del compuesto de Fórmula (2) incluyen metil *cis*-N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato, etil *cis*-N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato, isopropil *cis*-N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato, metil *cis*-N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato, etil *cis*-N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato, e isopropil *cis*-N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato.

[0028] El derivado del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede ser un compuesto obtenido por conversión química de un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2).

[0029] Los ejemplos específicos de tales derivados del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico incluyen ácidos carboxílicos tales como *cis*-N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido *cis*-N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico; ésteres tales como N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de bencilo y N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de bencilo; amidas de ácido carboxílico tales como amida del ácido *cis*-N-(benciloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, amida del ácido *cis*-N-(terc-butiloxicarbonil)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, *cis*-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de bencilo, *cis*-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo, *cis*-2-(1-terc-butiloxicarbamoilpirrolidina-3-ilcarbamoil)-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de bencilo, *cis*-2-(1-terc-butiloxicarbamoilpirrolidina-3-ilcarbamoil)-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo, *cis*-2-(1-benciloxicarbamoilpirrolidina-3-ilcarbamoil)-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de bencilo, *cis*-2-(1-terc-butiloxicarbamoilpiperidin-4-ilcarbamoil)-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de bencilo, y *cis*-2-(1-benciloxicarbamoilpiperidin-4-ilcarbamoil)-5-hidroxi-2-(metilcarbamoil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo.

[0030] En un modo del método de la presente invención, el ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hace reaccionar con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para proteger el grupo amino del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y la posterior lactonización del resultante provoca su conversión en un compuesto de Fórmula (1).

[0031] El haluro de ácido y / o anhídrido de ácido no está limitado siempre que el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido pueda proteger el grupo amino y permita la lactonización. Los ejemplos del haluro de ácido incluyen cloruros de ácido y bromuros de ácido. En vista de la facilidad de manejo, se prefieren los cloruros de ácido. Los ejemplos del anhídrido de ácido incluyen anhídridos de ácido carboxílico y anhídridos de ácido sulfónico. En vista de la facilidad de manejo y el costo, se prefieren los anhídridos de ácido carboxílico.

[0032] Ejemplos específicos del haluro de ácido y / o anhídrido de ácido incluyen agentes de acilación tales como ácido fórmico-anhídrido acético, anhídrido acético, cloruro de acetilo, cloruro de cloroacetilo, cloruro de dicloroacetilo, cloruro de tricloroacetilo, anhídrido trifluoroacético, cloruro de propionilo, cloruro de benzoilo, cloruro de 4-clorobenzoilo, bromuro de acetilo, bromuro de propionilo y bromuro de benzoilo; agentes alcoxycarbonilantes tales como di-terc-butildicarbonato, cloruro de benciloxicarbonilo, cloruro de aliloxicarbonilo, bromuro de benciloxicarbonilo y bromuro de aliloxicarbonilo; y agentes sulfonilantes tales como cloruro de metanosulfonilo, cloruro de p-toluenosulfonilo, cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo, bromuro de metanosulfonilo, bromuro de p-toluenosulfonilo y bromuro de 2-nitrobenzenosulfonilo.

[0033] Entre estos, se prefieren los agentes acilantes y los agentes alcoxycarbonilantes. Son más preferidos el anhídrido acético, el cloruro de cloroacetilo, el cloruro de tricloroacetilo, el anhídrido trifluoroacético, el di-terc-butildicarbonato, el cloruro de benciloxicarbonilo y el cloruro de aliloxicarbonilo, ya que estos pueden eliminarse fácilmente después de la protección del grupo amino. El anhídrido acético, el di-terc-butildicarbonato y el cloruro de benciloxicarbonilo son aún más preferidos ya que estos son industrialmente económicos. El cloruro de benciloxicarbonilo es especialmente preferido ya que se puede eliminar por hidrogenación sin dejar un componente no volátil, y la carga de purificación del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede por lo tanto reducirse.

[0034] En la presente invención, se pueden usar dos o más tipos de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido. En los casos en que se usan dos o más clases de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, estos pueden agregarse al sistema de reacción de una vez, pero se prefiere usar diferentes tipos de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para cada proceso. de la protección del grupo amino y el proceso de lactonización. Por ejemplo, se prefiere llevar a cabo un método en el que se use cloruro de benciloxicarbonilo para la protección del grupo amino, y se use anhídrido acético para la lactonización. En los casos en que la protección del grupo amino y la lactonización se llevan a cabo en un único reactor, se usa preferiblemente un solo tipo de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para la supresión de subproductos que tienen diferentes grupos protectores. En los casos en que la protección del grupo amino y la lactonización se llevan a cabo en reactores separados, se usan preferiblemente dos o más tipos de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido a la vista de la optimización de las reacciones y la reducción de costes. En particular, la protección del grupo amino y la lactonización se llevan a cabo preferiblemente en un solo reactor ya que se puede disminuir el número de reactores requeridos para la producción y, por lo tanto, se puede reducir el

coste.

[0035] La cantidad de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido a usar es usualmente de 1 a 10 equivalentes molares, preferiblemente de 1,2 a 5 equivalentes molares, más preferiblemente de 1,5 a 3 equivalentes molares relativos a la cantidad total de ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y el compuesto de amina a proteger. El haluro de ácido y / o el anhídrido de ácido se pueden agregar divididos en una pluralidad de veces.

[0036] En la reacción con el haluro de ácido y / o el anhídrido de ácido, se puede usar una base, si es necesario. Los ejemplos específicos de la base incluyen, pero sin limitación, aminas terciarias tales como trietilamina, diisopropilamina, N-metilmorfolina, quinuclidina y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano; piridinas tales como piridina, 4-dimetilaminopiridina y 2,6-lutidina; bases fuertes orgánicas tales como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno y tetrametilguanidina; amidas metálicas tales como diisopropilamida de litio y hexametildisilazida de sodio; metales alquílicos tales como *n*-butil-litio, *sec*-butil-litio, *terc*-butil-litio, y bromuro de isopropilmagnesio; hidruros metálicos tales como hidruro de sodio e hidruro de calcio; alcóxidos metálicos tales como metóxido de sodio, etóxido de sodio, *terc*-butóxido de sodio y *terc*-butóxido de potasio; carbonatos tales como hidrogenocarbonato de sodio y carbonato de potasio; fosfatos tales como fosfato de potasio e hidrogenofosfato de sodio; hidróxidos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio e hidróxido de calcio; y cianuros tales como cianuro de sodio y cianuro de potasio.

[0037] Las bases preferidas varían dependiendo del reactivo protector que se utilizará. En los casos en los que se usa un reactivo protector preferido, es decir, anhídrido acético, di-*terc*-butildicarbonato o cloruro de benciloxycarbonilo, la base es preferiblemente aminas terciarias, piridinas, carbonatos o hidróxidos. En los casos en los que se usa el reactivo protector especialmente preferido, es decir, cloruro de benciloxycarbonilo, la base es preferiblemente un hidróxido, que es económico.

[0038] En los casos en los que se usa una base, la cantidad de base se agrega preferiblemente de manera que el pH de la mezcla de reacción llegue a 7 a 12. En los casos en que se usa agua como disolvente, el pH de la mezcla de reacción en la presente memoria significa el pH de la capa que contiene agua. En los casos en los que se usa un disolvente que no sea agua, el pH de la mezcla de reacción en la presente memoria significa el pH de la capa que contiene agua cuando se agrega un volumen igual de agua a la mezcla de reacción. En los casos en que se usa agua como disolvente, puede producirse la hidrólisis del compuesto de Fórmula (1) cuando la basicidad de la mezcla de reacción es demasiado fuerte. El pH es por lo tanto más preferiblemente de 7 a 12, especialmente preferible de 7 a 11.

[0039] Los ejemplos del disolvente de reacción incluyen agua; ésteres tales como acetato de etilo y acetato de butilo; alcoholes tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-etil-1-hexanol y 2-butanol; éteres tales como dietil éter, di-*n*-butil éter, diisopropil éter, di-*n*-butil éter, *terc*-butil metil éter, tetrahydrofurano y dioxano; cetonas tales como acetona, metil etil cetona y metil isobutil cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; amidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida y N-metilpirrolidinona; sulfonas tales como dimetilsulfóxido y sulfolano; hidrocarburos tales como hexano, heptano y tolueno; y disolventes mixtos de dos o más de estos. Entre estos, se prefieren el agua y los disolventes mixtos que contienen agua y uno o más de los disolventes anteriores. En particular, en casos en los que el ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se sintetiza por reacción bacteriana y / o reacción enzimática, se obtiene ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico como una solución cuyo disolvente es principalmente agua. Por lo tanto, en vista de la simplicidad del proceso de producción, se prefiere usar la solución tal como está, o concentrar parte de la solución, para llevar a cabo la reacción usando agua como disolvente principal.

[0040] La temperatura de reacción es usualmente de -20°C a 100°C, preferiblemente de -10°C a 50°C. Dado que la reacción a alta temperatura puede causar la descomposición de reactivos y productos, la temperatura de reacción es más preferiblemente de 0°C a 30°C.

[0041] La protección del grupo amino y la lactonización se llevan a cabo preferiblemente añadiendo un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido (la ruta 1 en la Fig.1). Se prefiere especialmente llevar a cabo la protección del grupo amino y la lactonización usando un solo haluro de ácido y / o anhídrido de ácido en un solo reactor en vista de la simplicidad de la operación (la fórmula superior en la ruta 1 en la fig. 1).

[0042] La protección del grupo amino y la lactonización también pueden llevarse a cabo bajo diferentes condiciones (la ruta 2 en la Fig. 1). Es decir, el grupo amino puede protegerse mediante la adición del haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y luego puede usarse un catalizador ácido para realizar la lactonización. En los casos en que la protección del grupo amino y la lactonización se llevan a cabo en diferentes condiciones de reacción, se prefiere suprimir la producción del compuesto de Fórmula (1) en la etapa de protección del grupo amino. La protección del grupo amino se puede llevar a cabo de forma selectiva y efectiva usando el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido en la misma cantidad molar que la del grupo amino, o añadiendo el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido dividido de forma tal que se evita la presencia del haluro de ácido y / o anhídrido de ácido con respecto al grupo amino, y luego se detiene la reacción cuando el material ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico casi ha desaparecido. En casos donde la protección del grupo amino se lleva a cabo en un disolvente que contiene agua, el compuesto de Fórmula (1) generado por lactonización, si lo hay, puede hidrolizarse por un método tal como hacer que el pH de la mezcla de reacción sea fuertemente básico. aumentar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura no inferior a la temperatura ambiente, realizar la reacción durante un tiempo prolongado, o una combinación de uno

o más de estos métodos, y, como resultado, se puede obtener el compuesto protegido con amino. Al reaccionar subsiguientemente el compuesto amino protegido con un catalizador ácido, se puede obtener el compuesto de Fórmula (1).

[0043] El compuesto de Fórmula (1) producido se puede aislar mediante un método tal como la cristalización descrita más abajo.

[0044] En otro modo del método de la presente invención, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hace reaccionar con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y luego con un alcohol en presencia de un catalizador ácido, para convertir el ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto de Fórmula (2) (la ruta 3 en la Fig.1). Mediante la reacción con un alcohol en presencia de un catalizador ácido, el compuesto de Fórmula (1) producido por la reacción con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido se convierte en el compuesto de Fórmula (2). En este proceso, en los casos en que los compuestos que tienen un grupo carboxilo distinto del compuesto de Fórmula (1), especialmente el ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo descrito más adelante, están contenidos como impurezas, estos compuestos no se convierten en lactona como el compuesto de Fórmula (1). Por lo tanto, el compuesto derivado del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se puede convertir selectivamente en el compuesto de Fórmula (2), que es un éster, mientras que los otros compuestos se dejan en el sistema de reacción como ácidos carboxílicos. A continuación, mediante extracción con una solución acuosa básica, el compuesto de Fórmula (2) se puede separar en la capa orgánica, mientras que las impurezas distintas del compuesto de Fórmula (2) se pueden separar en la capa acuosa.

[0045] El alcohol aquí no está limitado siempre que sea un alcohol C₁- C₆. Los ejemplos del alcohol incluyen alcoholes primarios tales como metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol y 1-hexanol; alcoholes secundarios tales como 2-propanol, 2-butanol, ciclopentanol y ciclohexanol; y alcoholes terciarios tales como *terc*-butanol. Entre estos, se prefieren los alcoholes secundarios, y el 2-propanol es más preferido ya que es barato, tiene un punto de ebullición bajo, y puede eliminarse fácilmente. En los casos en los que se usa un alcohol primario, puede producirse una reacción secundaria para provocar la conversión directa de un ácido carboxílico en su éster en presencia de un catalizador ácido, dando como resultado un bajo efecto de eliminación de impurezas. En los casos en que se usa un alcohol terciario, la reactividad con el compuesto de Fórmula (1) es baja. Por lo tanto, el compuesto de Fórmula (2), que es un alcohol secundario, puede reaccionar con el compuesto de Fórmula (1) para formar parcialmente un dímero, dando como resultado un bajo rendimiento del compuesto de Fórmula (2). Por lo tanto, en la presente invención, se usa preferiblemente un alcohol secundario.

[0046] Se puede añadir un éster del alcohol descrito anteriormente en presencia de un catalizador ácido y agua de manera que la reacción de hidrólisis del éster permita que el alcohol esté presente en el sistema de reacción, y el alcohol puede reaccionar con el ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en presencia de un catalizador ácido.

[0047] El alcohol, o el éster que genera el alcohol, se puede usar en una cantidad en exceso, y la cantidad molar del alcohol o éster que se utilizará es generalmente de 1 a 500 veces la cantidad molar de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. En los casos en que la cantidad de alcohol o éster es demasiado pequeña, puede producirse una reacción secundaria en la que el compuesto de Fórmula (2) reacciona con el compuesto de Fórmula (1) para formar un dímero, mientras que en los casos en que la cantidad del alcohol o el éster es demasiado grande, el efecto del catalizador ácido disminuye. Por lo tanto, la cantidad molar del alcohol o éster es preferiblemente de 2 a 100 veces, más preferiblemente de 3 a 50 veces, especialmente preferiblemente de 5 a 20 veces la cantidad molar de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0048] Los ejemplos del catalizador ácido incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido polifosfórico; ácidos sulfónicos tales como ácido asp-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico y ácido trifluorometanosulfónico; y ácidos carboxílicos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético, ácido benzoico y ácido oxálico. Entre estos, se prefieren los ácidos sulfónicos ya que tienen una alta solubilidad en disolventes orgánicos y una acidez suficientemente fuerte para permitir que tenga lugar la reacción. El ácido *p*-Toluenosulfónico y el ácido metanosulfónico son más preferidos ya que son industrialmente económicos.

[0049] La cantidad molar del catalizador ácido a añadir es habitualmente de 0,001 a 10 veces la cantidad molar del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. En los casos en que la cantidad molar del catalizador ácido es demasiado pequeña, la reacción avanza lentamente, mientras que la cantidad molar del catalizador ácido es demasiado grande, la carga del post-tratamiento es grande. La cantidad molar del catalizador ácido es por lo tanto preferiblemente de 0,01 a 5 veces, más preferiblemente de 0,02 a 1 veces, especialmente preferiblemente de 0,05 a 0,5 veces la cantidad molar de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0050] Los ejemplos del disolvente de reacción incluyen ácidos orgánicos tales como ácido fórmico y ácido acético; ésteres tales como acetato de etilo y acetato de butilo; alcoholes tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-etil-1-hexanol y 2-butanol; éteres tales como dietil éter, di-*n*-butil éter, diisopropil éter, di-*n*-butil éter, *terc*-butil metil éter, tetrahidrofurano y dioxano; cetonas tales como acetona, metil etil cetona y metil isobutil cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; amidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida y N-metilpirrolidinona; sulfonas tales como dimetilsulfóxido y sulfolano; hidrocarburos tales como hexano, heptano y tolueno; y disolventes mixtos de dos o más de estos. Entre estos, se prefieren los disolventes que no muestran coordinación de un protón ya que no

debilitan la actividad del catalizador ácido. Más específicamente, se prefieren los hidrocarburos. Además, se prefieren los ácidos orgánicos, que a su vez son ácidos y ésteres, que producen ácidos por hidrólisis. El tolueno es más preferido debido a su bajo coste, alta velocidad de reacción y alta solubilidad de los catalizadores ácidos en el mismo.

- 5 **[0051]** La temperatura de reacción es usualmente de 0°C a 150°C, preferiblemente de 20°C a 120°C. La reacción a una temperatura más alta puede causar una reacción secundaria, pero la reacción a una temperatura más baja es lenta y lleva mucho tiempo. La temperatura de reacción es, por lo tanto, más preferiblemente de 40°C a 80°C.

[0052] El compuesto de Fórmula (2) generado se puede aislar mediante un método tal como el método de extracción usando un disolvente orgánico descrito más adelante.

- 10 **[0053]** Los compuestos de Fórmulas (1) y (2) se pueden convertir en ácido *cis-N*-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por tratamiento con una base.

[0054] Los ejemplos de la base que se usará aquí incluyen hidróxidos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio e hidróxido de calcio; fosfatos tales como fosfato de sodio, fosfato de potasio y fosfato de calcio; carbonatos tales como carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de magnesio y carbonato de calcio; e hidrogenocarbonatos tales como hidrogenocarbonato de sodio e hidrogenocarbonato de potasio. La base es preferiblemente un hidróxido.

- 15 **[0055]** La cantidad molar de la base a usar es usualmente de 0,1 a 10 veces, preferiblemente de 0,5 a 5 veces, más preferiblemente de 0,9 a 3 veces la cantidad molar total de los compuestos de Fórmulas (1) y (2).

- 20 **[0056]** Al llevar a cabo la desprotección del grupo amino del ácido *cis-N*-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, se puede producir ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (ácido *cis*-5-hidroxipecólico). En particular, en los casos donde R¹ en las Fórmulas (1) y (2) es un grupo benciloxicarbonilo, la desprotección del grupo amino se puede llevar a cabo mediante reacción de hidrogenación. La reacción de hidrogenación se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando un catalizador de paladio-carbono. Mediante tal reacción, se puede regenerar el ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0057] El método para purificar ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de la presente invención es un método en el que se obtiene ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico altamente puro por purificación del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que contiene una impureza(s).

- 30 **[0058]** Los ejemplos de impureza incluyen ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo, aminoácidos, péptidos, azúcares y ácidos grasos. Dado que, entre estos, el ácido 2-piperidincarboxílico o uno de sus análogos, los aminoácidos y los péptidos tienen un(os) grupo(s) amino(s) y grupo(s) carboxilo, estos pueden separarse apenas del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico deseado de interés mediante un método de purificación ordinario tal como la purificación de resina de intercambio iónico. En particular, dado que el ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo tiene el mismo esqueleto ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, su separación es muy difícil, y el establecimiento del proceso de eliminación es muy importante.

- 35 **[0059]** Los ejemplos del ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo incluyen isómeros del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico; y ácido 2-piperidincarboxílico y análogos de los mismos. Los ejemplos de los isómeros del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico incluyen estereoisómeros tales como isómeros *trans*, e isómeros estructurales que tienen grupos hidroxilo en diferentes posiciones. Debe observarse que los isómeros ópticos del ácido *cis*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico no están incluidos en la impureza de la presente invención.

- 40 **[0060]** Los ejemplos de los isómeros *trans* incluyen ácido *trans*-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, es decir, ácido (2*S*, 5*R*)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, ácido (2*R*, 5*S*)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y mezclas de estos. Los ejemplos de los isómeros estructurales incluyen ácido *cis*-2-hidroxi-2-piperidincarboxílico, ácido *trans*-2-hidroxi-2-piperidincarboxílico, ácido *cis*-3-hidroxi-2-piperidincarboxílico, ácido *trans*-3-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y ácido *trans*-4-hidroxi-2-piperidincarboxílico. Debe observarse que el ácido *cis*-4-hidroxi-2-piperidincarboxílico no está incluido en la impureza de la presente invención.

[0061] Los ejemplos del ácido 2-piperidincarboxílico y sus análogos incluyen ácido 2-piperidincarboxílico y ácido 1,2,3,4-tetrahidro-2-piridincarboxílico.

- 50 **[0062]** Los ejemplos de los aminoácidos incluyen aminoácidos esenciales tales como prolina, lisina e isoleucina, y aminoácidos no naturales tales como 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

[0063] Los ejemplos de los péptidos incluyen dipéptidos, oligopéptidos y proteínas.

[0064] Los ejemplos de azúcares incluyen glucosa, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de potasio y gluconato de calcio.

- 55 **[0065]** Los ejemplos de ácidos grasos incluyen ácidos grasos de cadena corta C₂-C₄, ácidos grasos de cadena media C₅-C₁₂, ácidos grasos de cadena larga que tienen no menos de 13 átomos de carbono y ésteres de glicerol.

[0066] Una mezcla que contiene ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y una impureza(s) se hace reaccionar con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, o con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido y un alcohol, para convertir el ácido cis-5 hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2). Posteriormente, el (los) compuesto(s) se separan por cristalización, extracción con disolvente y / o similares y luego se tratan con una base para convertir el (los) compuesto(s) en ácido cis-*N*-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. Al realizar posteriormente la desprotección del grupo amino, se puede obtener ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en el que se ha eliminado la impureza.

[0067] Es decir, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede separarse de la impureza utilizando la lactonización específica del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. Incluso en los casos en los que está contenida la impureza distinta de las impurezas descritas anteriormente, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico puede separarse también de la impureza.

[0068] En la presente descripción, la cristalización incluye no solo la cristalización ordinaria añadiendo un disolvente pobre, ácido, base o similar a una solución, o eliminando azeotrópicamente un buen disolvente tal como agua, para disminuir la solubilidad del producto deseado y recuperar el producto como cristales; pero también recristalización en la que los cristales brutos que se han obtenido una vez se disuelven en un disolvente apropiado y luego se recristalizan. La cristalización puede promoverse mediante la adición de cristales de siembra a la solución.

[0069] En la cristalización del compuesto de Fórmula (1), la cristalización se lleva a cabo preferiblemente para un producto en bruto del compuesto de Fórmula (1) obtenido mediante la reacción con el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido. Esto se debe a que una pequeña cantidad de componente(s) ácido(s) generado(s) a partir del haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y / u otros componentes derivados de reactivos, puede permanecer para inducir la cristalización.

[0070] Los ejemplos del disolvente de cristalización para el tratamiento de cristalización incluyen agua; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; ésteres tales como acetato de etilo, acetato de isopropilo y acetato de butilo; alcoholes tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-etil-1-hexanol y 2-butanol; éteres tales como dietil éter, di-*n*-butil éter, diisopropil éter, metil-terc-butil éter, di-*n*-butil éter, tetrahidrofurano y dioxano; cetonas tales como acetona, metil etil cetona y metil isobutil cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; hidrocarburos aromáticos tales como tolueno y xileno; y disolventes mixtos de dos o más de estos. Entre estos, se prefieren alcoholes, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y disolventes mixtos de dos o más de estos ya que la solubilidad del (de los) compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2) en estos disolventes es suficientemente baja. Los hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y disolventes mixtos de dos o más de estos son más preferidos, y se prefieren especialmente hexano, heptano, tolueno y disolventes mixtos de dos o más de estos.

[0071] Los ejemplos del disolvente orgánico que se usará para la extracción incluyen disolventes insolubles en agua, por ejemplo, ésteres tales como acetato de etilo, acetato de isopropilo y acetato de butilo; éteres tales como dietil éter, metil-terc-butil éter, di-*n*-butil éter, diisopropil éter, di-*n*-butil éter, terc-butil metil éter y tetrahidrofurano; hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; e hidrocarburos aromáticos tales como tolueno y xileno.

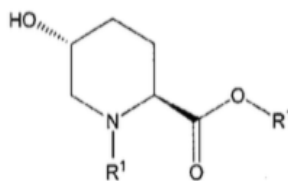
[0072] El método descrito anteriormente es especialmente útil en casos en los que el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se purifica a partir de una mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0073] Es decir, en un modo del método de purificación de la presente invención (la ruta 1 o la ruta 2 en la figura 1), una mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se hizo reaccionar con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en el compuesto de Fórmula (1).

El compuesto resultante se separa a continuación por cristalización y / o extracción con un disolvente orgánico, y luego se trata con una base para convertir el compuesto en ácido-*N*-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. Mediante la posterior desprotección del grupo amino, se puede obtener el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico separado del isómero trans.

[0074] En tales casos, el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido se usa preferiblemente en una cantidad excesiva por encima de 1 equivalente molar en relación con la cantidad total de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y el ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. La cantidad de haluro de ácido y / o anhídrido de ácido es usualmente de 1 a 10 equivalentes molares, preferiblemente de 1,2 a 5 equivalentes molares, más preferiblemente de 1,5 a 3 equivalentes molares. En los casos en que se usan tanto un haluro de ácido como un anhídrido de ácido, éstos se agregan de manera que su cantidad total exceda 1 equivalente molar relativo a la cantidad total de ácidocis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2 -piperidincarboxílico.

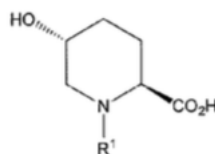
[0075] Mediante la reacción con el haluro de ácido y / o el anhídrido de ácido, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se convierte en el compuesto de Fórmula (1). Por otro lado, el ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico permanece en el sistema de reacción sin convertirse, o se convierte en el anhídrido de ácido mixto del ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico descrito a continuación. Este anhídrido de ácido mixto puede convertirse nuevamente en ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por tratamiento posterior. Por lo tanto, es posible su separación por reacción de cristalización.



[0076] En otro modo del método de purificación de la presente invención (la ruta 3 en la Fig. 1), se hace reaccionar una mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para proteger el grupo amino. Posteriormente, el ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico generado se hace reaccionar con un alcohol (o un éster que genera un alcohol) en presencia de un catalizador ácido para permitir la conversión en el compuesto de Fórmula (2) vía el compuesto de Fórmula (1). El compuesto resultante se separa por extracción con un disolvente orgánico, y luego se trata con una base para permitir la conversión en ácido cis-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico. Mediante la posterior desprotección del grupo amino, se puede obtener el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico separado del isómero trans.

[0077] En tales casos, el haluro de ácido y / o el anhídrido de ácido se usan preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1 equivalente molar en relación con la cantidad total de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y el ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0078] Al realizar la reacción con el haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para proteger el grupo amino, y luego con el alcohol (o éster que genera un alcohol) en presencia del catalizador ácido, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se convierte en el compuesto de Fórmula (2), mientras que el ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se convierte en el ácido trans-N-protegido-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico descrito a continuación. Por lo tanto, su separación es posible por extracción con un solvente orgánico.



[0079] El "ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que contiene una impureza(s)" y la "mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico" pueden ser aquellos sintetizados por reacción bacteriana y / o reacción enzimática. Por ejemplo, mediante el método descrito en el Ejemplo 29 de JP 4590981 B, se puede obtener una "mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico". El "ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que contiene una impureza(s)" y la "mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico" también pueden ser productos recuperados después de la separación de derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico por el método de la presente invención.

[0080] En casos en los que el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico se purifica mediante el método de la presente invención a partir del "ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que contiene una(s) impureza(s)" o "mezcla de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico" sintetizado por reacción bacteriana y / o reacción enzimática, el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido preferiblemente se somete adicionalmente a purificación por adsorción usando carbón activado y / o cristalización utilizando un disolvente que contiene agua para eliminar impurezas tales como una sustancia coloreada, para aumentar aún más la pureza del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0081] Como carbono activado, se puede usar un carbono activado conocido arbitrario, y ejemplos del carbono activado conocido incluyen carbonos activados basados en carbón, basados en madera, basados en cáscara de coco y basados en resina. El carbón activado también se puede preparar activando un carbón activado como un carbón activado a base de carbón, a base de madera, a base de cáscara de coco o a base de resina mediante un método tal como activación de gas, activación de vapor o activación química utilizando cloruro de zinc, ácido fosfórico o similares.

[0082] Los ejemplos específicos del carbón activado incluyen Calgon CPG, Calgon CAL, Calgon SGL, Diasorb W, Diahope MS10, Diahope M010, Diahope MS16, Diahope 6MD, Diahope 6MW, Diahope 8ED, Diahope ZGN4 y CENTUR, fabricados por Calgon Mitsubishi Chemical Corporation; GAC, GAC PLUS, GCN PLUS, C GRAN, RO, ROX, DARCO, CN, SX, SX PLUS, SA, SX, PK y W, fabricado por Norit Japan Co., Ltd.; GW, GWH, GLC, 4GC, KW, PW y PK, fabricados por Kuraray Chemical Co., Ltd.; HC-30S, GL-30S, 4G-3S, PS y PC, fabricados por Tsurumicoal Co., Ltd.; P, W, CW, SG, SGP, S, GB, CA y K, fabricados por Futamura Chemical Co., Ltd.; Shirasagi KL, Shirasagi W2C, Shirasagi WH2C, Shirasagi W5C, Shirasagi WH5C, Shirasagi WH5X, Shirasagi XS7100H-3, Carboraffin,

Shirasagi A, Shirasagi C y Shirasagi M, fabricados por Japan EnviroChemicals Ltd.; y Hokuetsu CL-K, Hokuetsu HS y Hokuetsu KS, fabricados por Ajinomoto Fine-Techno Co., Inc.

[0083] Mediante esta operación, se pueden eliminar las impurezas que muestran la absorción dentro del intervalo de longitud de onda de 400 nm a 800 nm.

5 **[0084]** Como el disolvente que contiene agua para la cristalización, se puede usar un disolvente orgánico soluble en agua. Ejemplos específicos del disolvente incluyen ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; ésteres tales como acetato de etilo; alcoholes tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol y 1-butanol; éteres tales como tetrahidrofurano y dioxano; cetonas tales como acetona, metiletil cetona y dietil cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; amidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida y N-metilpirrolidinona; sulfonas tales como dimetilsulfóxido y sulfolano; y disolventes mixtos de dos o más de estos. También se prefiere aumentar aún más la
10 pureza del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico llevando a cabo la cristalización del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico usando el disolvente descrito anteriormente. Entre estos, se prefieren ácidos orgánicos, alcoholes y cetonas, cuya solubilidad en agua es mayor. Los alcoholes y las cetonas son más preferidos, y el etanol y la acetona son especialmente preferidos.

15 EJEMPLOS

[0085] La presente invención se describe a continuación con más detalle a modo de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estos Ejemplos.

20 **[0086]** Los análisis cuantitativos en los Ejemplos se llevaron a cabo mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) en las siguientes condiciones.

<HPLC-1>

[0087]

25 Columna: CLC-D de Astec (4,6 mm x 150 mm, 5 µm), fabricado por SUPELCO

Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre a 2 mmol/L

Velocidad de flujo: 1,0 ml / minuto

Temperatura de la columna: 45°C

Longitud de onda de detección: UV 254 nm

30 <HPLC-2>

[0088]

35 Columna: columna L (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), fabricada por Chemicals Evaluation and Research Institute, Japón.
Fase móvil:

A: solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% en peso

B: metanol

gradiente (concentración de B): 0 minutos, 20% → 2 minutos, 20% → 10 minutos, 80% → 20 minutos, 80%

40 Velocidad de flujo: 1.0 ml / minuto
Temperatura de la columna: 40°C
Longitud de onda de detección: UV 200 nm

45 <HPLC-3>

[0089]

50 Columna: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 150 mm, 1,8 µm), fabricada por Agilent Technologies.
Fase móvil:

A: solución acuosa de ácido fosfórico al 0,1% B: gradiente de acetonitrilo (concentración de B): 0 minutos, 55% → 6 minuto, 55% → 9 minutos, 80% → 12 minutos, 80%

55 B: acetonitrilo
gradiente (concentración de B): 0 minutos, 55% → 6 minutos, 55% → 9 minutos, 80% → 12 minutos, 80%

Velocidad de flujo: 1.0 mL / minuto
Temperatura de la columna: 40°C
Longitud de onda de detección: UV 210 nm

5 <HPLC-4>

[0090]

Columna: COSMOSIL 5C18-AR-II (4,6 mm x 150 mm), fabricada por Nacalai Tesque, Inc.
Fase móvil: 50 mmol/L de tampón fosfato (pH 2,7)
Velocidad de flujo: 1,0 ml / minuto
Temperatura de la columna: 40°C
Longitud de onda de detección: UV 340 nm

10

15 <HPLC-5>

[0091]

Columna: SUMICHIRAL OA-6100 (4,6 mm x 250 mm), fabricada por Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.
Fase móvil: 1 mmol/L de sulfato de cobre
Velocidad de flujo: 1,0 mL / minuto
Temperatura de la columna: 30°C
Longitud de onda de detección: UV 254 nm

20

<HPLC-6>

25

[0092]

Columna: CLC-D (4,6 mm x 150 mm), fabricada por SUPELCO
Fase móvil: 2 mmol/L sulfato de cobre
Velocidad de flujo: 1,0 ml / minuto
Temperatura de la columna: 30°C
Longitud de onda de detección: UV 254 nm

30

[Ejemplo de referencia 1]

35

[Ejemplo de preparación de Escherichia coli recombinante (E. coli) JM109 / pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr), en los cuales se coexpresan N-metil-L-Aminoácido Deshidrogenasa (en lo sucesivo denominado DpkA), L-aminoácido oxidasa (en lo sucesivo denominado como AIP), Glucosa-1-deshidrogenasa (en lo sucesivo denominada GDH) y Aminoácido Racemasa (en lo sucesivo, KR)].

40

(1) Clonación de genes

[0093] En base a una secuencia génica de dpkA (SEQ ID NO: 1) que codifica DpkA (número de acceso de GenBank BAD89743, SEQ ID NO: 2) derivada de *Pseudomonas putida* (P. putida), cebadores para amplificar la secuencia de longitud completa del gen dpkA, dpkA_F (SEQ ID NO: 9) y dpkA_R (SEQ ID NO: 10), se diseñaron y sintetizaron. La PCR se llevó a cabo usando ADN cromosómico de P. Putidas como plantilla de acuerdo con un método convencional, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1.0 kbp.

45

[0094] Una secuencia de gen de aip (SEQ ID NO: 3) que codifica una proteína AIP (SEQ ID NO: 4), que tiene la secuencia de aminoácidos de L-aminoácido oxidasa derivada de *Scomber japonicus* (número de acceso de GenBankCAC00499) con la excepción de que el *péptido señal* se elimina, se diseña y se sintetiza artificialmente. Los cebadores para amplificar la secuencia de longitud completa del gen aip, aip_F (SEQ ID NO: 11) y aip_R (SEQ ID NO: 12), se diseñaron y sintetizaron. La PCR se llevó a cabo de acuerdo con un método convencional, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kpb.

50

[0095] En base a una secuencia génica de gdh (SEQ ID NO: 5) que codifica una proteína (SEQ ID NO: 6) que tiene la secuencia de aminoácidos de GDH derivada de *Bacillus subtilis* (número de acceso de GenBank NP_388275) con la excepción de que el 96° resto de aminoácido, ácido glutámico, se sustituye con alanina, se diseñaron y sintetizaron cebadores para amplificar la secuencia de longitud completa del gen gdh, gdh_F (SEQ ID NO: 13) y gdh_R (SEQ ID NO: 14). La PCR se llevó a cabo de acuerdo con un método convencional, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 0,8 kpb.

55

[0096] En base a una secuencia génica de kr (SEQ ID NO: 7) que codifica KR derivado de *P.putida* (número de acceso de GenBank NP_745855, SEQ ID NO: 8), cebadores para amplificar la secuencia de longitud completa del

60

gen rk, kr_F (SEQ ID NO: 15) y kr_R (SEQ ID NO: 16), se diseñaron y sintetizaron. La PCR se llevó a cabo usando ADN cromosómico de *P. putida* usando una plantilla de acuerdo con un método convencional, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kpb.

5 (2) Preparación del plásmido de expresión

10 [0097] Cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos en (1) se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, y se introdujo cadena abajo del promotor trc en un digerido *MunI* / *XbaI* de un plásmido pKW32, que se describe en el documento WO 2012/029819, usando un Kit de Ligation-Convenience (fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.), para obtener pKW32dpkA, pKW32aip, pKW32gdh y pKW32kr, respectivamente.

15 [0098] Posteriormente, el pKW32aip se digirió con *SpeI* y *NdeI* para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kbp que contenía aip, y el fragmento de ADN resultante se introdujo corriente abajo de dpkA en el plásmido abierto de anillo (lineal) de aproximadamente 4,2 kbp obtenido digiriendo pKW32dpkA con *XbaI* y *NdeI*, obtener pKW32 (dpkA, aip).

20 [0099] Se digirió pKW32gdh con *SpeI* y *NdeI* para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kbp que contenía gdh, y el fragmento de ADN resultante se introdujo corriente abajo de aip en el plásmido de aproximadamente 5,7 kbp abierto en el anillo obtenido digiriendo pKW32 (dpkA, aip) con *XbaI* and *NdeI*, para obtener pKW32 (dpkA, aip, gdh).

25 [0100] Finalmente, pKW32kr se digirió con *SpeI* y *NdeI* para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kbp que contiene kr, y el fragmento de ADN resultante se introdujo corriente abajo de gdh en el plásmido de anillo abierto (lineal) de aproximadamente 6,5 kbp obtenido digiriendo pKW32 (dpkA, aip, gdh) con *XbaI* y *NdeI*, para obtener pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr).

(3) Preparación de Cepa de Expresión

30 [0101] Usando el plásmido pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr) obtenido en (2), *E. coli* JM109 (fabricado por Takara Bio Inc.) se transformó según un método convencional para obtener recombinante *E. coli* JM109 / pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr).

[Ejemplo de referencia 2]

35 [Ejemplo de preparación de la mezcla de reacción ácida 5-hidroxi-2-piperidincarboxílica]

[0102] A un fermentador de vaso de 1 L (fabricado por ABLE Corporation, tipo BMJ), se le añadieron 45 g de hidrocloreuro de 5-hidroxilisina (230 mmol), preparado de acuerdo con un método descrito en Bull. Chem. Soc. Jpn., 1962, 35, 2006), se añadieron 2,27 ml de Adekanol LG-109 y 67,34 g (374 mmol) de glucosa, y se disolvieron en agua. A continuación, se añadió gota a gota 20% en peso de solución acuosa de hidróxido de sodio hasta que el pH llegó a 8. Al líquido resultante, se añadió la catalasa derivada de hígado bovino (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 2000 U / l; Se añadió NADP⁺ (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) a 0,2 mmol/l; y células húmedas del recombinante *E. coli* JM109 / pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr) preparados en el Ejemplo de Referencia 1 se añadieron a 25 g / l; seguido de agregar agua a la mezcla resultante a un volumen líquido de 566 ml. La reacción se dejó avanzar a 30°C, una velocidad de agitación de 500 rpm, y una velocidad de aireación de aproximadamente 1 l / min durante 43 horas. Durante la reacción, el pH se mantuvo a 8 añadiendo 20% en peso de solución acuosa de hidróxido de sodio gota a gota. Exactamente las mismas operaciones se llevaron a cabo dos veces después, y las mezclas de reacción obtenidas por las 3 rondas de operaciones (usando 135 g de hidrocloreuro de 5-hidroxilisina, 690 mmol) se combinaron. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 2,5 usando 6 mol/l de ácido sulfúrico. A continuación, se añadió gota a gota una solución acuosa de hidróxido de sodio al 20% para ajustar el pH a 4, y el líquido resultante se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos para eliminar las impurezas insolubles. El sobrenadante obtenido se pasó a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Asahi Kasei Corporation), y luego a través de una membrana de ultrafiltración (fabricada por Asahi Kasei Corporation), para eliminar las impurezas. El análisis del ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico contenido en la solución resultante se llevó a cabo mediante HPLC bajo las condiciones de <HPLC-1>. Como resultado, la cantidad de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico producida fue 43.9 g (302 mmol; rendimiento, 44%), y la cantidad de ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2 piperidincarboxílico producido fue 29,7 g (205 mmol, rendimiento, 30%).

Ejemplo 1

60 <1-1> Producción de Bencilo (1S,4S)-5-Aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato

[0103] A1153 g de una mezcla de reacción que contiene 20,7 g (143 mmol) de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y 18,0 g (124 mmol) de ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico [(2S,5S):(2S,5R) = 53.6:46.4 (proporción molar)] obtenido de acuerdo con el método del Ejemplo de Referencia 2, se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mol/l (60 ml) para ajustar el pH de 3.65 a 10.81. El líquido resultante se concentró a presión reducida, para obtener 422,4 g de una solución en suspensión. En cada uno de 2 matraces, se colocaron 211,2 g de la suspensión espesa obtenida, y la temperatura interna se disminuyó a 5°C a 7°C, seguido de la realización de las siguientes operaciones para cada matraz.

[Lo siguiente es una descripción de las operaciones para uno de los matraces. Cada matraz contenía 10,4 g (72 mmol) de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y 9,0 g (62 mmol) de ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.]

[0104] Al matraz, se añadieron gota a gota 18,8 ml (133 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo y luego se añadieron 13,3 ml (133 mmol) de solución acuosa de hidróxido sódico 10 mol/l para ajustar el pH de aproximadamente 9 a 10, y luego se dejó reaccionar para proceder a una temperatura dentro del rango de 10°C a 20°C durante 10 minutos. Al líquido resultante, se añadieron gota a gota 18,8 ml (133 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo y luego se añadieron 13,5 ml (135 mmol) de solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mol/l para ajustar el pH de 9 a 11, seguido de permitir la reacción proceder a una temperatura dentro del rango de 10°C a 20°C durante 3 horas. Al líquido resultante, se añadieron 19 ml de agua, y luego se añadieron gota a gota 6,2 ml (44 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo, y luego se dejó que el líquido se calentara gradualmente a temperatura ambiente. Al líquido resultante, se añadieron 200 ml de tolueno y luego se añadieron 4 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mol/l (40 mmol) para ajustar el pH a 11, seguido de separación de la capa orgánica. A la capa acuosa, se añadieron 100 ml de tolueno para realizar una nueva extracción, y la capa acuosa se separó para obtener la capa orgánica. Esta capa orgánica se combinó con la capa orgánica obtenida previamente. La mezcla resultante se lavó con 10 ml de agua, seguido de separación de la capa orgánica resultante. A partir de la capa orgánica obtenida de cada uno de los dos matraces, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida a 35°C, para obtener 64,9 g de una sustancia oleosa amarilla.

[0105] Como resultado del análisis por $^1\text{H-NMR}$, se encontró que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 45% en peso de bencilo (1S, 4S) 5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato (111 mmol, rendimiento, 78% con respecto al ácido (2S, 5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico), 15% en peso (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-ácido piperidincarboxílico = ácido benciloxifórmico = anhídrido (23 mmol, rendimiento, 19% con respecto al ácido (2S, 5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico), 36% en peso de alcohol bencílico y 5% en peso de tolueno. Por lo tanto, la conversión del material ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, que contenía (2S,5S) y (2S,5R) en una proporción de (2S,5S):(2S,5R) = 53.6:46.4 (proporción molar), a (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo, permitió la eliminación efectiva de los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5R), y, mediante esto, la pureza de los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5S) podría aumentarse a (2S,5S):(2S,5R) = 82.8:17.2 (proporción molar).

[0106] El producto bruto resultante se enfrió a 10°C a 15°C, y se añadieron 36 ml de tolueno y 36 ml de hexano. Como resultado, se produjo la precipitación de sólidos blancos. Los sólidos blancos precipitados se recogieron por filtración y se lavaron rociando con 100 ml de hexano sobre los mismos. Los sólidos blancos resultantes se secaron a presión reducida a temperatura ambiente, para obtener 20,7 g de sólidos blancos.

[0107] Como resultado del análisis por $^1\text{H-NMR}$, se descubrió que los sólidos blancos eran una mezcla que contenía un 92,5% en peso de bencilo (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato (rendimiento, 51% con respecto al ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico) y 7,5% en peso de ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico = ácido benciloxifórmico = anhídrido. Mediante la cristalización, la pureza de los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5S) podría aumentarse a (2S,5S):(2S,5R) = 92.5:7.5 (proporción molar).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 1,77-1,85 (1H,m), 2,02-2,25 (3H,m), 3,52 (1H,d,J=11,9 Hz), 3,70 (1H, dt, J=12.2, 3.3Hz), 4.70-4.86 (2H,m), 5,12-5,21 (2H, m), 7,32-7,40 (5H, m).

<1-1> Producción de (1S, 4S)-5-Aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo

[0108] A 80 g de una mezcla de reacción que contiene 1,74 g (12,0 mmol) de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y 1,01 g (7,0 mmol) de (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico ácido [(2S,5S):(2S,5R) = 63.2:36.8 (proporción molar)] obtenido de acuerdo con el método del Ejemplo de Referencia 2, se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mol/l para ajustar el pH de 3,65 a 9,8. El líquido resultante se concentró a presión reducida, y se obtuvieron 38 g de una solución. A la solución, se añadieron 3,1 ml de 2-propanol. La temperatura interna de la solución obtenida se ajustó a aproximadamente 25°C. A la solución, se añadieron gota a gota 3,2 g (18,8 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo, y se añadieron adicionalmente 2,3 g (22,6 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso, seguido de permitir que la reacción transcurriera a una temperatura dentro del intervalo de 20°C a 25°C durante 30 minutos. Al líquido resultante, se añadieron gota a gota 3,2 g (18,8 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo y se añadieron adicionalmente 2,3 g (22,6 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso, seguido de permitir que la reacción transcurriera a una temperatura dentro del intervalo de 20°C a 25°C durante 30 minutos. A continuación, la operación de añadir 1,6 g (9,4 mmol) de

cloruro de benciloxycarbonilo gota a gota al líquido resultante, añadiendo 1,1 g (11,3 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso a la misma, y luego permitiendo que la reacción transcurra a una temperatura dentro del rango de 20°C a 25°C durante 30 minutos se repitió 3 veces. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C a 5°C, y los cristales precipitados en el sistema de reacción se recogieron por filtración. Los cristales

obtenidos se secaron a presión reducida de 40°C a 45°C para obtener 2 g de cristales blancos.
[0109] Como resultado del análisis de ¹H-NMR, se encontró que los cristales obtenidos eran (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo (80% en peso, rendimiento, 56% con respecto al ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarcboxílico).

<1-1"> Producción de (1S,4S)-5-Aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo

[0110] A 160 g de una mezcla de reacción que contiene 3,26 g (22,5 mmol) de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-piperidincarcboxílico y 2,24 g (15,4 mmol) de (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarcboxílico ácido [(2S,5S):(2S,5R) = 59,4:40,6 (proporción molar)] obtenido de acuerdo con el método del Ejemplo de Referencia 2, se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mol/l para ajustar el pH de 3,65 a 9,5. El líquido resultante se concentró a presión reducida, y se obtuvieron 74 g de una solución. A la solución, se añadieron 6,0 ml de 2-propanol. La temperatura interna de la solución obtenida se ajustó a aproximadamente 25°C. A la solución, se añadieron gota a gota 6,4 g (37,6 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo, y se añadieron adicionalmente 4,5 g (45,2 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso, seguido de permitir que la reacción transcurriera a una temperatura dentro del intervalo de 20°C a 25°C durante 30 minutos. Al líquido resultante, se añadieron gota a gota 6,4 g (37,6 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo y se añadieron adicionalmente 4,5 g (45,2 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso, seguido de permitir que la reacción transcurriera a una temperatura dentro del intervalo de 20°C a 25°C por 30 minutos adicionales. A continuación, se añadieron gota a gota 3,2 g (18,8 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo a la mezcla de reacción, y se añadieron gota a gota a la misma 2,3 g (22,6 mmol) de hidróxido de sodio al 40% en peso, seguido de la reacción a temperatura dentro del rango de 20°C a 25°C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron gota a gota 1,9 g (11,1 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo a la mezcla de reacción, y se añadieron gota a gota a la misma 1,4 g (14,0 mmol) de lejía de sosa al 40% en peso, seguido de permitir que la reacción transcurriera a una temperatura el rango de 20°C a 25°C durante 30 minutos. A la mezcla de reacción resultante, se añadieron 71 ml de tolueno y se llevó a cabo la separación del líquido. A la capa orgánica extraída, se añadieron 13 ml de agua y 6,2 g de solución de hidróxido de sodio acuoso al 40% en peso, y se llevó a cabo la separación de líquido nuevamente. La capa acuosa obtenida, en una cantidad de 32 g, se dividió en dos alícuotas y se sometió a los métodos de purificación A y B.

Método de purificación A: Adición de Anhídrido Acético

[0111] A 16 g de la capa acuosa obtenida en <1-1">, se añadieron 9,1 g (89 mmol) de anhídrido acético. Los cristales obtenidos se recogieron por filtración y se secaron a presión reducida de 40°C a 45°C. Los cristales secos parecían blancos, y su peso era de 1,5 g.

[0112] Los cristales obtenidos se analizaron por HPLC bajo las condiciones de <HPLC-3>. Como resultado, se encontró que los cristales obtenidos eran (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo (100% en peso; rendimiento, 50% con respecto al ácido (2S, 5S)-5-hidroxi-2-piperidincarcboxílico).

Método de purificación B: Extracción Bajo Condiciones Ácidas

[0113] A 16 g de la capa acuosa obtenida en <1-1">, se añadieron 30 ml de agua y se añadieron 5 mol/l de ácido clorhídrico para ajustar el pH en el sistema a 1,07. A continuación, se añadieron 55 ml de acetato de etilo a la mezcla resultante, y se llevó a cabo la separación del líquido. Posteriormente, se añadieron 55 ml de acetato de etilo a la capa acuosa obtenida, y se llevó a cabo la separación de líquido nuevamente. Las capas orgánicas obtenidas se combinaron y se concentraron a presión reducida hasta que el peso disminuyó a la mitad del peso original. A la capa orgánica obtenida, se añadieron 2,9 g (28,1 mmol) de trietilamina y 2,9 g (28,1 mmol) de anhídrido acético a entre 20°C y 25°C. Después de agitar la mezcla resultante durante 30 minutos, se añadieron 0,57 g (5,6 mmol) de trietilamina y 0,57 g (5,6 mmol) de anhídrido acético a 20°C a 25°C. Después de agitar la mezcla de reacción resultante durante 30 minutos, se añadieron a la misma 20 g de una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio. Después de la separación del líquido, se añadieron 71 ml de tolueno a la capa acuosa obtenida, y se llevó a cabo nuevamente la operación de extracción.

[0114] Las capas orgánicas obtenidas se combinaron y se concentraron a presión reducida. El enfriamiento del concentrado obtenido a 0°C a 5°C provocó la precipitación de cristales. Los cristales obtenidos se recogieron por filtración, y luego se secaron a presión reducida de 40°C a 45°C. Los cristales secos eran blancos, y su peso era de 2,4 g. Los cristales obtenidos se analizaron por HPLC bajo las condiciones de <HPLC-3>. Como resultado, se encontró que los cristales obtenidos eran (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo (98% en peso; rendimiento, 70% con respecto al ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarcboxílico).

<1-2> Producción de ácido (2S, 5S)-N-benciloxycarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarcboxílico

[0115] En un matraz, se añadieron 20,0 g (92,5% en peso, 71 mmol) del bencil (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo

[2.2.2] octano-5-carboxilato obtenido en <1-1> y 60 ml de etanol, y se añadieron 76,5 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l a temperatura ambiente, seguido de agitación de la mezcla durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida de 35°C a 40°C, para obtener 61,2 g de una sustancia oleosa de color amarillo. A la sustancia resultante, se añadieron 100 ml de acetato de etilo y la capa orgánica se separó. A la capa acuosa obtenida, se añadieron 14 ml de ácido clorhídrico 5 mol/l para ajustar el pH a 1,2. La capa acuosa se sometió a extracción usando 200 ml de acetato de etilo dos veces, y la capa orgánica obtenida se lavó con 2 ml de agua. Después de la separación de la capa orgánica, el disolvente se eliminó a presión reducida de 35°C a 40°C, para obtener 24,0 g de una sustancia oleosa de color amarillo pálido.

[0116] Como resultado del análisis de ^1H -RMN, se encontró que esta sustancia oleosa de color amarillo pálido era ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (pureza, 76% en peso; 65 mmol; rendimiento, 92%). El pico para el ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico no se encontró en absoluto por ^1H -RMN.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , mezcla de isómeros rotacionales)

δ 1,27-1,39 (1H, m), 1,70-1,85 (1H, m), 1,98-2,06 (1H, m), 2,27-2,39 (1H, m), 2,80 (0,4 H, t, J = 11,8 Hz), 2,87 (0,6 H, t, J = 11,6 Hz), 3,61 - 3,72 (1 H, m) 4,18 - 4,33 (1 H, m), 4,81 - 4,88 (0,4 H, m), 4,93 - 4,98 (0,6 H, m), 5,12 - 5,21 (2 H, m), 7,28 - 7,40 (5 H, m).

<1-3> Producción de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0117] A un matraz se añadieron 18,0 g (64,5 mmol) del ácido (2S, 5S)-N-benziloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido en <1-2>, 90 ml de etanol y 2,5 g de 10% paladio carbono (fabricado por NE Chemcat Corporation, tipo PE, 55,3%, que contiene agua), y la hidrogenación se llevó a cabo a temperatura y presión normales. Tres horas más tarde, se añadieron 22 ml de agua a la misma, y la hidrogenación se llevó a cabo a temperatura y presión normales. La desaparición del material de partida podía confirmarse 8,5 horas después. El carbono de paladio se eliminó por filtración y se rociaron 100 ml de agua sobre él para su lavado. Del filtrado obtenido, el disolvente se eliminó a presión reducida de 45°C a 55°C, para obtener 11,6 g de una suspensión blanca.

[0118] La suspensión obtenida se analizó por HPLC bajo las condiciones de <HPLC-1>. Como resultado, se encontró que la suspensión contenía ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con una pureza del 65% en peso en una cantidad de 64,5 mmol y un rendimiento del 81%. La relación de isómeros fue la siguiente: ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico: ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico = 98,8: 1,2. El material utilizado en <1-1> tenía una pureza tan baja como (2S,5S) : (2S, 5R) = 53,7: 46,3 (proporción molar), y la pureza se incrementó a (2S,5S) : (2S,5R) = 98,8:1,2 (proporción molar) por el método de la presente invención.

<1-4> Tratamiento con carbón activado y cristalización

[0119] En un matraz se añadieron 0,38 g de la suspensión obtenida en <1-3> (pureza, 65% en peso; 1,7 mmol), 2,5 ml de agua, 0,025 g de un carbón activado fabricado por Calgon Mitsubishi Chemical Corporation, CAL, y 0,025 g de un carbón activado fabricado por Calgon Mitsubishi Chemical Corporation, 6ED. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y los carbonos activos se eliminaron después por filtración, seguido de concentración de la solución acuosa a 0,5 ml. Mientras se agitaba el concentrado, se añadieron 5,0 ml de etanol gota a gota a la misma, y la mezcla resultante se enfrió a 5°C. Como resultado, los cristales precipitaron gradualmente. Mientras la temperatura se mantenía a 5°C, la agitación se continuó durante 1 hora, y se añadieron 2,0 ml de acetona gota a gota a la temperatura constante de 5°C, seguido de agitación de la mezcla resultante durante 0,5 horas adicionales. Después de eso, los cristales precipitados se recogieron por filtración, y se roció sobre ellos 1,0 ml de una solución de etanol / acetona enfriada con hielo (= proporción de volumen 5/2) para lavar. Los cristales se secaron entonces a presión reducida a 60°C, para obtener 0,25 g (pureza, 98% en peso, rendimiento, 99,2%) de cristales.

[0120] Los cristales obtenidos se analizaron por HPLC bajo las condiciones de <HPLC-1>. Basándose en el resultado, la relación de isómeros de ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico contenida en los cristales obtenidos fue la siguiente: ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico: ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico = 99,5: 0,5.

Ejemplo 2

<2-1> Producción de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

[0121] A 124 ml de una mezcla de reacción que contiene 0,723 g (4,98 mmol) de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y 0,830 g (5,72 mmol) de (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico ácido obtenido según el método del Ejemplo de Referencia 2 [(2S,5S) : (2S,5R) = 46,5: 53,5 (proporción molar)], se añadieron 2,88 ml (36 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 50% en peso, y la mezcla resultante se concentró a una temperatura del baño de 40°C a una presión reducida de 50 hPa, para obtener 132 g de una solución. En un baño de agua, se añadieron divididamente a la solución obtenida 3,1 ml (22 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo y 0,44 ml (5,5 mmol) de solución de hidróxido sódico al 50% en peso, mientras que el pH se ajustó a aproximadamente 9. Después de dejar la solución resultante en reposo durante la noche, se añadieron a la misma 60 ml de acetato de etilo y 0,88 ml (11 mmol) de solución de hidróxido de sodio acuoso al 50% en peso, seguido de la filtración a través

de Celite. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se lavó con acetato de etilo. A la capa acuosa, se añadieron 2,9 ml de ácido clorhídrico concentrado (33 mmol) para ajustar el pH a 3. Después de eso, la extracción con acetato de etilo se llevó a cabo 3 veces. El disolvente se eliminó de la capa orgánica resultante a presión reducida a 35°C, para obtener 2,44 g de una sustancia oleosa amarilla.

[0122] Como resultado del análisis de ^1H -RMN, se encontró que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 80% en peso de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico y ácido(2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico (6,91 mmol, rendimiento, 65%; (2S,5S):(2S,5R) = 4:6 (proporción molar)), 12% en peso de acetato de etilo, y 8 % en peso de ácido acético.

<2-2> Producción de (2S,5S)-3-oxo-2-oxa-5-azabicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo

[0123] A un matraz, 2,35 g del ácido (2S,5S)-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico y ácido (2S,5R)-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico obtenido en <2-1> [6,72 mmol, (2S, 5S):(2S, 5R)= 4:6 (proporción molar)], se añadieron 10 ml de tolueno y 116 mg (0,67 mmol) de ácido p-toluenosulfónico monohidrato, y la reacción se dejó proceder a 60°C durante 2 horas. Después de enfriar el producto de reacción resultante a temperatura ambiente, se añadieron a esto 30 ml de acetato de etilo, 5 ml de agua y 7 ml de solución de hidróxido de sodio 1 mol/l. Como resultado, el pH de la capa acuosa se volvió 9. Después de separar la capa acuosa, la re-extracción se llevó a cabo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera saturada. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,44 g de una sustancia oleosa marrón.

[0124] Como resultado del análisis por ^1H - NMR, se descubrió que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 75% en peso de (2S,5S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo (1,27 mmol, rendimiento, 19%), 17% en peso de acetato de etilo y 9% en peso de tolueno.

[0125] En el material ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico, (2S,2R) y (2S,5R) estaban contenidos en (2S,5S) : (2S, 5R) = 4: 6 (proporción molar). Mediante su conversión en (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo, los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5R) pudieron eliminarse eficazmente.

[0126] Sin embargo, dado que el rendimiento de (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo fue del 19%, el isómero (2S,5S) se obtuvo con rendimiento moderado de aproximadamente 50%. Se ha observado que se produjo una reacción secundaria entre el (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo generado por la reacción y el ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico dejado sin reaccionar en el sistema, para causar la esterificación. Se supone que esto es la causa del rendimiento moderado.

<2-3> Producción de ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico

[0127] A un matraz se añadieron 0,44 g (pureza, 75% en peso; 1,27 mmol) del (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo obtenido en <2 -2>, 2,6 ml de metanol, y 2,6 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l, y se dejaron reposar durante la noche. A la mezcla de reacción resultante, se añadieron 1,3 ml de ácido clorhídrico 2 mol/l para ajustar el pH a 4, y luego se llevó a cabo la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,33 g de una sustancia oleosa marrón. La sustancia se purificó después por cromatografía sobre gel de sílice para obtener 0,25 g de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico (0,88 mmol, rendimiento, 69%).

Ejemplo 3

<3-1> Producción de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico.

[0128] A un matraz se añadieron 0,76 g de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico y ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarbonílico [5.24 mmol, (2S,5S):(2S,5R) = 7: 3 (proporción molar)], 6,3 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l, y se añadieron 0,93 ml (5,3 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo a la mezcla resultante enfriando con hielo. La temperatura de la mezcla se aumentó luego lentamente hasta la temperatura ambiente, y se le añadieron 2 ml de tetrahidrofurano y 5,2 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l, mientras que el pH se ajustó a aproximadamente 9. Después de dejar la mezcla resultante en reposo durante la noche, la capa orgánica se separó, y la capa acuosa se lavó con acetato de etilo. A la capa acuosa, se añadieron 3,2 ml de ácido clorhídrico 2 mol/l para ajustar el pH a 3, y la mezcla resultante se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,79 g de una sustancia oleosa amarilla.

[0129] Como resultado del análisis de ^1H - NMR, se encontró que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 76% en peso de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (2,15 mmol; rendimiento, 41%; (2S,5S):(2S,5R) = 7: 3 (proporción molar)), y 24% en peso de acetato de etilo.

5 <3-2> Producción de (2S, 5S)-5-Aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo

[0130] A un matraz se añadieron 0,79 g del ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido en <3- 1> (pureza, 76% en peso; 2,15 mmol; (2S, 5S):(2S,5R) = 7: 3 (proporción molar)), 5 ml de tolueno y 49 mg (0,28 mmol) de ácido p-toluenosulfónico monohidratado, y la reacción se dejó avanzar a 60°C durante 2 horas. Después de enfriar el producto de reacción resultante a temperatura ambiente, se añadieron a esto 10 ml de acetato de etilo, 3 ml de agua y 1,2 ml de solución de hidróxido de sodio 1 mol/l. Como resultado, el pH de la capa acuosa se volvió 7. Después de separar la capa acuosa, la re-extracción se llevó a cabo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera saturada. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,34 g de una sustancia oleosa marrón.

[0131] Como resultado del análisis por ^1H - NMR, se encontró que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 62% en peso de (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobiciclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo (0,80 mmol, rendimiento, 37%), 21% en peso de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (0,25 mmol, rendimiento, 12%) y 17% en peso de tolueno.

[0132] En el material ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, (2S,5S) y (2S,5R) estaban contenidos en (2S,5S):(2S,5R) = 7:3 (proporción molar). Mediante su conversión en (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo, los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5R) pudieron eliminarse eficazmente. El rendimiento total de (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo y (2S, 5S)- el ácido fue 49% y el isómero (2S, 5S) del ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico fue del 49%, y el isómero (2S,5S) se obtuvo en un rendimiento moderado de aproximadamente 70%.

[0133] De forma similar a <2-1>, se produjo una reacción secundaria entre el (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo generado por la reacción y el ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico que se quedó sin reaccionar en el sistema, para causar la esterificación. Sin embargo, dado que la cantidad de ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en el material de partida era pequeña, el isómero (2S,5S) podría ser selectivamente, y relativamente eficientemente recuperado.

<3-3> Producción de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0134] En un matraz se añadieron 0,34 g de la sustancia oleosa obtenida en <3-2> [que contiene 0,80 mmol de bencilo (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobiciclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo y 0,25 mmol de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico], 2 ml de metanol y 1,9 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l, y se dejaron reposar durante la noche. A la mezcla de reacción resultante, se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico 2 mol/l para ajustar el pH a 4, y luego se llevó a cabo la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,39 g de una sustancia oleosa marrón.

[0135] Como resultado del análisis por ^1H - RMN, se descubrió que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 76% en peso de ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (1,05 mmol; rendimiento, 100 %; (2S,5S):(2S,5R) = 87:13 (proporción molar)), 23% en peso de acetato de etilo y 1% en peso de ácido acético.

45 <3-4> Producción de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0136] En un matraz, se añadieron 0,39 g del ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de <3-3> (pureza, 77% en peso, 1,06 mmol), 2 ml de metanol y 61 mg de carbono paladio al 10% (fabricado por NE Chemcat Corporation, tipo PE, 55,3%, que contiene agua), y la hidrogenación se llevó a cabo a temperatura y presión normales durante 3 horas. El carbono paladio se eliminó mediante filtración a través de Celite, y se llevó a cabo el lavado con metanol-agua. El filtrado obtenido se concentró para obtener 0,21 g de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico como una sustancia oleosa de color amarillo pálido.

Ejemplo 4

55 <4-1> Producción de (1S,4S)-5-Aza-2-oxa-3-oxobiciclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo y (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo

[0137] A un matraz se añadieron 0,26 g de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido de acuerdo con el método de <2-1> (pureza,

82% en peso; 0,76 mmol; (2S,5S):(2S, 5R) = 5:5 (proporción molar)), 1 ml de acetato de etilo y 5 µL (0,08 mmol) de ácido metanosulfónico, y la reacción se dejó avanzar a 60°C durante 3 horas. Después de enfriar el producto de reacción resultante a temperatura ambiente, se añadieron a esto 10 ml de acetato de etilo y 1 ml de solución de hidróxido de sodio 1 mol/l. Como resultado, el pH de la capa acuosa se cambió a aproximadamente 10. Después de separar la capa acuosa, la re-extracción se llevó a cabo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,12 g de una sustancia oleosa de color marrón pálido.

[0138] Como resultado del análisis de ^1H - NMR, se encontró que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía 26% en peso de (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato-octano- 5-carboxilato de bencilo (0,11 mmol, rendimiento, 15%), 52% en peso de (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico de etilo (0,20 mmol, rendimiento, 26%), 13% en peso de acetato de etilo y 8% en peso de tolueno.

[0139] Se cree que, en el presente Ejemplo, una pequeña cantidad de etanol generado a partir de acetato de etilo reaccionó con (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo[2.2.2]octano-5-carboxilato de bencilo, para generar (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo. En el material ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (2S, 5S) y (2S,5R) estaban contenidos en proporción (2S,5S):(2S,5R) = 5: 5 (proporción molar). Como resultado del análisis por ^1H - RMN y el análisis por HPLC (bajo las condiciones de <HPLC - 2>), se pudo confirmar que la relación de isómeros de N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo era la siguiente: (2S,5S) : (2S,5R) > 10:1 (proporción molar). Por lo tanto, los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5R) pudieron eliminarse eficazmente. Dado que el rendimiento total de (1S,4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo y (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2 -piperidincarboxilato de etilo fue 41%, el rendimiento del isómero (2S,5S) fue de aproximadamente 80%. Por lo tanto, el isómero (2S,5S) pudo recuperarse selectiva y eficientemente.

<4-2> Producción de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0140] A un matraz se añadieron, 0,12 g de la sustancia oleosa obtenida en <4-1> (que contiene 0,11 mmol de (1S, 4S)-5-aza-2-oxa-3-oxobicyclo [2.2.2] octano-5-carboxilato de bencilo y 0,20 mmol de (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo), 1 ml de etanol y 0,66 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l, y se dejaron reposar durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a continuación y se añadieron 0,7 ml de ácido clorhídrico 1 mol/l para ajustar el pH a 3, seguido de la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se concentró a presión reducida para obtener 0,11 g de una sustancia oleosa marrón.

[0141] Como resultado del análisis por ^1H - RMN, se descubrió que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía 84% en peso de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (0,33 mmol, cuantitativo, (2S,5S):(2S,5R) = 10:1 (proporción molar)), 11% en peso de acetato de etilo y 5% en peso de tolueno.

<4-3> Producción de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0142] A un matraz se añadieron 0,11 g del ácido (2S,5S)- N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido en <4-2> (pureza, 82% en peso, 0,33 mmol), 1 ml de metanol y 18 mg de carbono paladio al 10% (fabricado por NE Chemcat Corporation, tipo PE, 55,3%, que contiene agua), y la hidrogenación se llevó a cabo a temperatura y presión normales durante 9 horas.

El carbono paladio se eliminó mediante filtración a través de Celite, y se llevó a cabo el lavado con metanol-agua. El filtrado obtenido se concentró para obtener 58 mg de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico como una sustancia oleosa de color amarillo pálido ((2S,5S):(2S, 5R) = 10: 1 (proporción molar), Análisis de ^1H - NMR).

Ejemplo 5

<5-1> Producción de (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo

[0143] A un matraz se añadieron 0,55 g de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato obtenido de acuerdo con el método de <2-1> (pureza, 78% en peso; 1,52 mmol; (2S,5S):(2S, 5R) = 3: 7 (proporción molar)), 2 ml de tolueno, 0,5 ml de etanol y 10 µL (0,15 mmol) de ácido metanosulfónico y la reacción se dejó proceder a 40°C durante 5 horas.

[0144] La mezcla de reacción se analizó mediante HPLC bajo las condiciones de <HPLC-2>, y se obtuvo el siguiente resultado: (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo : (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de etilo: ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico : ácido(2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico = 24: 8: 7: 57.

[0145] Bajo la suposición de que el material y los productos tienen el mismo coeficiente de absorción, el grado de conversión de los isómeros (2S,5S) era aproximadamente 77%, y el grado de conversión de los isómeros (2S,5R) era aproximadamente 12%. Por lo tanto, los isómeros (2S, 5S) mostraron un mayor grado de esterificación.

<5-1 ' > Producción de (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de isopropilo

[0146] A un matraz se añadieron 0,62 g de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y ácido (2S,5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido de acuerdo con el método de <2-1> (pureza, 78% en peso; 1,72 mmol; (2S,5S):(2S,5R) = 3:7 (proporción molar)), 2 ml de tolueno, 0,5 ml de 2-propanol y 11 µl (0,17 mmol) de ácido metanosulfónico y se dejó que la reacción avanzara a 50°C durante 5 horas. Después de enfriar el producto de reacción resultante a temperatura ambiente, se añadieron a esto 3 ml de tolueno y 1,2 ml de solución de hidróxido de sodio 1 mol/l. Como resultado, el pH de la capa acuosa se llevó a aproximadamente 9. Después de separar la capa acuosa, la re-extracción se llevó a cabo con tolueno. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,17 g de una sustancia oleosa de color marrón pálido.

[0147] Como resultado del análisis por ^1H - NMR, se descubrió que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía 91% en peso de N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de isopropilo (0,47 mmol; rendimiento, 27%; (2S, 5S)):(2S,5R) = 10:1 (proporción molar)) y 9% en peso de tolueno.

[0148] En el presente ejemplo, el material contenía ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato (2S,5S) y (2S,5R) en proporción (2S,5S):(2S,5R) = 3:7 (proporción molar). En base al resultado del análisis por ^1H NMR, la relación de isómeros del N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de isopropilo fue la siguiente: (2S,5S):(2S,5R) = 10:1 (proporción molar) Por lo tanto, los compuestos que tienen la estereoquímica de (2S,5R) pudieron eliminarse eficazmente. Como el rendimiento del (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de isopropilo fue del 27%, el rendimiento del isómero (2S,5S) fue aproximadamente del 80%. Por lo tanto, el isómero (2S,5S) pudo recuperarse selectiva y eficientemente.

<5-2> Producción de ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato

[0149] A un matraz se añadieron 0,17 g del (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxilato de isopropilo obtenido en <5-1> (pureza, 91% en peso; 0,47 mmol), 0,7 ml de metanol y 0,71 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l, y la reacción se dejó proceder a 60°C durante 4 horas. Después de lavar la mezcla de reacción con tolueno, se añadieron 0,45 ml de ácido clorhídrico 2 mol/l para ajustar el pH a 3 y se llevó a cabo la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 0,17 g de una sustancia oleosa marrón. Como resultado del análisis por ^1H - NMR, se descubrió que esta sustancia oleosa era una mezcla que contenía un 70% en peso de ácido N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (0,41 mmol; rendimiento, 88%; (2S,5S):(2S,5R) = 7:1 (proporción molar)), 26% en peso de acetato de etilo y 4% en peso de tolueno.

<5-3> Producción de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0150] A un matraz se añadieron 0,17 g del ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido en <5-2> (pureza, 70% en peso; 0,41 mmol; (2S,5S):(2S, 5R) = 7:1 (proporción molar)), se añadieron 1 ml de metanol y 22 mg de paladio carbono al 10% (fabricado por NE Chemcat Corporation, tipo PE, 55,3%, que contiene agua), y se llevó a cabo la hidrogenación bajo temperatura y presión normal durante 3 horas. El carbono paladio se eliminó mediante filtración a través de Celite, y se llevó a cabo el lavado con metanol-agua. El filtrado obtenido se concentró para obtener 89 mg de ácido (2S,5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico como una sustancia oleosa de color amarillo pálido.

[Ejemplo de referencia 3]

<3-1> Clonación del gen de lisina hidroxilasa

[0151] En base a una secuencia génica (hyl-1, SEQ ID NO: 17) que codifica un homólogo de VioC L-arginina-β hidroxilasa Hyl-1 derivado de la cepa *Flavobacterium johnsoniae* NBRC14942 (No de acceso de GenBank ABQ06186, SEQ ID NO: 18), se diseñaron y sintetizaron cebadores para amplificando la secuencia de longitud completa del gen hyl-1, hyl1_F (SEQ ID NO: 29) y hyl1_R (SEQ ID NO: 30). Usando ADN cromosómico de *Flavobacterium johnsoniae* como molde, se llevó a cabo la PCR de acuerdo con un método convencional, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kpb.

[0152] Además, los homólogos de VioC derivados de la cepa *Kineococcus radiotolerans* NBRC101839, la cepa *Chitinophaga pinensis* NBRC15968, la cepa *Chryseobacterium gleum* NBRC15054 y la cepa *Niastella koreensis* NBRC106392 se denominaron Hyl-2 (número de acceso del GenBank ABS05421, SEQ ID NO: 20), Hyl-3 (número de acceso del GenBank ACU60313, SEQ ID NO: 22), Hyl-4 (número de acceso de GenBank EFK34737, SEQ ID NO: 24) e Hyl-5 (número de acceso de GenBank AEV99100, SEQ ID NO: 26), respectivamente. En base a secuencias génicas que codifican las enzimas, (hyl-2 (SEQ ID NO: 19), hyl-3 (SEQ ID NO: 21), hyl-4 (SEQ ID NO: 23) e hyl-5 (SEQ ID NO: 25)), se diseñaron y sintetizaron cebadores para amplificar la secuencia de longitud completa de cada gen. Se sintetizaron los cebadores hyl2_f (SEQ ID NO: 31) e hyl2_r (SEQ ID NO: 32) para hyl-2, cebadores hyl3_f (SEQ ID NO: 33) e hyl3_r (SEQ ID NO: 34) para hyl-3, cebadores hyl4_f (SEQ ID NO: 35) e hyl4_r (SEQ ID NO: 36) para hyl-4, y los cebadores hyl5_f (SEQ ID NO: 37) e hyl5_r (SEQ ID NO: 38) para hyl-5, y se llevó a cabo PCR usando ADN cromosómico de cada cepa de acuerdo con un método convencional. Cada reacción produjo un fragmento de ADN de aproximadamente 1.0 kbp.

[0153] Cada uno de los 5 tipos de fragmentos de ADN obtenidos se digirió con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, y se ligó a pET21a digerido con NdeI/XhoI (Novagen) según un método convencional, para obtener pEHL1, pEHL2, pEHL3, pEHL4 y pEHL5, respectivamente.

[0154] Se sintetizó artificialmente una secuencia génica (hyl-6, SEQ ID NO: 27) que codifica Hyl-6 (número de acceso de GenBank ABS05421, SEQ ID NO: 28), que se derivó de una actinobacteria marina PHSC20C1, y se insertó en pJExpress401 (DNA 2.0) para preparar un plásmido pJHYL6.

[0155] Posteriormente, *E. coli* (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) (fabricado por Invitrogen) se transformó con cada uno de los plásmidos resultantes según un método convencional, para obtener recombinante *E. coli* BL21 (DE3) / pEHL1, BL21 (DE3) / pEHL2, BL21 (DE3) / pEHL3, BL21 (DE3) / pEHL4, BL21 (DE3) / pEHL5, y BL21 (DE3) / pJHYL6.

Para obtener células bacterianas que expresan los genes, cada tipo de recombinante *E. coli* se cultivaron a 30°C usando medio líquido LB suplementado con ampicilina y un inductor promotor lac, y se recogieron después de 20 horas del cultivo.

<3-2> Confirmación de actividad de lisina hidroxilasa mediante reacción de células en reposo

[0156] En un tubo de plástico, 5 mmol/l de L-lisina, 10 mmol/l de ácido 2-oxoglutarico, 1 mmol/l de ácido L-ascorbico, 0.1 mmol/l de sulfato de hierro y recombinantes *E. coli* obtenidos por el método de acuerdo con el Ejemplo de Referencia <3-1> se mezclaron para proporcionar una mezcla de reacción de manera que la turbidez OD₆₀₀ fuera 10.

La reacción se dejó proceder en 0,5 ml de la mezcla preparada a 30°C a pH 7,0 durante 3 horas. El producto de reacción se derivatizó con 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (FDAA), y la hidroxilisina se analizó mediante HPLC bajo las condiciones de <HPLC-4>. Como resultado, como se muestra en la Fig. 2 y la Fig. 3, se pudo confirmar que BL21 (DE3) / pEHL2 y BL21 (DE3) / pJHYL6 produjeron un compuesto correspondiente al tiempo de retención de un producto estándar de 3-hidroxilisina, 8.04 minutos. También se pudo confirmar que BL21 (DE3) / pEHL1, BL21 (DE3) / pEHL3, BL21 (DE3) / pEHL4 y BL21 (DE3) / pEHL5 produjeron un compuesto correspondiente al tiempo de retención de un producto estándar de 4-hidroxilisina, 8.16 minutos.

[0157] <3-3> Síntesis de (2S,3S)-3-Hidroxilisina

[0158] En un fermentador de vaso de 1 L, se mezclaron 35 ml de tampón de fosfato de potasio 1 mol/l (pH 7,0), 304 ml de agua desalada, 1,28 g de hidrócloruro de L-lisina, 2,05 g de ácido 2-oxoglutarico, 0,14 g de sodio L-ascorbato, 0,02 g de sulfato de hierro, 0,35 g de Adekanol LG109, y 8 g de células húmedas de recombinante *E. coli* BL21 (DE3) / pEHL2 obtenido por el método de acuerdo con el Ejemplo de Referencia <3-1>, y la reacción se dejó proceder a 30°C, pH 7,0, una velocidad de agitación de 500 rpm, y una tasa de aireación de 2.0 vvm por 17 horas. La finalización de la reacción se juzgó confirmando la desaparición del pico de L-lisina llevando a cabo un análisis de HPLC bajo las condiciones de <HPLC-5>. Las células bacterianas y los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación y microfiltración del líquido después de la finalización de la reacción, para obtener 390 g de un filtrado.

[0159] Después de pasar 390 g del filtrado a través de una columna de resina de intercambio iónico (DIAION (marca registrada) SK-1B (Tipo H), 60.0 g), el lavado se llevó a cabo con agua, seguido de elución con una solución acuosa que contenía 150 mmol de amoníaco. El eluido de amoníaco se concentró para obtener 1,0 g de (2S,3S)-3-hidroxilisina (6,17 mmol, rendimiento, 88%). <1> H-RMN (400 MHz, D₂O) δ, 1,45-1,58 (2H, m), 1,63-1,73 (1H, m), 1,74-1,88 (1H, m), 2,93-3,04 (2H, m), 3,47 (1H, d, J = 4,3 Hz), 3,89 (1H, dt, J = 8,4,4,5 Hz)

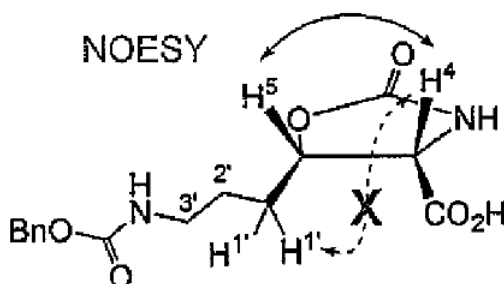
<3-4> Determinación de la estereoquímica de (2S,3S)-3-hidroxilisina

[0160] A un matraz, se añadieron 8,3 mg (0,051 mmol) de (2S,3S)-3-hidroxilisina obtenido por el método según el Ejemplo de Referencia <3-3>, 0,26 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l y 18 µL (0,13 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la mezcla, se añadieron adicionalmente 0,26 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l y 18 µL (0,13 mmol) de cloruro de benciloxycarbonilo, y la reacción se dejó transcurrir durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de tetrahidrofurano a la mezcla de reacción, y la reacción se dejó proceder a 60°C durante 2 horas adicionales. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se añadieron a la misma 95 mg de hidróxido de sodio, y la reacción se dejó transcurrir durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó dos veces con tolueno-tetrahidrofurano (1:1), y se añadieron 250 µl de ácido clorhídrico concentrado a la mezcla de reacción para hacer que la mezcla de reacción fuera fuertemente ácida.

Después de lavar 3 veces con acetato de etilo, la capa acuosa se extrajo 4 veces con 1-butanol. La capa de 1-butanol se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y luego se concentró, para obtener 14,6 mg de ácido (4S,5S)-5-(3-benciloxycarbonilaminopropil)-2-oxo-4-oxazolidinacarboxílico (0,045 mmol; rendimiento, 89 %).

[0161] La estereoquímica del ácido (4S,5S)-5-(3-benciloxycarbonilaminopropil)-2-oxo-4-oxazolidinacarboxílico obtenido se determinó mediante medición NOESY. La medición NOESY se llevó a cabo utilizando un espectrómetro

AVANCE DRX500 fabricado por Bruker (equipado con un CryoProbe) a 25°C con un tiempo de mezcla de 0,8 mseg. Como referencia de desplazamiento químico, se usaron 3,31 ppm para metanol. El resultado de la medición NOESY fue el siguiente.



[0162] Como se encontró un pico cruzado entre el átomo de hidrógeno de posición 4 (H^4) y el átomo de hidrógeno de posición 5 (H^5), pero no se encontró entre las posiciones 4 y 1', se pudo confirmar que los sustituyentes en la posición 4 y en la posición 5 tienen la configuración cis. Dado que la configuración absoluta de la lisina utilizada en la reacción enzimática era S, se pudo confirmar que el ácido 5-(3-benciloxicarbonilaminopropil)-2-oxo-4-oxazolidinacarboxílico obtenido en el presente Ejemplo de Referencia tiene la estereoquímica de (4S, 5S), y que la 3-hidroxisina como su material tiene la estereoquímica de (2S,3S).

1H -NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ , 1,39-1,53 (3H, m, H^1 , H^2 x2), 1,59-1,68 (1H, m, H^1), 3,02-3,08 (2H, m, H^3), 3,60-3,64 (1H, m, H^4), 3,93-4,00 (1H, m, H^5), 4,90-5,02 (2H, m, Bn), 7,18-7,28 (5H, m, Bn).

[Ejemplo de referencia 4]

Producción de Ácido (2S,3S)-3-Hidroxi-pipecólico [ácido (2S,3S)-3-Hidroxi-2-piperidincarboxílico]

[0163] En un tubo de plástico se mezclaron 0,75 ml de tampón tris-hidroximetil-aminometano 1 mol/l (pH 8,0), 9,21 ml de agua desalada, 86 mg de la (2S,3S)-3-hidroxisina obtenida en el ejemplo de referencia <3-3>, 0,083 ml de NADPH 50 mmol/l, 0,7 ml de glucosa 1,0 mol/l y 1,25 ml de una suspensión de 100 g / l del recombinante E. coli JM109 / pKW32 (dpkA, aip, gdh, kr) obtenido en el Ejemplo de referencia 1, y la reacción se dejó proceder a 30°C a pH 8,0 a una velocidad de agitación de 1000 rpm durante 20 horas. La finalización de la reacción se juzgó confirmando la desaparición del pico para (2S,3S)-3-hidroxisina por análisis de HPLC bajo las condiciones de <HPLC-6>. A partir del líquido después de la finalización de la reacción, las células bacterianas y los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación, para obtener 10,5 g de un sobrenadante.

[0164] Después de pasar 10,5 g del sobrenadante a través de una columna de resina de intercambio iónico (DIAION (marca registrada) SK-1B (Tipo H), 4,0 g), el lavado se llevó a cabo con agua, seguido de elución con una solución acuosa que contenía 16,4 mmol de amoníaco. El eluato de amoníaco se concentró para obtener 255 mg de una sustancia marrón sólida. Como resultado del análisis de RMN, se descubrió que esta sustancia sólida era una mezcla que contenía un 20% en peso de ácido (2S,3R)-3-hidroxi-pipecólico (0,35 mmol, rendimiento, 66,3%) y 80% en peso de tris hidroximetil aminometano.

1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ , 1,38-1,56 (2H, m), 1,73-1,85 (2H, m), 2,71-2,79 (1H, m), 3,04-3,11 (1H, m), 3,23 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 3,79-3,86 (1H, m).

Ejemplo 6

Producción de ácido (2S, 5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

[0165] A un matraz se añadieron 78,7 mg (0,542 mmol) de ácido (2S, 5S)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y 2,8 mg (0,019 mmol) de ácido (2S,5R)-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido de acuerdo con el método del Ejemplo 1, y 98,5 mg de ácido (2S,3S)-3-hidroxi-2-piperidincarboxílico obtenido de acuerdo con el método del Ejemplo de Referencia 4 (pureza, 20% en peso, 0,136 mmol; que contiene 78,8 mg de tris hidroximetil aminometano), y después se añadieron a ello a temperatura ambiente 0,200 ml de agua y 0,674 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 2 mol/l. Después de añadir 0,190 ml (1,35 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo gota a gota a la mezcla resultante, se añadieron 0,500 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 2 mol/l para ajustar el pH de 9 a 10. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 25 minutos y luego se añadieron 0,098 ml (0,697 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo a la mezcla de reacción resultante, seguido de la adición de 0,400 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 2 mol/l para ajustar el pH de 10 a 11. Se permitió además que la reacción transcurriera a temperatura ambiente durante 40 minutos, y se añadieron gota a gota a la misma 0,098 ml (0,697 mmol) de cloruro de benciloxicarbonilo, seguido de permitir que la reacción transcurriera a temperatura ambiente durante 2 horas. A la mezcla de reacción resultante, se añadieron 3 ml de tolueno y luego se llevó a cabo la separación del líquido. A la capa orgánica extraída, se añadieron 0.500 ml de agua y se llevó a cabo la separación de líquido nuevamente. La capa orgánica resultante se concentró para obtener 330 mg de una sustancia oleosa de color amarillo pálido. A esta sustancia oleosa, se añadieron 2 ml de etanol, 1,1 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l, y 0,3 ml de

agua, y la reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La mezcla de reacción resultante se concentró y el etanol se evaporó. A continuación, se añadieron 1 ml de etanol, 0,3 ml de agua, 0,1 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l y 0,1 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 2 mol/l, y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente por 2 horas. La mezcla de reacción se concentró y el etanol se evaporó, seguido de separación líquida usando 3 ml de tolueno. A la capa acuosa obtenida, se añadieron 1 ml de agua y 0,75 ml de ácido clorhídrico 1 mol/l para ajustar el pH de la solución acuosa a 1. La capa acuosa se sometió dos veces a extracción con 4 ml de acetato de etilo, y la capa orgánica resultante se concentró para obtener 92,0 mg de una sustancia oleosa de color amarillo pálido.

[0166] Como resultado del análisis por ^1H - NMR, se encontró que esta sustancia oleosa de color amarillo pálido contenía 80,5% en peso de ácido (2S,5S)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico (0,265 mmol; rendimiento, 49%) y 19,5% en peso de acetato de etilo. No se encontró ningún pico en absoluto para el ácido (2S, 5R)-N-benciloxicarbonil-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico ni el ácido (2S,3S)-N-benciloxicarbonil-3-hidroxi-2-piperidincarboxílico por ^1H -NMR.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0167] La presente invención se puede usar como un método para purificar el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, que es útil como producto intermedio para productos farmacéuticos, y también se puede usar como un método para producir sus derivados.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0168]

<110> API Corporation

<120> Método para producir un derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, y método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico

<130> AP340-13366

<150> JP2012-278314

<151> 2012-12-20

<160> 38

<170> Patentln version 3.5

<210> 1

<211> 1026

<212> ADN

<213> Pseudomonas putida

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1023)

<400> 1

atg	tcc	gca	cct	tcc	acc	agc	acc	gtt	gtg	cgc	gtg	cct	ttt	acc	gag	48
Met	Ser	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Val	Arg	Val	Pro	Phe	Thr	Glu	
1				5					10				15			
ctg	caa	agc	ctg	ttg	cag	gcc	att	ttc	cag	cgc	cat	ggg	tgc	agc	gag	96
Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Phe	Gln	Arg	His	Gly	Cys	Ser	Glu	
			20					25				30				
gcc	gtg	gcc	cgg	gtg	ctg	gcc	cac	aac	tgc	gcc	agc	gcc	cag	cgt	gat	144
Ala	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	His	Asn	Cys	Ala	Ser	Ala	Gln	Arg	Asp	
			35				40					45				
ggc	gcc	cat	agc	cat	ggg	gtg	ttc	cgc	atg	ccc	ggg	tat	gtc	tcg	acc	192
Gly	Ala	His	Ser	His	Gly	Val	Phe	Arg	Met	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr	
	50					55					60					
ttg	gcc	agc	ggc	tgg	gtc	gat	ggc	cag	gcc	acg	cca	cag	gtc	agc	gac	240
Leu	Ala	Ser	Gly	Trp	Val	Asp	Gly	Gln	Ala	Thr	Pro	Gln	Val	Ser	Asp	
	65				70					75				80		
gtg	gcc	gcc	ggc	tat	gtg	cgt	gtc	gat	gct	gcg	ggc	ggg	ttt	gcc	cag	288
Val	Ala	Ala	Gly	Tyr	Val	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Gln	
			85					90					95			
cca	gca	ctg	gcg	gcg	gcc	cgt	gag	ctg	ttg	gtg	gcg	aag	gcg	cgc	agc	336
Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Lys	Ala	Arg	Ser	
			100					105				110				
gca	ggc	att	gcc	gtg	ctg	gcg	atc	cac	aac	tcg	cac	cac	ttc	gcc	gcg	384
Ala	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Ile	His	Asn	Ser	His	His	Phe	Ala	Ala	
		115					120					125				
cta	tgg	ccg	gat	gtc	gag	ccg	ttc	gcc	gaa	gag	ggc	ctg	gta	gcc	ctc	432
Leu	Trp	Pro	Asp	Val	Glu	Pro	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	
	130					135					140					
agc	gtg	gtc	aac	agc	atg	acc	tgc	gtg	gtg	ccg	cat	ggg	gca	cgc	aag	480
Ser	Val	Val	Asn	Ser	Met	Thr	Cys	Val	Val	Pro	His	Gly	Ala	Arg	Lys	
	145				150					155				160		
ccg	ctg	ttc	ggg	acc	aac	ccc	atc	gct	ttt	gct	gcg	cct	tgc	gcc	gag	528
Pro	Leu	Phe	Gly	Thr	Asn	Pro	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Cys	Ala	Glu	
			165					170					175			
cat	gac	ccg	atc	gtt	ttc	gac	atg	gcc	acc	agt	gcc	atg	gcc	cat	ggc	576
His	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asp	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	His	Gly	

ES 2 693 568 T3

	180		185		190	
gat	gtg	cag	att	gcc	gcg	cgc
Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Ala	Arg
	195		200		205	
ggg	gtg	gat	gcc	gat	ggc	cag
Gly	Val	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln
	210		215		220	
gaa	ggc	ggc	gcc	ttg	ctg	cca
Glu	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro
225			230		235	
tcg	atg	atg	gtc	gag	ctg	ctg
Ser	Met	Met	Val	Glu	Leu	Leu
	245		250		255	
tcc	tgg	gag	ttc	gat	tgg	tcc
Ser	Trp	Glu	Phe	Asp	Trp	Ser
	260		265		270	
acc	ggg	cag	ttg	atc	atc	gtc
Thr	Gly	Gln	Leu	Ile	Ile	Val
	275		280		285	
cgc	ttt	gcc	cag	cgc	agc	cgc
Arg	Phe	Ala	Gln	Arg	Ser	Arg
	290		295		300	
ggg	ctg	acg	cgc	atg	ccg	ggc
Gly	Leu	Thr	Arg	Met	Pro	Gly
305			310		315	
gcc	gag	gag	gag	ggg	gtg	gcg
Ala	Glu	Glu	Glu	Gly	Val	Ala
	325		330		335	
aaa	gag	ctg	ctt	ggc	tga	
Lys	Glu	Leu	Leu	Gly		
	340					

<210> 2

<211> 341

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 2

Met	Ser	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Val	Arg	Val	Pro	Phe	Thr	Glu
1				5					10					15	
Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Phe	Gln	Arg	His	Gly	Cys	Ser	Glu
			20					25					30		
Ala	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	His	Asn	Cys	Ala	Ser	Ala	Gln	Arg	Asp
		35					40					45			
Gly	Ala	His	Ser	His	Gly	Val	Phe	Arg	Met	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr
	50				55					60					
Leu	Ala	Ser	Gly	Trp	Val	Asp	Gly	Gln	Ala	Thr	Pro	Gln	Val	Ser	Asp
65					70					75					80
Val	Ala	Ala	Gly	Tyr	Val	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Gln
				85				90					95		
Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Lys	Ala	Arg	Ser
			100					105					110		
Ala	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Ile	His	Asn	Ser	His	His	Phe	Ala	Ala
		115					120					125			
Leu	Trp	Pro	Asp	Val	Glu	Pro	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Leu	Val	Ala	Leu
	130					135					140				
Ser	Val	Val	Asn	Ser	Met	Thr	Cys	Val	Val	Pro	His	Gly	Ala	Arg	Lys
145					150					155					160
Pro	Leu	Phe	Gly	Thr	Asn	Pro	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Cys	Ala	Glu
				165				170						175	
His	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asp	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	His	Gly
			180					185					190		
Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro	Glu	Gly	Met
		195					200					205			
Gly	Val	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Pro	Thr	Thr	Asp	Pro	Lys	Ala	Ile	Leu
	210					215					220				
Glu	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro	Phe	Gly	Gly	His	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu
225					230					235					240
Ser	Met	Met	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	Gly	His	Phe
				245					250					255	
Ser	Trp	Glu	Phe	Asp	Trp	Ser	Gly	His	Pro	Gly	Ala	Lys	Thr	Pro	Trp
			260				265						270		
Thr	Gly	Gln	Leu	Ile	Ile	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Lys	Ala	Glu	Gly	Glu
		275					280					285			
Arg	Phe	Ala	Gln	Arg	Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Glu	His	Met	Gln	Ala	Val
	290					295					300				
Gly	Leu	Thr	Arg	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Arg	Tyr	Arg	Glu	Arg	Glu	Val
305					310					315					320
Ala	Glu	Glu	Glu	Gly	Val	Ala	Val	Thr	Glu	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu
				325					330					335	
Lys	Glu	Leu	Leu	Gly											
			340												

<210> 3
 <211> 1488
 <212> ADN
 5 340
 <213> Scomber japonicus

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)... (1485)
 <400> 3

ES 2 693 568 T3

atg gag cac ttg gct gat tgc ttg gaa gat aag gat tac gat aca ctt	48
Met Glu His Leu Ala Asp Cys Leu Glu Asp Lys Asp Tyr Asp Thr Leu	
1 5 10 15	
ttg cag aca ttg gac aac ggt ttg cct cac att aac act tct cat cac	96
Leu Gln Thr Leu Asp Asn Gly Leu Pro His Ile Asn Thr Ser His His	
20 25 30	
gtt gtc att gtt ggt gcc gga atg gca ggt ttg acc gct gcc aaa ttg	144
Val Val Ile Val Gly Ala Gly Met Ala Gly Leu Thr Ala Ala Lys Leu	
35 40 45	
ctt caa gat gca gga cac act gtt aca atc ttg gag gct aac gac aga	192
Leu Gln Asp Ala Gly His Thr Val Thr Ile Leu Glu Ala Asn Asp Arg	
50 55 60	
gtt ggt gga aga gtc gaa act tac aga aat gaa aag gag ggt tgg tat	240
Val Gly Gly Arg Val Glu Thr Tyr Arg Asn Glu Lys Glu Gly Trp Tyr	
65 70 75 80	
gct gaa atg gga gcc atg aga atc cca tct tct cat aga atc gtt cag	288
Ala Glu Met Gly Ala Met Arg Ile Pro Ser Ser His Arg Ile Val Gln	
85 90 95	
tgg ttt gtc aag aaa ttg ggt gtt gaa atg aac gag ttt gtc atg aca	336
Trp Phe Val Lys Lys Leu Gly Val Glu Met Asn Glu Phe Val Met Thr	
100 105 110	
gat gac aac acc ttc tac ttg gtt aat gga gtc aga gaa aga act tat	384
Asp Asp Asn Thr Phe Tyr Leu Val Asn Gly Val Arg Glu Arg Thr Tyr	
115 120 125	
gtt gtc caa gag aac cct gat gtt ttg aag tac aat gtc tct gaa tcc	432
Val Val Gln Glu Asn Pro Asp Val Leu Lys Tyr Asn Val Ser Glu Ser	
130 135 140	
gag aaa ggt att tct gct gat gac ttg ctt gac aga gcc ttg cag aag	480
Glu Lys Gly Ile Ser Ala Asp Asp Leu Leu Asp Arg Ala Leu Gln Lys	
145 150 155 160	

ES 2 693 568 T3

ggt	aaa	gaa	gag	gtc	gaa	gct	aat	ggt	tgt	aag	gca	gct	ttg	gag	aag	528
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Glu	Ala	Asn	Gly	Cys	Lys	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	
				165					170					175		
tac	gat	aga	tac	tct	ggt	aag	gaa	tat	ttg	aaa	gaa	gag	ggt	gga	ctt	576
Tyr	Asp	Arg	Tyr	Ser	Val	Lys	Glu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Glu	Gly	Gly	Leu	
			180					185					190			
tcc	cca	ggt	gct	ggt	aga	atg	att	gga	gat	ttg	ctt	aac	gag	caa	tct	624
Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Arg	Met	Ile	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Glu	Gln	Ser	
		195					200					205				
ttg	atg	tac	act	gcc	ctt	tcc	gaa	atg	atc	tat	gat	cag	gca	gac	gtt	672
Leu	Met	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Tyr	Asp	Gln	Ala	Asp	Val	
	210					215					220					
aat	gat	tca	gtc	agt	tac	cac	gag	ggt	aca	ggt	gga	tcc	gat	ttg	ctt	720
Asn	Asp	Ser	Val	Ser	Tyr	His	Glu	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	
225				230						235				240		
cca	gaa	gct	ttc	ttg	tca	ggt	ctt	gac	gtc	cct	atc	ttg	ctt	aac	tcc	768
Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Asp	Val	Pro	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	
			245					250						255		
aag	ggt	aag	cat	atc	aga	caa	tca	gat	aag	ggt	ggt	atc	gtc	agt	tat	816
Lys	Val	Lys	His	Ile	Arg	Gln	Ser	Asp	Lys	Gly	Val	Ile	Val	Ser	Tyr	
			260					265				270				
cag	act	gga	aat	gaa	tca	agt	ttg	atg	gac	ctt	tct	gct	gat	att	gtt	864
Gln	Thr	Gly	Asn	Glu	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	Ile	Val	
	275						280					285				
ttg	gtc	act	aca	acc	gcc	aaa	gcc	gca	ttg	ttt	att	gat	ttc	gac	cca	912
Leu	Val	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	Asp	Phe	Asp	Pro	
	290					295					300					
cct	ttg	tct	atc	tcc	aag	atg	gag	gct	ttg	aga	tct	ggt	cac	tac	gat	960
Pro	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	His	Tyr	Asp	
305				310						315				320		
tct	tcc	act	aag	atc	ttg	ctt	act	ttt	aga	gac	aag	ttc	tggt	gaa	gat	1008
Ser	Ser	Thr	Lys	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Arg	Asp	Lys	Phe	Trp	Glu	Asp	
				325				330					335			
gac	ggt	att	aga	ggt	gga	aag	tca	atc	aca	gat	gga	cca	agt	aga	tac	1056
Asp	Gly	Ile	Arg	Gly	Gly	Lys	Ser	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Ser	Arg	Tyr	
			340					345				350				
atc	tac	tat	cct	tca	cat	agt	ttt	cac	acc	aac	gag	act	atc	ggt	gtt	1104
Ile	Tyr	Tyr	Pro	Ser	His	Ser	Phe	His	Thr	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Val	
	355						360					365				
ttg	ctt	gcc	tca	tat	act	tggt	tct	gac	gaa	tcc	ttg	ctt	ttc	ttg	gga	1152
Leu	Leu	Ala	Ser	Tyr	Thr	Trp	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Gly	
	370					375					380					
gct	tct	gat	gaa	gag	ttg	aag	gag	ttg	gcc	ctt	aga	gac	ttg	gca	aaa	1200
Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	
385					390					395				400		
att	cac	ggt	gaa	caa	ggt	tggt	gat	aag	tggt	aca	gga	ggt	atc	gtc	aag	1248
Ile	His	Gly	Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Lys	Cys	Thr	Gly	Val	Ile	Val	Lys	
				405					410				415			
aaa	tggt	tct	gct	gac	cca	tac	tcc	ttg	ggt	gca	ttt	gct	ctt	ttc	acc	1296
Lys	Trp	Ser	Ala	Asp	Pro	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	Phe	Thr	
			420					425				430				
cct	tac	caa	cat	ttg	gaa	tat	gca	cag	gag	ttg	ttt	tct	tct	gaa	ggt	1344
Pro	Tyr	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Glu	Leu	Phe	Ser	Ser	Glu	Gly	
			435				440					445				
aga	ggt	cat	ttt	gct	gga	gag	cac	acc	gca	ttc	cct	cat	gct	tggt	att	1392
Arg	Val	His	Phe	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ala	Phe	Pro	His	Ala	Trp	Ile	
	450					455					460					
gaa	act	tca	atg	aaa	agt	gct	atc	aga	gct	gcc	aca	aac	att	aac	aaa	1440
Glu	Thr	Ser	Met	Lys	Ser	Ala	Ile	Arg	Ala	Ala	Thr	Asn	Ile	Asn	Lys	
465					470					475				480		
gtc	gct	aac	gaa	gaa	tcc	acc	att	gaa	cac	aca	aaa	gat	gag	ttg	taa	1488
Val	Ala	Asn	Glu	Glu	Ser	Thr	Ile	Glu	His	Thr	Lys	Asp	Glu	Leu		
				485					490					495		

ES 2 693 568 T3

<210> 4
<211> 495
<212> PRT
<213> Scomber japonicus

<400> 4

Met	Glu	His	Leu	Ala	Asp	Cys	Leu	Glu	Asp	Lys	Asp	Tyr	Asp	Thr	Leu	1	5	10	15
Leu	Gln	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Pro	His	Ile	Asn	Thr	Ser	His	His	20	25	30	
Val	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Lys	Leu	35	40	45	
Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	His	Thr	Val	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Asn	Asp	Arg	50	55	60	
Val	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Thr	Tyr	Arg	Asn	Glu	Lys	Glu	Gly	Trp	Tyr	65	70	75	80
Ala	Glu	Met	Gly	Ala	Met	Arg	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Arg	Ile	Val	Gln	85	90	95	
Trp	Phe	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Val	Glu	Met	Asn	Glu	Phe	Val	Met	Thr	100	105	110	
Asp	Asp	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Val	Asn	Gly	Val	Arg	Glu	Arg	Thr	Tyr	115	120	125	
Val	Val	Gln	Glu	Asn	Pro	Asp	Val	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Glu	Lys	Gly	Ile	Ser	Ala	Asp	Asp	Leu	Leu	Asp	Arg	Ala	Leu	Gln	Lys	145	150	155	160
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Glu	Ala	Asn	Gly	Cys	Lys	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	165	170	175	
Tyr	Asp	Arg	Tyr	Ser	Val	Lys	Glu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Glu	Gly	Gly	Leu	180	185	190	
Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Arg	Met	Ile	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Glu	Gln	Ser	195	200	205	
Leu	Met	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Tyr	Asp	Gln	Ala	Asp	Val	210	215	220	
Asn	Asp	Ser	Val	Ser	Tyr	His	Glu	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	225	230	235	240
Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Asp	Val	Pro	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	245	250	255	
Lys	Val	Lys	His	Ile	Arg	Gln	Ser	Asp	Lys	Gly	Val	Ile	Val	Ser	Tyr	260	265	270	
Gln	Thr	Gly	Asn	Glu	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	Ile	Val	275	280	285	
Leu	Val	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	Asp	Phe	Asp	Pro	290	295	300	
Pro	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	His	Tyr	Asp	305	310	315	320
Ser	Ser	Thr	Lys	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Arg	Asp	Lys	Phe	Trp	Glu	Asp	325	330	335	
Asp	Gly	Ile	Arg	Gly	Gly	Lys	Ser	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Ser	Arg	Tyr	340	345	350	
Ile	Tyr	Tyr	Pro	Ser	His	Ser	Phe	His	Thr	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Val	355	360	365	
Leu	Leu	Ala	Ser	Tyr	Thr	Trp	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Gly	370	375	380	
Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	385	390	395	400
Ile	His	Gly	Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Lys	Cys	Thr	Gly	Val	Ile	Val	Lys	405	410	415	
Lys	Trp	Ser	Ala	Asp	Pro	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	Phe	Thr	420	425	430	
Pro	Tyr	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Glu	Leu	Phe	Ser	Ser	Glu	Gly				

ES 2 693 568 T3

				435					440					445			
Arg	Val	His	Phe	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ala	Phe	Pro	His	Ala	Trp	Ile		
	450					455					460						
Glu	Thr	Ser	Met	Lys	Ser	Ala	Ile	Arg	Ala	Ala	Thr	Asn	Ile	Asn	Lys		
465					470					475					480		
Val	Ala	Asn	Glu	Glu	Ser	Thr	Ile	Glu	His	Thr	Lys	Asp	Glu	Leu			
				485					490					495			

<210> 5

<211> 786

5 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (783)

<400> 5

atg tat ccg gat tta aaa gga aaa gtc gtc gct att aca gga gct gct	48
Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala	
1 5 10 15	
tca ggg ctc gga aag gcg atg gcc att cgc ttc ggc aag gag cag gca	96
Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala	
20 25 30	
aaa gtg gtt atc aac tat tat agt aat aaa caa gat ccg aac gag gta	144
Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val	
35 40 45	
aaa gaa gag gtc atc aag gcg ggc ggt gaa gct gtt gtc gtc caa gga	192
Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly	
50 55 60	
gat gtc acg aaa gag gaa gat gta aaa aat atc gtg caa acg gca att	240
Asp Val Thr Lys Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
aag gag ttc ggc aca ctc gat att atg att aat aat gcc ggt ctt gca	288
Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Ala	
85 90 95	
aat cct gtg cca tct cac gaa atg ccg ctc aag gat tgg gat aaa gtc	336
Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val	
100 105 110	
atc ggc acg aac tta acg ggt gcc ttt tta gga agc cgt gaa gcg att	384
Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile	
115 120 125	
aaa tat ttc gta gaa aac gat atc aag gga aat gtc att aac atg tcc	432
Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser	
130 135 140	
agt gtg cac gaa gtg att cct tgg ccg tta ttt gtc cac tat gcg gca	480
Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala	
145 150 155 160	
agt aaa ggc ggg ata aag ctg atg aca gaa aca tta gcg ttg gaa tac	528
Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr	
165 170 175	
gcg ccg aag ggc att cgc gtc aat aat att ggg cca ggt gcg atc aac	576
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn	
180 185 190	
acg cca atc aat gct gaa aaa ttc gct gac cct aaa cag aaa gct gat	624
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp	
195 200 205	
gta gaa agc atg att cca atg gga tat atc ggc gaa ccg gag gag atc	672
Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile	
210 215 220	
gcc gca gta gca gcc tgg ctt gct tcg aag gaa gcc agc tac gtc aca	720
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr	
225 230 235 240	
ggc atc acg tta ttc gcg gac ggc ggt atg aca caa tat cct tca ttc	768
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe	
245 250 255	
cag gca ggc cgc ggt taa	786
Gln Ala Gly Arg Gly	
260	

<210> 6

<211> 261

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 6

```

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
1      5      10      15
Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
      20      25      30
Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
      35      40      45
Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
      50      55      60
Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
65      70      75      80
Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Ala
      85      90      95
Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
      100      105      110
Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
      115      120      125
Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
130      135      140
Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
145      150      155      160
Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
      165      170      175
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
      180      185      190
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
      195      200      205
Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
210      215      220
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr
225      230      235      240
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe
      245      250      255
Gln Ala Gly Arg Gly
      260

```

<210> 7
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas putida

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (1227)

<400> 7

atg ccc ttt cgc cgt acc ctt ctg gct gca tcc ctg gca ctt ctg atc

48

ES 2 693 568 T3

Met	Pro	Phe	Arg	Arg	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	
1				5					10					15		
acc	gga	cag	gcc	ccc	ctg	tat	gcg	gca	cca	ccg	ttg	tcg	atg	gac	aac	96
Thr	Gly	Gln	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Asp	Asn	
			20					25					30			
ggc	acc	aac	acc	ctg	acc	gtg	caa	aac	agc	aat	gcc	tgg	gtc	gaa	gtc	144
Gly	Thr	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	Asn	Ser	Asn	Ala	Trp	Val	Glu	Val	
		35					40					45				
agc	gcc	agc	gcc	ctg	cag	cac	aac	atc	cgc	acg	ctg	cag	gcc	gag	ctg	192
Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Gln	His	Asn	Ile	Arg	Thr	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	
	50					55					60					
gcc	ggc	aag	tcc	aag	ctg	tgc	gcc	gtg	ctc	aag	gcc	gat	gcc	tat	ggc	240
Ala	Gly	Lys	Ser	Lys	Leu	Cys	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Tyr	Gly	
65					70					75				80		
cac	ggt	atc	ggc	ctg	gta	atg	cca	tcg	atc	atc	gcc	caa	ggc	gtg	ccc	288
His	Gly	Ile	Gly	Leu	Val	Met	Pro	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Val	Pro	
				85					90					95		
tgc	gtg	gcg	gtg	gcc	agc	aac	gag	gag	gcc	cgc	gtg	gtc	cgc	gcc	agt	336
Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Asn	Glu	Glu	Ala	Arg	Val	Val	Arg	Ala	Ser	
			100					105					110			
ggc	ttc	acc	ggg	caa	ctg	gtg	cgg	gta	cgc	ctg	gcc	agc	ctc	agc	gag	384
Gly	Phe	Thr	Gly	Gln	Leu	Val	Arg	Val	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Glu	
		115					120					125				
ctg	gaa	gat	ggc	ttg	cag	tac	gac	atg	gaa	gag	ctg	gtg	ggc	agc	gcg	432
Leu	Glu	Asp	Gly	Leu	Gln	Tyr	Asp	Met	Glu	Glu	Leu	Val	Gly	Ser	Ala	
	130					135					140					
gaa	ttt	gcc	cgc	cag	gcc	gat	gcc	atc	gcc	gcg	cgc	cat	ggc	aag	acc	480
Glu	Phe	Ala	Arg	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Ala	Ala	Arg	His	Gly	Lys	Thr	
145					150					155				160		
ttg	cgc	att	cac	atg	gcg	ctc	aac	tcc	agc	ggc	atg	agc	cgc	aac	ggg	528
Leu	Arg	Ile	His	Met	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Gly	Met	Ser	Arg	Asn	Gly	
				165					170					175		
gtg	gag	atg	gcc	acc	tgg	tcc	ggc	cgt	ggc	gaa	gcg	ctg	cag	atc	acc	576
Val	Glu	Met	Ala	Thr	Trp	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	
			180					185					190			
gac	cag	aag	cac	ctc	aag	ctg	gtc	gcg	ctg	atg	acc	cac	ttc	gcc	gtg	624
Asp	Gln	Lys	His	Leu	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Thr	His	Phe	Ala	Val	
		195					200					205				
gaa	gac	aag	gac	gat	gta	cgc	aag	ggc	ctg	gcg	gca	ttc	aac	gag	cag	672
Glu	Asp	Lys	Asp	Asp	Val	Arg	Lys	Gly	Leu	Ala	Ala	Phe	Asn	Glu	Gln	
	210					215					220					
acc	gac	tgg	ttg	atc	aag	cac	gcc	agg	ctg	gac	cgc	agc	aag	ctc	acc	720
Thr	Asp	Trp	Leu	Ile	Lys	His	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Ser	Lys	Leu	Thr	
225					230					235				240		
ctg	cac	gcc	gcc	aac	tcg	ttc	gct	acg	ctg	gaa	gtg	ccg	gaa	gcg	cgc	768
Leu	His	Ala	Ala	Asn	Ser	Phe	Ala	Thr	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	Ala	Arg	
				245					250					255		
ctg	gac	atg	gta	cga	acg	ggt	ggc	gcg	ctg	ttc	ggc	gac	acc	gtg	ccg	816
Leu	Asp	Met	Val	Arg	Thr	Gly	Gly	Ala	Leu	Phe	Gly	Asp	Thr	Val	Pro	
		260						265					270			
gcg	cgc	acc	gag	tac	aaa	cgt	gcg	atg	cag	ttc	aaa	tcg	cac	gtg	gcg	864
Ala	Arg	Thr	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ala	Met	Gln	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ala	
		275					280					285				
gcg	gtg	cac	agc	tat	ccg	gcc	ggc	aac	acc	gtg	ggc	tat	gac	cgc	acc	912
Ala	Val	His	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Thr	
	290					295					300					
ttc	acc	ctg	gcc	cgt	gat	tcg	cgg	ctg	gcc	aac	att	acg	gtc	ggg	tac	960
Phe	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Tyr	
305					310					315				320		
tcc	gat	ggc	tac	cgc	cgg	gta	ttc	acc	aac	aag	ggc	cat	gtg	ctg	atc	1008
Ser	Asp	Gly	Tyr	Arg	Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Lys	Gly	His	Val	Leu	Ile	
				325					330					335		
aac	ggc	cac	cgt	gtg	ccg	gtc	gtg	ggc	aag	gtg	tcg	atg	aac	acg	ctg	1056

ES 2 693 568 T3

Asn	Gly	His	Arg	Val	Pro	Val	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Met	Asn	Thr	Leu	
			340					345					350			
atg	gtc	gat	gtc	acc	gac	ttc	cct	gat	gtg	aag	ggg	ggt	aac	gaa	gtg	1104
Met	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Asp	Val	Lys	Gly	Gly	Asn	Glu	Val	
		355					360					365				
gtg	ctg	ttc	ggc	aag	cag	gcc	ggg	ggc	gaa	atc	acc	cag	gcc	gag	atg	1152
Val	Leu	Phe	Gly	Lys	Gln	Ala	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Gln	Ala	Glu	Met	
	370					375					380					
gaa	gaa	atc	aac	ggc	gcg	ttg	ctc	gcc	gat	ttg	tac	acc	gta	tgg	ggc	1200
Glu	Glu	Ile	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Tyr	Thr	Val	Trp	Gly	
385					390					395					400	
aat	tcc	aac	ccg	aag	ata	ctc	gtc	gac	tga							1230
Asn	Ser	Asn	Pro	Lys	Ile	Leu	Val	Asp								
				405												

<210> 8

<211> 409

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 8

Met	Pro	Phe	Arg	Arg	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile
1				5					10					15	
Thr	Gly	Gln	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Asp	Asn
			20					25					30		
Gly	Thr	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	Asn	Ser	Asn	Ala	Trp	Val	Glu	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Gln	His	Asn	Ile	Arg	Thr	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu
	50				55						60				
Ala	Gly	Lys	Ser	Lys	Leu	Cys	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Tyr	Gly
65					70					75					80
His	Gly	Ile	Gly	Leu	Val	Met	Pro	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Val	Pro
				85					90					95	
Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ser	Asn	Glu	Glu	Ala	Arg	Val	Val	Arg	Ala	Ser
			100					105					110		
Gly	Phe	Thr	Gly	Gln	Leu	Val	Arg	Val	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Glu
		115					120						125		
Leu	Glu	Asp	Gly	Leu	Gln	Tyr	Asp	Met	Glu	Glu	Leu	Val	Gly	Ser	Ala
	130					135					140				
Glu	Phe	Ala	Arg	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Ala	Ala	Arg	His	Gly	Lys	Thr
145					150					155					160
Leu	Arg	Ile	His	Met	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Gly	Met	Ser	Arg	Asn	Gly
				165						170				175	
Val	Glu	Met	Ala	Thr	Trp	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr
			180					185					190		
Asp	Gln	Lys	His	Leu	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Thr	His	Phe	Ala	Val
		195					200					205			
Glu	Asp	Lys	Asp	Asp	Val	Arg	Lys	Gly	Leu	Ala	Ala	Phe	Asn	Glu	Gln
	210					215				220					
Thr	Asp	Trp	Leu	Ile	Lys	His	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Ser	Lys	Leu	Thr
225					230					235					240
Leu	His	Ala	Ala	Asn	Ser	Phe	Ala	Thr	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	Ala	Arg
				245					250					255	
Leu	Asp	Met	Val	Arg	Thr	Gly	Gly	Ala	Leu	Phe	Gly	Asp	Thr	Val	Pro
		260						265					270		
Ala	Arg	Thr	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ala	Met	Gln	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ala
		275					280					285			
Ala	Val	His	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Thr
	290					295					300				
Phe	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Tyr
305					310					315					320
Ser	Asp	Gly	Tyr	Arg	Arg	Val	Phe	Thr	Asn	Lys	Gly	His	Val	Leu	Ile
				325					330					335	
Asn	Gly	His	Arg	Val	Pro	Val	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Met	Asn	Thr	Leu
			340					345					350		
Met	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Asp	Val	Lys	Gly	Gly	Asn	Glu	Val
		355					360					365			
Val	Leu	Phe	Gly	Lys	Gln	Ala	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Gln	Ala	Glu	Met
	370					375					380				
Glu	Glu	Ile	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Tyr	Thr	Val	Trp	Gly
385					390					395					400
Asn	Ser	Asn	Pro	Lys	Ile	Leu	Val	Asp							
				405											

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 693 568 T3

<220>
 <223> PCR primer

 <400> 9
 5 gcgaattcat gtccgcacct tccaccagca ccgttg 36

 <210> 10
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> PCR primer

 <400> 10
 gctctagatc agccaagcag ctcttcagg ccttgc 36

 20 <210> 11
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> PCR primer

 <400> 11
 30 gcgaattcat ggagcacttg gctgattgct tggaagataa g 41

 <210> 12
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> PCR primer

 <400> 12
 40 gctctagatt acaactcatc tttgtgtgt tcaatggtg 39

 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PCR primer

 <400> 13
 50 gggaattca tgtatccgga tttaaagga aaagtcg 37

 <210> 14
 55 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> PCR primer

 <400> 14
 ggggtctaga ttaaccgcgg cctgcctg

ES 2 693 568 T3

```

5    <210> 15
    <211> 36
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> PCR primer

10   <400> 15
    gcgaattcat gcccttctgc cgtacccttc tggctg          36

15   <210> 16
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> PCR primer

20   <400> 16
    gctctagatc agtcgacgag tatcttcggg ttggaattg      39

25   <210> 17
    <211> 1113
    <212> ADN
    <213> Flavobacterium johnsoniae NBRC14942

30   <220>
    <221> CDS
    <222> (1) .. (1110)

35   <400> 17

    atg aaa tca caa tca tta att gaa gat gag ata cca gta aaa gaa aac      48
    Met Lys Ser Gln Ser Leu Ile Glu Asp Glu Ile Pro Val Lys Glu Asn
    1          5          10          15
    tat gct tat caa att cct aca agc ccg ctg ata gtg gag gtt acg cct      96
    Tyr Ala Tyr Gln Ile Pro Thr Ser Pro Leu Ile Val Glu Val Thr Pro
    20          25          30
    cag gaa aga aac att ttg tct aat gtg ggc gct ctg ctg gaa aag gca      144
    Gln Glu Arg Asn Ile Leu Ser Asn Val Gly Ala Leu Leu Glu Lys Ala

40

```

ES 2 693 568 T3

35	40	45	
ttt aag agc tat gaa aac cca gat tat ata gaa gcg ctt cat ctg tat			192
Phe Lys Ser Tyr Glu Asn Pro Asp Tyr Ile Glu Ala Leu His Leu Tyr			
50	55	60	
tct ttt cag ctt ctt cca gaa aga ata gcc aga att tta agc cgt ttt			240
Ser Phe Gln Leu Leu Pro Glu Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ser Arg Phe			
65	70	75	80
gga aca gat ttc tca gct gat cag tat gcc gct att att ttt aga ggt			288
Gly Thr Asp Phe Ser Ala Asp Gln Tyr Gly Ala Ile Ile Phe Arg Gly			
85	90	95	
ctt ctt gaa gtt gat cag gat cat ctg gga cca act cct gcg aat tgg			336
Leu Leu Glu Val Asp Gln Asp His Leu Gly Pro Thr Pro Ala Asn Trp			
100	105	110	
cag agc gct gat tac tca aaa ctc aat aaa tac gcc ttt att tgt tcc			384
Gln Ser Ala Asp Tyr Ser Lys Leu Asn Lys Tyr Gly Phe Ile Cys Ser			
115	120	125	
ttg ctg cat ggt gca gtt cct tca aaa cca gta caa tat tat gcg cag			432
Leu Leu His Gly Ala Val Pro Ser Lys Pro Val Gln Tyr Tyr Ala Gln			
130	135	140	
aga aag gcc ggg gga att ctt cat gct gtt att cca gat gag aaa atg			480
Arg Lys Gly Gly Gly Ile Leu His Ala Val Ile Pro Asp Glu Lys Met			
145	150	155	160
gca gct acg caa aca ggt tcg gga tca aaa aca aat ttg tat gtt cat			528
Ala Ala Thr Gln Thr Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asn Leu Tyr Val His			
165	170	175	
aca gaa gat gct ttt ctt tta cat cag gct gat ttt tta agt ttt cta			576
Thr Glu Asp Ala Phe Leu Leu His Gln Ala Asp Phe Leu Ser Phe Leu			
180	185	190	
tat ctg cga aat gaa gaa aga gtt cct tct aca ctt tac tca gta agg			624
Tyr Leu Arg Asn Glu Glu Arg Val Pro Ser Thr Leu Tyr Ser Val Arg			
195	200	205	
tcg cat ggt aag gtg aat aag ata atg gaa aag ctt ttt gat cca att			672
Ser His Gly Lys Val Asn Lys Ile Met Glu Lys Leu Phe Asp Pro Ile			
210	215	220	
tat caa tgt cct aaa gat gct aat tat cag gaa gaa att aat gat ggt			720
Tyr Gln Cys Pro Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Glu Glu Ile Asn Asp Gly			
225	230	235	240
ccg ctg gct tct gtt tta tat gga aat aaa aag ctg cct ttt att aga			768
Pro Leu Ala Ser Val Leu Tyr Gly Asn Lys Lys Leu Pro Phe Ile Arg			
245	250	255	
ttt gat gca gca gag cag ata ttt aat gaa aac gcc gga cag act ccc			816
Phe Asp Ala Ala Glu Gln Ile Phe Asn Glu Asn Ala Gly Gln Thr Pro			
260	265	270	
gaa gct ctt tac aat tta act gaa ttt tgg aat gaa gct aaa gag ttg			864
Glu Ala Leu Tyr Asn Leu Thr Glu Phe Trp Asn Glu Ala Lys Glu Leu			
275	280	285	
att aat agt gat tat atc cca gat tct ggt gat gtt ata ttt gta aat			912
Ile Asn Ser Asp Tyr Ile Pro Asp Ser Gly Asp Val Ile Phe Val Asn			
290	295	300	
aat cat ttg tgt gct cac gga aga agt gct ttt aca gca ggg cag aaa			960
Asn His Leu Cys Ala His Gly Arg Ser Ala Phe Thr Ala Gly Gln Lys			
305	310	315	320
gag gag aat ggt aag ctt gtg cca tgt gag aga cga caa atg tta aga			1008
Glu Glu Asn Gly Lys Leu Val Pro Cys Glu Arg Arg Gln Met Leu Arg			
325	330	335	
atg atg agc aaa acc agt cta att cat ata aga tca atg aca cat acc			1056
Met Met Ser Lys Thr Ser Leu Ile His Ile Arg Ser Met Thr His Thr			
340	345	350	
gat gat ccg tat ttt gtt atg gaa gaa cat tta gga aaa gtt ttt gat			1104
Asp Asp Pro Tyr Phe Val Met Glu Glu His Leu Gly Lys Val Phe Asp			
355	360	365	
cag gct taa			1113

ES 2 693 568 T3

<210> 18
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Flavobacterium johnsoniae NBRC14942

<400> 18

Met	Lys	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Glu	Asp	Glu	Ile	Pro	Val	Lys	Glu	Asn
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Tyr	Gln	Ile	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Pro
			20					25					30		
Gln	Glu	Arg	Asn	Ile	Leu	Ser	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala
		35					40					45			
Phe	Lys	Ser	Tyr	Glu	Asn	Pro	Asp	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	His	Leu	Tyr
	50					55					60				
Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Ile	Ala	Arg	Ile	Leu	Ser	Arg	Phe
65					70					75					80
Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Ala	Asp	Gln	Tyr	Gly	Ala	Ile	Ile	Phe	Arg	Gly
			85						90					95	
Leu	Leu	Glu	Val	Asp	Gln	Asp	His	Leu	Gly	Pro	Thr	Pro	Ala	Asn	Trp
			100					105						110	
Gln	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Lys	Tyr	Gly	Phe	Ile	Cys	Ser
		115				120						125			
Leu	Leu	His	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Lys	Pro	Val	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Gln
		130				135					140				
Arg	Lys	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu	His	Ala	Val	Ile	Pro	Asp	Glu	Lys	Met
145					150					155					160
Ala	Ala	Thr	Gln	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asn	Leu	Tyr	Val	His
			165						170					175	
Thr	Glu	Asp	Ala	Phe	Leu	Leu	His	Gln	Ala	Asp	Phe	Leu	Ser	Phe	Leu
			180					185					190		
Tyr	Leu	Arg	Asn	Glu	Glu	Arg	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ser	Val	Arg
	195					200						205			
Ser	His	Gly	Lys	Val	Asn	Lys	Ile	Met	Glu	Lys	Leu	Phe	Asp	Pro	Ile
	210				215						220				
Tyr	Gln	Cys	Pro	Lys	Asp	Ala	Asn	Tyr	Gln	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	Gly
225				230						235					240
Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Tyr	Gly	Asn	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Ile	Arg
			245						250					255	
Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Ile	Phe	Asn	Glu	Asn	Ala	Gly	Gln	Thr	Pro
		260						265						270	
Glu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Thr	Glu	Phe	Trp	Asn	Glu	Ala	Lys	Glu	Leu
		275					280					285			
Ile	Asn	Ser	Asp	Tyr	Ile	Pro	Asp	Ser	Gly	Asp	Val	Ile	Phe	Val	Asn
	290					295					300				
Asn	His	Leu	Cys	Ala	His	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Gln	Lys
305					310					315					320
Glu	Glu	Asn	Gly	Lys	Leu	Val	Pro	Cys	Glu	Arg	Arg	Gln	Met	Leu	Arg
			325						330					335	
Met	Met	Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Ile	His	Ile	Arg	Ser	Met	Thr	His	Thr
		340						345					350		
Asp	Asp	Pro	Tyr	Phe	Val	Met	Glu	Glu	His	Leu	Gly	Lys	Val	Phe	Asp
		355					360					365			
Gln	Ala														
	370														

<210> 19
 <211> 996

ES 2 693 568 T3

<212> ADN

<213> Kineococcus radiotolerans NBRC101839

<220>

5 <221> CDS

<222> (1) .. (993)

<400> 19

atg tcc tcg ctg ttc ctc gac tcc tcc gcc cac gtg ccg acc ctg ttc	48
Met Ser Ser Leu Phe Leu Asp Ser Ser Ala His Val Pro Thr Leu Phe	
1 5 10 15	
gag ctg ccc gcg ccc cag cgg gcc gcg ctg gcc gcg ctg ggc gcg cgc	96
Glu Leu Pro Ala Pro Gln Arg Ala Leu Ala Ala Leu Gly Ala Arg	
20 25 30	
ctg acc gcg gac ccg gtg acc gag ccc gac gcc ttc ggc cgc cag gcg	144
Leu Thr Ala Asp Pro Val Thr Glu Pro Asp Ala Phe Gly Arg Gln Ala	
35 40 45	
cgc ctg ctg gcc cgc gaa ctg tcc gtc gag gtc acc gag gcc ctg tgg	192
Arg Leu Leu Ala Arg Glu Leu Ser Val Glu Val Thr Glu Ala Leu Trp	
50 55 60	
gcg ttc gag gaa cgg gga tcg gac tcc ggg gtc ctc gtc ctg cgc gcc	240
Ala Phe Glu Glu Arg Gly Ser Asp Ser Gly Val Leu Val Leu Arg Gly	
65 70 75 80	
ctg gag gtc ggt gag ctg ccg ccc acc ccg gcc gac aac acc ggc ggg	288
Leu Glu Val Gly Glu Leu Pro Pro Thr Pro Ala Asp Asn Thr Gly Gly	
85 90 95	
atc gcc ggg cgc acc ctg ctc gcc cgc cag cag gcg atc gtc agc cac	336
Ile Gly Gly Arg Thr Leu Leu Ala Arg Gln Gln Ala Ile Val Ser His	
100 105 110	
gcg ctg ggg cac atg gtc ggc tac gcc gcc gag ggc cac ggg cac ctc	384
Ala Leu Gly His Met Val Gly Tyr Ala Ala Glu Gly His Gly His Leu	
115 120 125	
ctg cag gac atg gtc ccc aac gcc agg ctc gcc gcg acc cag cag tcg	432
Leu Gln Asp Met Val Pro Asn Ala Arg Leu Ala Ala Thr Gln Gln Ser	
130 135 140	
cag gcc tcc cgg gtg gag ctg gag gcg cac acc gag cag tgc ttc tcc	480
Gln Gly Ser Arg Val Glu Leu Glu Ala His Thr Glu Gln Cys Phe Ser	
145 150 155 160	
gac ctg cgc ccc gac tac gtc gtc ctg ggc tgc ctg cgc ggg gac gcc	528
Asp Leu Arg Pro Asp Tyr Val Val Leu Gly Cys Leu Arg Gly Asp Ala	
165 170 175	
gac gcc gcc acc tac gcg ttc cgc gcc ctg gac ctg ctg gcc cac gtg	576
Asp Ala Ala Thr Tyr Ala Phe Arg Ala Leu Asp Leu Leu Ala His Val	
180 185 190	
gac ccc acc gac gtc atg gag ctg ttc cgg ccg ctg tgg acg acg ctg	624
Asp Pro Thr Asp Val Met Glu Leu Phe Arg Pro Leu Trp Thr Thr Leu	
195 200 205	
gtc gac gag tcc ttc gcc gac ttc ctc gac acc cgc gag gtg cgc ggg	672
Val Asp Glu Ser Phe Ala Asp Phe Leu Asp Thr Arg Glu Val Arg Gly	
210 215 220	
ccg ttc tcc atc ctc tcc ggc gac gtc gac gac ccg acg atg ctc gtc	720
Pro Phe Ser Ile Leu Ser Gly Asp Val Asp Asp Pro Thr Met Leu Val	
225 230 235 240	
gac cag gac ctc atg cac ggc atc acc aag cac gcc cag gcc ctg ctg	768
Asp Gln Asp Leu Met His Gly Ile Thr Lys His Ala Gln Ala Leu Leu	
245 250 255	
gag cgc gtg ctg gag atc tac gtc gcc cac cgc cac gcc gtc gtc ctc	816
Glu Arg Val Leu Glu Ile Tyr Val Ala His Arg His Ala Val Val Leu	
260 265 270	
cag ccc ggg gac gtg ctg ctg ctg gac aac ctg cgc gcc atg cac ggc	864
Gln Pro Gly Asp Val Leu Leu Leu Asp Asn Leu Arg Ala Met His Gly	
275 280 285	
cgc tcg ccg ttc gcc ccg cgc ttc gac ggc acc gac cgg ttc atc tcc	912
Arg Ser Pro Phe Ala Pro Arg Phe Asp Gly Thr Asp Arg Phe Ile Ser	
290 295 300	

ES 2 693 568 T3

```

cgg ggt ttc gtc gtc cgc gac ctg cgc cgc tcc cgc ttc gcc cgc ccc      960
Arg Gly Phe Val Val Arg Asp Leu Arg Arg Ser Arg Phe Ala Arg Pro
305                               310                               315       320
ggc ggg aac cgc gtc gtg cag gcc agc ttc agc tga                        996
Gly Gly Asn Arg Val Val Gln Ala Ser Phe Ser
                               325                               330

```

<210> 20
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Kineococcus radiotolerans* NBRC101839

<400> 20

```

Met Ser Ser Leu Phe Leu Asp Ser Ser Ala His Val Pro Thr Leu Phe
1                               5                               10       15
Glu Leu Pro Ala Pro Gln Arg Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Ala Arg
                               20                               25       30
Leu Thr Ala Asp Pro Val Thr Glu Pro Asp Ala Phe Gly Arg Gln Ala
35                               40                               45
Arg Leu Leu Ala Arg Glu Leu Ser Val Glu Val Thr Glu Ala Leu Trp
50                               55                               60
Ala Phe Glu Glu Arg Gly Ser Asp Ser Gly Val Leu Val Leu Arg Gly
65                               70                               75       80
Leu Glu Val Gly Glu Leu Pro Pro Thr Pro Ala Asp Asn Thr Gly Gly
                               85                               90       95
Ile Gly Gly Arg Thr Leu Leu Ala Arg Gln Gln Ala Ile Val Ser His
100                              105
Ala Leu Gly His Met Val Gly Tyr Ala Ala Glu Gly His Gly His Leu
115                              120                              125
Leu Gln Asp Met Val Pro Asn Ala Arg Leu Ala Ala Thr Gln Gln Ser
130                              135                              140
Gln Gly Ser Arg Val Glu Leu Glu Ala His Thr Glu Gln Cys Phe Ser
145                              150                              155       160
Asp Leu Arg Pro Asp Tyr Val Val Leu Gly Cys Leu Arg Gly Asp Ala
165                              170                              175
Asp Ala Ala Thr Tyr Ala Phe Arg Ala Leu Asp Leu Leu Ala His Val
180                              185                              190
Asp Pro Thr Asp Val Met Glu Leu Phe Arg Pro Leu Trp Thr Thr Leu
195                              200                              205
Val Asp Glu Ser Phe Ala Asp Phe Leu Asp Thr Arg Glu Val Arg Gly
210                              215                              220
Pro Phe Ser Ile Leu Ser Gly Asp Val Asp Asp Pro Thr Met Leu Val
225                              230                              235       240
Asp Gln Asp Leu Met His Gly Ile Thr Lys His Ala Gln Ala Leu Leu
245                              250                              255
Glu Arg Val Leu Glu Ile Tyr Val Ala His Arg His Ala Val Val Leu
260                              265                              270
Gln Pro Gly Asp Val Leu Leu Leu Asp Asn Leu Arg Ala Met His Gly
275                              280                              285
Arg Ser Pro Phe Ala Pro Arg Phe Asp Gly Thr Asp Arg Phe Ile Ser
290                              295                              300
Arg Gly Phe Val Val Arg Asp Leu Arg Arg Ser Arg Phe Ala Arg Pro
305                              310                              315       320
Gly Gly Asn Arg Val Val Gln Ala Ser Phe Ser
                               325                               330

```

<210> 21
 <211> 1149
 <212> ADN

<213> Chitinophaga pinensis NBRC15968

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1146)

<400> 21

ES 2 693 568 T3

atg aga ccc tta gac gtg aca ccc aca att agc cca gga gcc cag gac	48
Met Arg Pro Leu Asp Val Thr Pro Thr Ile Ser Pro Gly Ala Gln Asp	
1 5 10 15	
ctt ccg cgc act atg cat ttt gct gct gaa cct cct tta cag cct ttg	96
Leu Pro Arg Thr Met His Phe Ala Ala Glu Pro Pro Leu Gln Pro Leu	
20 25 30	
ata ata gat att act gaa gaa gaa aaa ctg gaa att acc tat atc ggg	144
Ile Ile Asp Ile Thr Glu Glu Glu Lys Leu Glu Ile Thr Tyr Ile Gly	
35 40 45	
aaa aag cta aaa aga aag tat aaa agc tat gat gat ccc ggt ttt att	192
Lys Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Lys Ser Tyr Asp Asp Pro Gly Phe Ile	
50 55 60	
tca atg ctg cac tta aat gcc tat acg ctg cta ccg gag cgt ata gca	240
Ser Met Leu His Leu Asn Ala Tyr Thr Leu Leu Pro Glu Arg Ile Ala	
65 70 75 80	
aag gtg ctg agt aat ttc ggt aca gac ttt tcc gac cag caa tac gga	288
Lys Val Leu Ser Asn Phe Gly Thr Asp Phe Ser Asp Gln Gln Tyr Gly	
85 90 95	
gct gtc gta ttg cgt gga ctg ata gaa ata ggt cag gat gaa tta ggc	336
Ala Val Val Leu Arg Gly Leu Ile Glu Ile Gly Gln Asp Glu Leu Gly	
100 105 110	
cca acc cca cgt tcc tgg cag gaa acc gac cat gaa aag att atg gaa	384
Pro Thr Pro Arg Ser Trp Gln Glu Thr Asp His Glu Lys Ile Met Glu	
115 120 125	
tat ggc ttc att tcc tcc tta tta cat ggc gct gta cca tcc aaa ccc	432
Tyr Gly Phe Ile Ser Ser Leu Leu His Gly Ala Val Pro Ser Lys Pro	
130 135 140	
gtc gag tat ttc gcg cag cga aaa ggt ggt ggc tta atg cac gcg att	480
Val Glu Tyr Phe Ala Gln Arg Lys Gly Gly Glu Leu Met His Ala Ile	
145 150 155 160	
att cct gat gag aat atg agc ttt aca caa aca ggc tca ggt tcc cgt	528
Ile Pro Asp Glu Asn Met Ser Phe Thr Gln Thr Gly Ser Gly Ser Arg	
165 170 175	
aca gat ctt ttt gta cat aca gaa gat gct ttc ctg cat aat gcg gct	576
Thr Asp Leu Phe Val His Thr Glu Asp Ala Phe Leu His Asn Ala Ala	
180 185 190	
gat ttt ctg agt ttt ctt ttc ctg cgg aat gaa gaa cgt gtg cct tcc	624
Asp Phe Leu Ser Phe Leu Phe Leu Arg Asn Glu Glu Arg Val Pro Ser	
195 200 205	
acc tta tat tct atc cgc tct cat ggc aga ccg gat gcg ata tta cag	672
Thr Leu Tyr Ser Ile Arg Ser His Gly Arg Pro Asp Ala Ile Leu Gln	
210 215 220	
gag ctt ttc aag cct atc tat aag tgt ccg aag gat gcg aac tat gct	720
Glu Leu Phe Lys Pro Ile Tyr Lys Cys Pro Lys Asp Ala Asn Tyr Ala	
225 230 235 240	
tcc gaa gaa gcc ctg gga gat gac atc cgt act tct gtt tta tat ggt	768
Ser Glu Glu Ala Leu Gly Asp Asp Ile Arg Thr Ser Val Leu Tyr Gly	
245 250 255	
agc aga tcc gct ccc ttc atg cgc ttt gat gct gcg gaa cag att tat	816
Ser Arg Ser Ala Pro Phe Met Arg Phe Asp Ala Ala Glu Gln Ile Tyr	
260 265 270	
aat gaa gac gcc aat cag gat cct gaa gct tta cat aat ctg aaa aga	864
Asn Glu Asp Ala Asn Gln Asp Pro Glu Ala Leu His Asn Leu Lys Arg	
275 280 285	
ttc tgg gaa gag gcg cgc aaa ctg ata tat aat gac ttc gtt cct gag	912
Phe Trp Glu Glu Ala Arg Lys Leu Ile Tyr Asn Asp Phe Val Pro Glu	
290 295 300	
tca ggt gac ctg atc ttt gtg aat aat cat ctt tgt gcc cat ggc cgg	960

ES 2 693 568 T3

Ser	Gly	Asp	Leu	Ile	Phe	Val	Asn	Asn	His	Leu	Cys	Ala	His	Gly	Arg		
305					310					315					320		
aat	gct	ttc	ctg	gca	ggc	ttc	aga	gag	gaa	aat	ggg	cag	ctg	gta	aaa	1008	
Asn	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Gln	Leu	Val	Lys		
			325						330					335			
tgc	gaa	cgc	cgt	ctt	atg	tta	cgt	atg	atg	agc	aaa	acc	agc	ctg	att	1056	
Cys	Glu	Arg	Arg	Leu	Met	Leu	Arg	Met	Met	Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Ile		
			340					345					350				
aac	atc	cgt	gaa	gta	acc	cac	ccc	gaa	aac	cct	tat	ctc	atc	atg	gaa	1104	
Asn	Ile	Arg	Glu	Val	Thr	His	Pro	Glu	Asn	Pro	Tyr	Leu	Ile	Met	Glu		
		355					360					365					
gag	cac	tac	gga	aaa	gta	tat	agc	gct	cac	ctg	gca	aac	ctt	taa		1149	
Glu	His	Tyr	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Ala	His	Leu	Ala	Asn	Leu				
	370					375					380						

<210> 22

<211> 382

<212> PRT

<213> Chitinophaga pinensis NBRC15968

<400> 22

Met 1	Arg	Pro	Leu	Asp 5	Val	Thr	Pro	Thr	Ile 10	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln 15	Asp
Leu	Pro	Arg	Thr 20	Met	His	Phe	Ala	Ala 25	Glu	Pro	Pro	Leu	Gln 30	Pro	Leu
Ile	Ile	Asp 35	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu 40	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr 45	Tyr	Ile	Gly
Lys 50	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Tyr 55	Lys	Ser	Tyr	Asp	Asp 60	Pro	Gly	Phe	Ile
Ser 65	Met	Leu	His	Leu	Asn 70	Ala	Tyr	Thr	Leu	Leu	Pro 75	Glu	Arg	Ile	Ala 80
Lys	Val	Leu	Ser 85	Asn	Phe	Gly	Thr	Asp	Phe 90	Ser	Asp	Gln	Gln	Tyr 95	Gly
Ala	Val	Val	Leu 100	Arg	Gly	Leu	Ile	Glu 105	Ile	Gly	Gln	Asp	Glu	Leu	Gly
Pro	Thr	Pro 115	Arg	Ser	Trp	Gln	Glu 120	Thr	Asp	His	Glu	Lys 125	Ile	Met	Glu
Tyr	Gly 130	Phe	Ile	Ser	Ser	Leu 135	Leu	His	Gly	Ala	Val 140	Pro	Ser	Lys	Pro
Val 145	Glu	Tyr	Phe	Ala	Gln 150	Arg	Lys	Gly	Gly	Gly	Leu 155	Met	His	Ala	Ile 160
Ile	Pro	Asp	Glu 165	Asn	Met	Ser	Phe	Thr	Gln 170	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser 175	Arg
Thr	Asp	Leu 180	Phe	Val	His	Thr	Glu 185	Asp	Ala	Phe	Leu	His 190	Asn	Ala	Ala
Asp	Phe 195	Leu	Ser	Phe	Leu	Phe 200	Leu	Arg	Asn	Glu	Glu	Arg 205	Val	Pro	Ser
Thr	Leu 210	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser 215	His	Gly	Arg	Pro	Asp 220	Ala	Ile	Leu	Gln
Glu 225	Leu	Phe	Lys	Pro	Ile 230	Tyr	Lys	Cys	Pro	Lys	Asp 235	Ala	Asn	Tyr	Ala 240
Ser	Glu	Glu	Ala 245	Leu	Gly	Asp	Asp	Ile	Arg 250	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr 255	Gly
Ser	Arg	Ser	Ala 260	Pro	Phe	Met	Arg	Phe 265	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Ile	Tyr
Asn	Glu	Asp 275	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro 280	Glu	Ala	Leu	His	Asn 285	Leu	Lys	Arg
Phe	Trp 290	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys 295	Leu	Ile	Tyr	Asn	Asp 300	Phe	Val	Pro	Glu
Ser 305	Gly	Asp	Leu	Ile	Phe 310	Val	Asn	Asn	His	Leu 315	Cys	Ala	His	Gly	Arg 320
Asn	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Gln	Leu	Val	Lys
				325				330				335			
Cys	Glu	Arg	Arg 340	Leu	Met	Leu	Arg	Met 345	Met	Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Ile
Asn	Ile	Arg 355	Glu	Val	Thr	His	Pro 360	Glu	Asn	Pro	Tyr	Leu 365	Ile	Met	Glu
Glu	His 370	Tyr	Gly	Lys	Val	Tyr 375	Ser	Ala	His	Leu	Ala	Asn	Leu		
								380							

<210> 23
<211> 1098
<212> ADN
<213> Chryseobacterium gleum NBRC15054

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1095)

<400> 23

atg aat tct aca caa att tta gat aaa gac tgt tta aca gca gta aag	48
Met Asn Ser Thr Gln Ile Leu Asp Lys Asp Cys Leu Thr Ala Val Lys	
1 5 10 15	
ctg ctt cct acg gtc ata gaa gtc act tct cag gag aga aga atg ata	96
Leu Leu Pro Thr Val Ile Glu Val Thr Ser Gln Glu Arg Arg Met Ile	
20 25 30	
aaa gat gca gcg ctg cat ctt cag aaa aaa tat ggc act tat gaa aac	144
Lys Asp Ala Ala Leu His Leu Gln Lys Lys Tyr Gly Thr Tyr Glu Asn	
35 40 45	
cgg gat ttt ata aaa cat gtt cat caa ctg gcc tct tat ttt ctt ccg	192
Arg Asp Phe Ile Lys His Val His Gln Leu Ala Ser Tyr Phe Leu Pro	
50 55 60	
gaa agg att cta aat ata gca gct gat ttt gca agt gac ttt tct gaa	240
Glu Arg Ile Leu Asn Ile Ala Ala Asp Phe Ala Ser Asp Phe Ser Glu	
65 70 75 80	
aat cag tat gga gcg ctg gtt ttt aca gga ttg atg gag ata gac cag	288
Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Val Phe Thr Gly Leu Met Glu Ile Asp Gln	
85 90 95	
gaa gaa ata ggt tct act cca ccc aac tgg caa tcg gca gat tat tca	336
Glu Glu Ile Gly Ser Thr Pro Pro Asn Trp Gln Ser Ala Asp Tyr Ser	
100 105 110	
aag ttt aat tta tat ggt ttt gcg tgt gcg ctt att cat ggg gca ctt	384
Lys Phe Asn Leu Tyr Gly Phe Ala Cys Ala Leu Ile His Gly Ala Leu	
115 120 125	
ccc tca aag cct gta caa tat tat tca cag cgt aaa ggc ggt gga ttg	432
Pro Ser Lys Pro Val Gln Tyr Ser Gln Arg Lys Gly Gly Gly Leu	
130 135 140	
atc cac gct att att cct gat gaa aaa atg aaa gaa aca cag aca gga	480
Ile His Ala Ile Ile Pro Asp Glu Lys Met Lys Glu Thr Gln Thr Gly	
145 150 155 160	
tca gga tcc tca acg gat ctg tat gta cat aca gaa gat gct ttt ctg	528
Ser Gly Ser Ser Thr Asp Leu Tyr Val His Thr Glu Asp Ala Phe Leu	
165 170 175	
aaa cat cag gct gac ttt tta agc ttt atg tat gtc cga aat gaa gag	576
Lys His Gln Ala Asp Phe Leu Ser Phe Met Tyr Val Arg Asn Glu Glu	
180 185 190	
cag gta cct tca act ctt tat tct atc cgt tct cat gag tct att ggg	624
Gln Val Pro Ser Thr Leu Tyr Ser Ile Arg Ser His Glu Ser Ile Gly	
195 200 205	
gaa aag tac agg aca ctt ttt gag cct att tat aaa atc cct aaa gat	672
Glu Lys Tyr Arg Thr Leu Phe Glu Pro Ile Tyr Lys Ile Pro Lys Asp	
210 215 220	
gcc aat ctg gaa acg gga gaa aat gaa gaa gaa act ctg gat tct gta	720
Ala Asn Leu Glu Thr Gly Glu Asn Glu Glu Glu Thr Leu Asp Ser Val	

ES 2 693 568 T3

225		230		235		240	
ttg tat gga aat acc aac ctt cct ttt atg cga ttt gat gcg gcg gaa							768
Leu Tyr Gly Asn Thr Asn Leu Pro Phe Met Arg Phe Asp Ala Ala Glu							
	245		250		255		
cag ctt ttc aat tcc agt atc aga cag tca gaa gaa gcg cag cat aca							816
Gln Leu Phe Asn Ser Ser Ile Arg Gln Ser Glu Glu Ala Gln His Thr							
	260		265		270		
ctg cat gag ttc tgg gaa gaa gcc aga cat ttg att tat tca gga ttt							864
Leu His Glu Phe Trp Glu Glu Ala Arg His Leu Ile Tyr Ser Gly Phe							
	275		280		285		
acg cct cag gcc gga gat gtt att ctg gtt aat aat cat tta tgt gct							912
Thr Pro Gln Ala Gly Asp Val Ile Leu Val Asn Asn His Leu Cys Ala							
	290		295		300		
cac gga aga tct gct ttc cgt gcg gga gta aga aat att gac ggt ata							960
His Gly Arg Ser Ala Phe Arg Ala Gly Val Arg Asn Ile Asp Gly Ile							
	305		310		315		320
gaa cag ccg tgc gaa cga aga att atg ctt cgg atg atg agt aaa gtg							1008
Glu Gln Pro Cys Glu Arg Arg Ile Met Leu Arg Met Met Ser Lys Val							
	325		330		335		
agc ctt att gat atg aga gca cat acc ctt aca gaa gat cct ttt ttt							1056
Ser Leu Ile Asp Met Arg Ala His Thr Leu Thr Glu Asp Pro Phe Phe							
	340		345		350		
gtc ata gaa gaa cat ctg ggt aaa aac ttt caa cat ttt taa							1098
Val Ile Glu Glu His Leu Gly Lys Asn Phe Gln His Phe							
	355		360		365		

<210> 24

<211> 365

<212> PRT

<213> Chryseobacterium gleum NBRC 15054

<400> 24

Met	Asn	Ser	Thr	Gln	Ile	Leu	Asp	Lys	Asp	Cys	Leu	Thr	Ala	Val	Lys
1				5					10					15	
Leu	Leu	Pro	Thr	Val	Ile	Glu	Val	Thr	Ser	Gln	Glu	Arg	Arg	Met	Ile
			20					25					30		
Lys	Asp	Ala	Ala	Leu	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Glu	Asn
	35						40					45			
Arg	Asp	Phe	Ile	Lys	His	Val	His	Gln	Leu	Ala	Ser	Tyr	Phe	Leu	Pro
	50					55					60				
Glu	Arg	Ile	Leu	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu
65					70					75					80
Asn	Gln	Tyr	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Met	Glu	Ile	Asp	Gln
				85					90					95	
Glu	Glu	Ile	Gly	Ser	Thr	Pro	Pro	Asn	Trp	Gln	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ser
			100					105					110		
Lys	Phe	Asn	Leu	Tyr	Gly	Phe	Ala	Cys	Ala	Leu	Ile	His	Gly	Ala	Leu
	115						120					125			
Pro	Ser	Lys	Pro	Val	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Arg	Lys	Gly	Gly	Gly	Leu
	130					135					140				
Ile	His	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp	Glu	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Gln	Thr	Gly
145					150					155					160
Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Asp	Leu	Tyr	Val	His	Thr	Glu	Asp	Ala	Phe	Leu
				165					170					175	
Lys	His	Gln	Ala	Asp	Phe	Leu	Ser	Phe	Met	Tyr	Val	Arg	Asn	Glu	Glu
		180						185					190		
Gln	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	His	Glu	Ser	Ile	Gly
		195					200					205			
Glu	Lys	Tyr	Arg	Thr	Leu	Phe	Glu	Pro	Ile	Tyr	Lys	Ile	Pro	Lys	Asp
	210					215					220				
Ala	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Glu	Asn	Glu	Glu	Glu	Thr	Leu	Asp	Ser	Val
225					230					235					240
Leu	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Leu	Pro	Phe	Met	Arg	Phe	Asp	Ala	Ala	Glu

				245				250					255		
Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	Ser	Ile	Arg	Gln	Ser	Glu	Glu	Ala	Gln	His	Thr
			260					265					270		
Leu	His	Glu	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Arg	His	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gly	Phe
		275					280					285			
Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Ile	Leu	Val	Asn	Asn	His	Leu	Cys	Ala
	290					295					300				
His	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Arg	Ala	Gly	Val	Arg	Asn	Ile	Asp	Gly	Ile
305					310					315					320
Glu	Gln	Pro	Cys	Glu	Arg	Arg	Ile	Met	Leu	Arg	Met	Met	Ser	Lys	Val
			325					330					335		
Ser	Leu	Ile	Asp	Met	Arg	Ala	His	Thr	Leu	Thr	Glu	Asp	Pro	Phe	Phe
			340					345					350		
Val	Ile	Glu	Glu	His	Leu	Gly	Lys	Asn	Phe	Gln	His	Phe			
		355					360					365			

<210> 25
 <211> 1116
 <212> ADN
 5 <213> Niastella koreensis NBRC106392

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1113)

10
 <400> 25

ES 2 693 568 T3

atg gaa act atc att gaa tcc aga caa cgc att aac agt ccc ggc gta	48
Met Glu Thr Ile Ile Glu Ser Arg Gln Arg Ile Asn Ser Pro Gly Val	
1 5 10 15	
tta ccg cca cct ttg agt cca ttg atc gtt gac gtt aca ccg aag gag	96
Leu Pro Pro Pro Leu Ser Pro Leu Ile Val Asp Val Thr Pro Lys Glu	
20 25 30	
cgt gcc tcc att tca aac gtg gcc aat atc tta tta aaa gcc ttt ggc	144
Arg Ala Ser Ile Ser Asn Val Ala Asn Ile Leu Leu Lys Ala Phe Gly	
35 40 45	
cat tat gaa cat cct gat ttc atc tcc gct ttg cac ctg aat gct ttt	192
His Tyr Glu His Pro Asp Phe Ile Ser Ala Leu His Leu Asn Ala Phe	
50 55 60	
cag tta tta ccg gaa cgt att gcg ggg ata ctg agc cgt ttt ggt acc	240
Gln Leu Leu Pro Glu Arg Ile Ala Gly Ile Leu Ser Arg Phe Gly Thr	
65 70 75 80	
gac ttc tcg cgc cac caa tac ggc gcg ttg gtg ttc aga ggc ctt aca	288
Asp Phe Ser Arg His Gln Tyr Gly Ala Leu Val Phe Arg Gly Leu Thr	
85 90 95	
gaa gta gat cag gag gcg ctt gcc cct acc ccg ccc tcg tgg aaa gaa	336
Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Gly Pro Thr Pro Pro Ser Trp Lys Glu	
100 105 110	
acc gat tac agc aag ctt gtt aaa tat gga ttt att tgc tcg ctg ctg	384
Thr Asp Tyr Ser Lys Leu Val Lys Tyr Gly Phe Ile Cys Ser Leu Leu	
115 120 125	
cat gcc gcc att cca tca aaa cca gta caa tat tat gcg cag cga aaa	432
His Gly Ala Ile Pro Ser Lys Pro Val Gln Tyr Tyr Ala Gln Arg Lys	
130 135 140	
ggc ggt ggt tta ctg cat gcc gtt att ccc gat gaa aaa atg agt cat	480
Gly Gly Gly Leu Leu His Ala Val Ile Pro Asp Glu Lys Met Ser His	
145 150 155 160	
acg caa acc ggc tcc gcc tcg cgc acc gat ctt ttt gtg cat acc gaa	528
Thr Gln Thr Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Leu Phe Val His Thr Glu	
165 170 175	
gat gcg ttc tta ttt aac cag gcc gat ttt ctc agc ttc ctg ttc ctg	576
Asp Ala Phe Leu Phe Asn Gln Ala Asp Phe Leu Ser Phe Leu Phe Leu	
180 185 190	

ES 2 693 568 T3

[illegible]

<210> 26
<211> 371
<212> PRT
<213> Niasella koreensis NBRC106392

<400> 26

Met	Glu	Thr	Ile	Ile	Glu	Ser	Arg	Gln	Arg	Ile	Asn	Ser	Pro	Gly	Val
1				5					10					15	
Leu	Pro	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Lys	Glu
			20					25					30		
Arg	Ala	Ser	Ile	Ser	Asn	Val	Ala	Asn	Ile	Leu	Leu	Lys	Ala	Phe	Gly
		35					40					45			
His	Tyr	Glu	His	Pro	Asp	Phe	Ile	Ser	Ala	Leu	His	Leu	Asn	Ala	Phe
	50					55					60				
Gln	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Ile	Leu	Ser	Arg	Phe	Gly	Thr
65					70					75					80
Asp	Phe	Ser	Arg	His	Gln	Tyr	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Arg	Gly	Leu	Thr
				85					90					95	
Glu	Val	Asp	Gln	Glu	Ala	Leu	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Trp	Lys	Glu
			100					105					110		
Thr	Asp	Tyr	Ser	Lys	Leu	Val	Lys	Tyr	Gly	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu
	115						120					125			
His	Gly	Ala	Ile	Pro	Ser	Lys	Pro	Val	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Arg	Lys
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	His	Ala	Val	Ile	Pro	Asp	Glu	Lys	Met	Ser	His
145					150					155					160
Thr	Gln	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Leu	Phe	Val	His	Thr	Glu
				165					170					175	
Asp	Ala	Phe	Leu	Phe	Asn	Gln	Ala	Asp	Phe	Leu	Ser	Phe	Leu	Phe	Leu
			180					185					190		
Arg	Asn	Glu	Glu	Gln	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	His
		195					200					205			
Gly	Asp	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Ala	Glu	Leu	Phe	Lys	Pro	Ile	Tyr	Lys
	210					215					220				
Cys	Pro	Lys	Asp	Ala	Asn	Tyr	Ala	Asp	Asp	Glu	Asn	Ala	Gly	Glu	Glu
225					230					235					240
Val	Thr	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Pro	Phe	Ile	Arg
			245						250					255	
Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Ile	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln	Thr	Pro
		260						265					270		
Glu	Ala	Met	His	Asn	Leu	Val	Arg	Phe	Trp	Asp	Glu	Ala	Lys	Gln	Leu
		275					280					285			
Ile	Tyr	Asn	Asp	Phe	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Ile	Phe	Val	Asn
	290					295					300				
Asn	His	Leu	Cys	Ala	His	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Tyr	Arg
305					310					315					320
Asn	Glu	Asn	Gly	Gln	Leu	Val	Lys	Cys	Glu	Arg	Arg	Leu	Met	Leu	Arg
			325						330					335	
Met	Met	Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Ile	Asn	Ile	Gln	Ser	Val	Thr	Gln	Leu
			340					345					350		
Asn	Asp	Pro	Tyr	Phe	Ile	Met	Glu	Glu	His	Tyr	Gly	Lys	Leu	Phe	His
		355					360					365			
Ser	Gln	Gln													
		370													

<210> 27

<211> 1068

<212> ADN

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> síntesis artificial

10

<220>

<221> CDS

ES 2 693 568 T3

<222> (1)..(1065)

<400> 27

atg gaa aca atg tca gca atc gcc cca tct aaa tca cac tta tcg aat	48
Met Glu Thr Met Ser Ala Ile Ala Pro Ser Lys Ser His Leu Ser Asn	
1 5 10 15	
agc tta cgt gtc gca cgc agc aaa gag agc gat att acg gtc cac gaa	96
Ser Leu Arg Val Ala Arg Ser Lys Glu Ser Asp Ile Thr Val His Glu	
20 25 30	
ctg cag agc agc ctg ttt acg ctg gat tct gct agc gcg gaa gcg atc	144
Leu Gln Ser Ser Leu Phe Thr Leu Asp Ser Ala Ser Ala Glu Ala Ile	
35 40 45	
cat acc gcg gct gag cgc att acc gcc cac ccg aac gaa aac ccg gac	192
His Thr Ala Ala Glu Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Glu Asn Pro Asp	
50 55 60	
gat ttc ggc cgt cag gcg ctg gca gcg gcg ttt agc ttg ccg gaa gag	240
Asp Phe Gly Arg Gln Ala Leu Ala Ala Ala Phe Ser Leu Pro Glu Glu	
65 70 75 80	
gtg cgt gcg gcg gtc ttg aat ttt gcc gag gtg ggt agc gag agc ggc	288
Val Arg Ala Ala Val Leu Asn Phe Ala Glu Val Gly Ser Glu Ser Gly	
85 90 95	
atc atg gtt gtt cgt ggt ctg tac gtg gat gag gac ctg gcc gac acc	336
Ile Met Val Val Arg Gly Leu Tyr Val Asp Glu Asp Leu Ala Asp Thr	

ccg	ctg	gat	100	aac	aag	agc	ggc	ctg	ggg	gcg	cgt	acc	gtt	ttt	gcg	aaa	384
Pro	Leu	Asp		Asn	Lys	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Arg	Thr	Val	Phe	Ala	Lys	
		115						120					125				
gag	atg	gcc	atg	ctg	gcg	cat	ctg	ctg	ggc	agc	atg	gtg	gcg	tac	gag		432
Glu	Met	Ala	Met	Leu	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Ser	Met	Val	Ala	Tyr	Glu		
		130					135					140					
gcg	gaa	ggc	aac	ggg	cat	ctg	att	caa	gac	atg	gtg	ccg	aat	ccg	aag		480
Ala	Glu	Gly	Asn	Gly	His	Leu	Ile	Gln	Asp	Met	Val	Pro	Asn	Pro	Lys		
		145				150					155				160		
ctg	gcg	gtc	acg	caa	caa	agc	cag	ggg	agc	aag	gtt	gag	ctg	gaa	gca		528
Leu	Ala	Val	Thr	Gln	Gln	Ser	Gln	Gly	Ser	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala		
			165						170						175		
cat	acc	gag	cag	tgc	ttc	agc	gac	ttc	aaa	ccg	gat	tat	gtt	att	ctg		576
His	Thr	Glu	Gln	Cys	Phe	Ser	Asp	Phe	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Ile	Leu		
			180					185					190				
ggg	gct	ctg	cgt	ggc	gac	gaa	aac	gcc	aac	acc	tat	gca	ttc	tcc	ggg		624
Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Glu	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly		
		195					200					205					
cgc	aaa	ctg	gtt	cag	cac	atg	tcc	gcc	gaa	gaa	gtg	gcg	aaa	ctg	cgc		672
Arg	Lys	Leu	Val	Gln	His	Met	Ser	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Arg		
		210					215					220					
caa	cct	ctg	tgg	gca	act	acc	atc	gat	gag	agc	ttt	caa	ccg	tac	att		720
Gln	Pro	Leu	Trp	Ala	Thr	Thr	Ile	Asp	Glu	Ser	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile		
					230						235				240		
ccg	aat	ccg	gac	gac	gtt	cgc	ggg	ccg	ttc	ccg	att	ctg	acg	ggc	cca		768
Pro	Asn	Pro	Asp	Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Gly	Pro			
			245					250					255				
gag	gac	gat	ccg	tac	atc	cgt	gta	gac	cag	gag	ctg	atg	cac	ggg	atc		816
Glu	Asp	Asp	Pro	Tyr	Ile	Arg	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Met	His	Gly	Ile		
			260					265					270				
acc	gcg	gac	gct	caa	cgc	ctg	ctg	cgc	aag	gtt	gtg	gat	acg	tat	atc		864
Thr	Ala	Asp	Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Ile		
		275					280						285				
gag	cac	cgc	gac	gcg	cat	gtc	ttg	cag	cct	ggg	gat	ctg	ctg	atg	ctg		912
Glu	His	Arg	Asp	Ala	His	Val	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Met	Leu		
		290				295					300						
gac	aat	ctg	cgt	gca	atg	cac	ggg	cgt	agc	atg	ttc	gct	ccg	cgt	ttt		960
Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Met	His	Gly	Arg	Ser	Met	Phe	Ala	Pro	Arg	Phe		
		305				310					315				320		
gac	ggc	aag	gat	cgt	ttc	att	gca	cgt	ggg	ttc	gtc	gtg	cgt	gat	cgt		1008
Asp	Gly	Lys	Asp	Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Val	Val	Arg	Asp	Arg		
			325						330				335				
cgt	aag	ttg	tgg	ccg	cag	ctg	ttg	gaa	gat	cgt	cgc	acc	ctg	ggg	gca		1056
Arg	Lys	Leu	Trp	Pro	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala		
			340					345					350				
gtc	cac	tcc	taa														1068
Val	His	Ser															
		355															

<210> 28

<211> 355

<212> PRT

<213> marine actinobacterium PHSC20C1

<400> 28

Met	Glu	Thr	Met	Ser	Ala	Ile	Ala	Pro	Ser	Lys	Ser	His	Leu	Ser	Asn
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Val	Ala	Arg	Ser	Lys	Glu	Ser	Asp	Ile	Thr	Val	His	Glu
			20					25					30		
Leu	Gln	Ser	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Glu	Ala	Ile
		35					40					45			
His	Thr	Ala	Ala	Glu	Arg	Ile	Thr	Ala	His	Pro	Asn	Glu	Asn	Pro	Asp
	50					55					60				
Asp	Phe	Gly	Arg	Gln	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu
65				70						75					80
Val	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Asn	Phe	Ala	Glu	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Gly
				85					90					95	
Ile	Met	Val	Val	Arg	Gly	Leu	Tyr	Val	Asp	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Thr
			100					105					110		
Pro	Leu	Asp	Asn	Lys	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Arg	Thr	Val	Phe	Ala	Lys
		115				120						125			
Glu	Met	Ala	Met	Leu	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Ser	Met	Val	Ala	Tyr	Glu
	130					135					140				
Ala	Glu	Gly	Asn	Gly	His	Leu	Ile	Gln	Asp	Met	Val	Pro	Asn	Pro	Lys
145					150					155					160
Leu	Ala	Val	Thr	Gln	Gln	Ser	Gln	Gly	Ser	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala
				165					170					175	
His	Thr	Glu	Gln	Cys	Phe	Ser	Asp	Phe	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Ile	Leu
			180					185					190		
Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Glu	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly
		195					200					205			
Arg	Lys	Leu	Val	Gln	His	Met	Ser	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Arg
	210					215					220				
Gln	Pro	Leu	Trp	Ala	Thr	Thr	Ile	Asp	Glu	Ser	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile
225					230					235					240
Pro	Asn	Pro	Asp	Asp	Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Gly	Pro
				245					250					255	
Glu	Asp	Asp	Pro	Tyr	Ile	Arg	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Met	His	Gly	Ile
		260						265					270		
Thr	Ala	Asp	Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Ile
		275					280						285		
Glu	His	Arg	Asp	Ala	His	Val	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Met	Leu
	290					295					300				
Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Met	His	Gly	Arg	Ser	Met	Phe	Ala	Pro	Arg	Phe
305					310					315					320
Asp	Gly	Lys	Asp	Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Val	Val	Arg	Asp	Arg
				325					330					335	
Arg	Lys	Leu	Trp	Pro	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala
			340					345					350		
Val	His	Ser													
		355													

<210> 29
 <211> 37
 <212> ADN

5

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PCR primer

10

<400> 29
 ttatcatatg aaatcacaat cattaattga agatgag

37

<210> 30

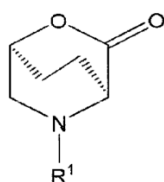
<211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 30
 10 tgtaatagct cgagagcctg atcaaaaact ttcctaaat g 41
 <210> 31
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 31
 20 attcacatat gtcctcgctg ttctcgact c 31
 <210> 32
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PCR primer
 30 <400> 32
 agcttctcga ggctgaagct ggctgcacg 30
 <210> 33
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 33
 40 ataatcatat gagacccta gacgtgacac cc 32
 45 <210> 34
 <211> 38
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PCR primer
 55 <400> 34
 aatagctcga gaaggtttgc caggtgagcg ctatatac 38
 <210> 35
 60 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 693 568 T3

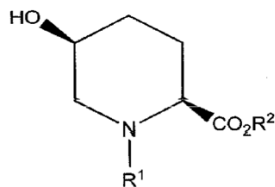
	<220>		
	<223> PCR primer		
	<400> 35		
5	ataatcatat gaattctaca caaatTTtag	30	
	<210> 36		
	<211> 32		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> PCR primer		
15	<400> 36		
	aatagctcga gaaaatgttg aaagTTTTa cc	32	
	<210> 37		
20	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> PCR primer		
	<400> 37		
	ataatcatat ggaaactatc attgaatcc	29	
30			
	<210> 38		
	<211> 33		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> PCR primer		
	<400> 38		
40	aatagctcga gttgtgtga atgaaacaat ttg	33	

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para producir un derivado de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, (en donde R1 representa un grupo protector para un grupo amino, y R2 representa un grupo alquilo C1-C6)



(1)

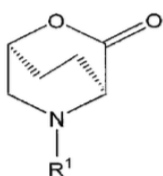


(2)

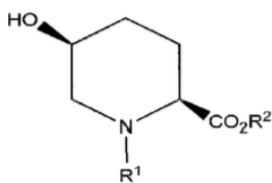
10 que comprende una etapa de reacción de ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido para convertir dicho ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto de Fórmula (1); o que comprende una etapa de reacción del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, y luego con un alcohol en la presencia de un catalizador ácido, para convertir dicho ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto de Fórmula (2).

- 15 **2.** Un método para regenerar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, comprendiendo dicho método los pasos de:

20 convertir el ácido 5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2) según el método de la reivindicación 1 (en donde R1 representa un grupo protector para un grupo amino, y R2 representa un grupo alquilo C1-C6); y
convertir el (los) compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2) en ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.



(1)

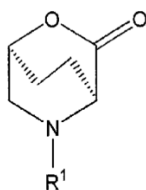


(2)

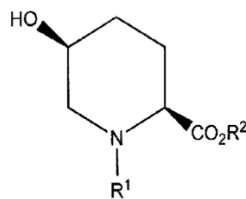
- 25 **3.** Un método para producir un derivado del ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según la reivindicación 1, en el que dicho ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico es ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico sintetizado por reacción bacteriana y / o reacción enzimática.

- 30 **4.** Un método para regenerar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según la reivindicación 2, en el que dicho ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico es ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico sintetizado por reacción bacteriana y / o reacción enzimática.

- 35 **5.** Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico, comprendiendo dicho método una etapa de reacción de una mezcla que contiene ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico y una impureza con un haluro de ácido y / o anhídrido de ácido, o con un ácido haluro y / o anhídrido de ácido y un alcohol, para convertir el ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico en un compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2), separando dicho(s) compuesto(s) y luego convirtiendo el (los) compuesto(s) separado(s) en ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.



(1)



(2)

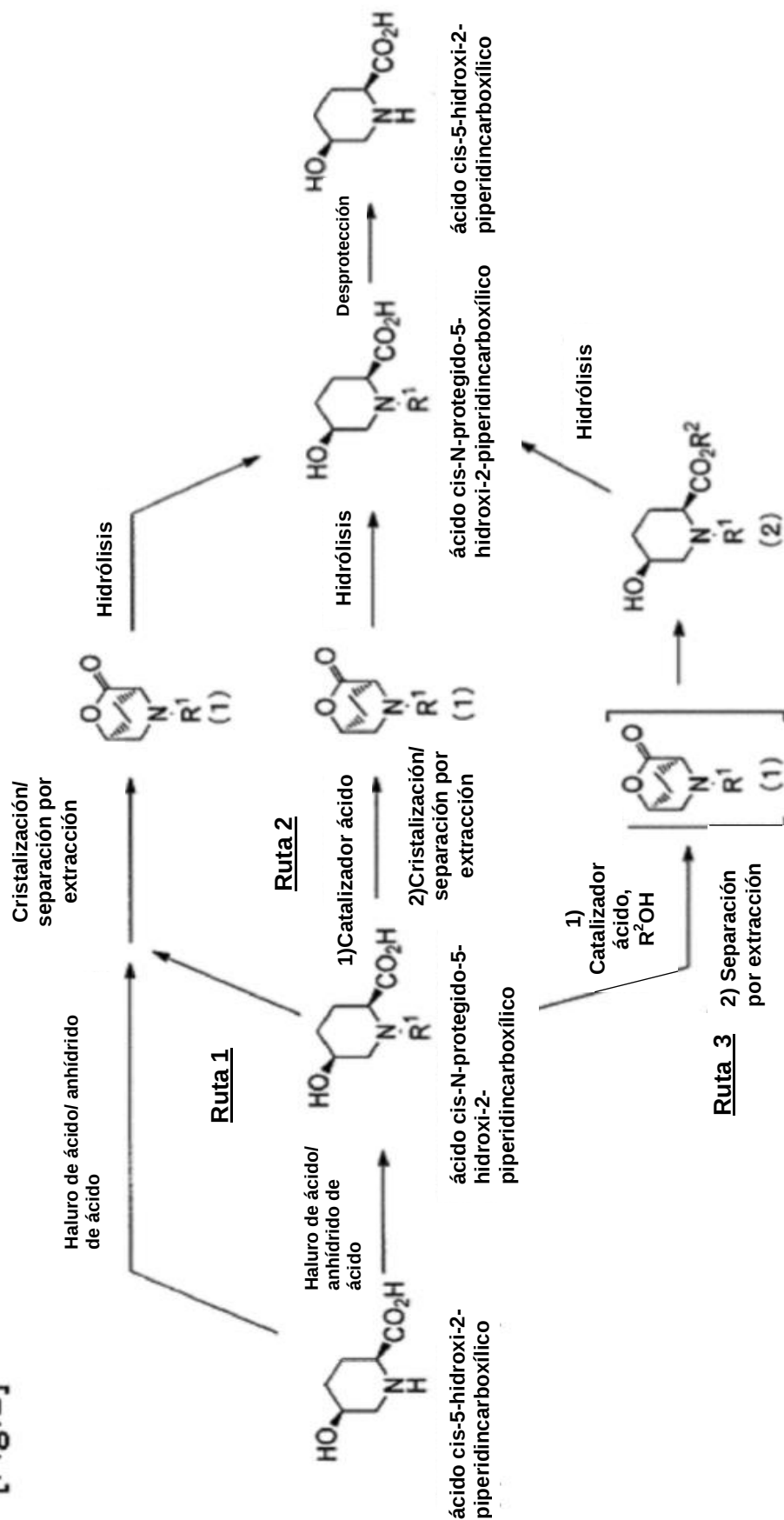
6. Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según la reivindicación 5, en el que dicha impureza es ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo.

7. Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según la reivindicación 6, en el que dicho ácido 2-piperidincarboxílico o un análogo del mismo es ácido trans-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico.

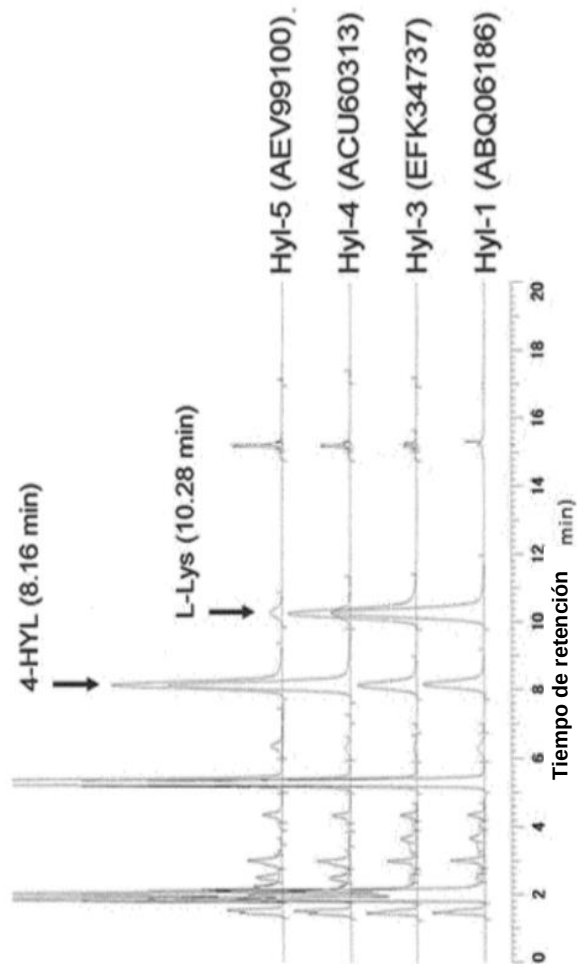
8. Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicha etapa de separación del compuesto(s) de Fórmula (1) y / o Fórmula (2) se lleva a cabo mediante cristalización o extracción con disolventes.

9. Un método para purificar ácido cis-5-hidroxi-2-piperidincarboxílico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicha mezcla que contiene ácido cis-5-hidroxi-2-piperidinacarboxílico y una impureza es una mezcla sintetizada por reacción bacteriana y / o enzimática.

[Fig. 1]



[Fig.2]



Enzima	Área de pico	
	4-HYL	L-Lys
Hyl-1 (ABQ06186)	709345	2141312
Hyl-3 (EFK34737)	705541	1884121
Hyl-4 (ACU60313)	2147495	273193
Hyl-5 (AEV99100)	1969822	163744

[Fig.3]

