

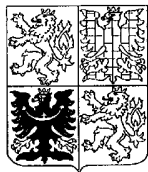
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 -3887

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.01.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.01.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/13388**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.02.2001**
(Věstník č. 2/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/JP00/00274**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/43360**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 319/28

C 07 C 323/63

(71) Přihlašovatel:

KANEKA CORPORATION, Osaka, JP;

(72) Původce:

Ueda Yasuyoshi, Hyogo, JP;

Murao Hiroshi, Hyogo, JP;

Yamashita Koki, Hyogo, JP;

Kinoshita Koichi, Hyogo, JP;

(74) Zástupce:

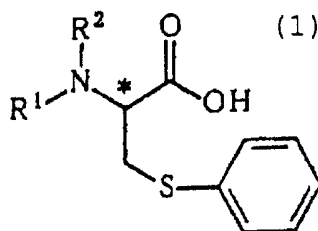
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob izolace N-chráněného-S-fenylcysteinu

(57) Anotace:

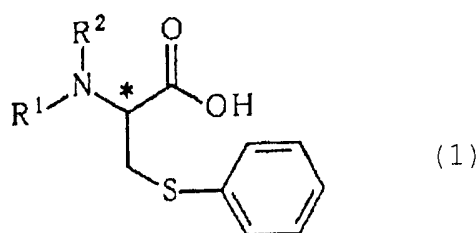
Způsob izolace vysoce čistého N-chráněného-S-fenylcysteinu obecného vzorce (1), kde R^1 je skupina chránící aminoskupinu; R^2 je atom vodíku, nebo skupina chránící aminoskupinu, která může být buď nezávislá na R^1 nebo může být tvořena spolu s R^1 . Způsob zahrnuje vysolení uvedeného N-chráněného-S-fenylcysteinu ve formě zásadité soli v přítomnosti vody.



Způsob izolace N-chráněného-S-fenylcysteinu

Oblast techniky

Předmětný vynález se týká způsobu izolace N-chráněného-S-fenylcysteinu obecného vzorce (1) [dále označovanému jako N-chráněný-S-fenylcystein (1)]. Jak bylo popsáno ve zveřejněné mezinárodní přihlášce číslo WO 96/23756 a ve zveřejněné přihlášce evropského patentu číslo EP 604185A1, jsou N-chráněné-S-fenylcysteiny, jako je N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cystein, důležité sloučeniny, protože jsou syntetickými meziprodukty inhibitorů HIV-proteasy.

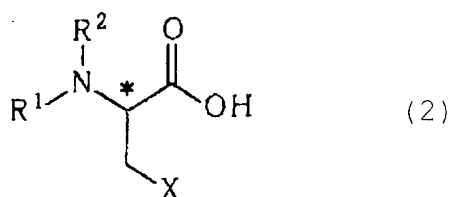


kde

- R^1 je skupina chránící aminoskupinu;
 R^2 je atom vodíku, nebo skupina chránící aminoskupinu, která může být buď nezávislá na R^1 nebo může být tvořena spolu s R^1 .

Dosavadní stav techniky

N-chráněný-S-fenylcystein (1) je možné syntetizovat například reakcí sloučeniny obecného vzorce (2):



kde

R^1 a R^2 mají shora uvedený význam;

X je odstupující skupina,

s thiofenolem v zásaditém prostředí tak, jak bylo popsáno v japonské patentové přihlášce číslo Hei-10-264397. Tak například N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcystein je možné syntetizovat reakcí N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu s thiofenolem ve vodném alkalickém roztoku.

Takto syntetizovaný N-chráněný-S-fenylcystein (1) je obvykle možné izolovat přidáním kyseliny do uvedeného zásaditého vodného roztoku N-chráněného-S-fenylcysteinu (1), čímž dojde k jeho vysrážení ve formě volné kyseliny. Podobný způsob je popsán v japonské přihlášce Kokai Hei-10-29973, podle kterého se k vodnému roztoku hydroxidu sodného obsahujícímu N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcystein přidává kyselina chlorovodíková aby došlo ke krystalizaci N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu ve formě volné kyseliny. Při tomto postupu je zásaditá sůl N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu (v tomto případě sodná sůl N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu), která je snadno rozpustná ve vodě, přeměněna okyselením na téměř nerozpustný volný N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcystein. Avšak jak je uvedeno ve zmíněných dokumentech, nevýhodou tohoto postupu je, že volný N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcystein má sklon k tvorbě

gelu během krystalizace, což brání tomu, aby docházelo k tvorbě kvalitních krystalů. K uvedeným problémům je třeba ještě přičíst to, že strukturně podobné sloučeniny znečišťující výsledný produkt není možné oddělit snadným způsobem. Z uvedených důvodů není možné dosud známé způsoby krystalizace N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) ve formě volné kyseliny považovat za účinné způsoby jeho izolace.

Podstata vynálezu

Předmětný vynález se týká způsobu izolace vysoce čistého N-chráněného-S-fenylcysteinu (1), výhodným a účinným způsobem, při kterém je dosahováno dobrých výtěžků.

Předmětný vynález se tedy týká způsobu izolace N-chráněného-S-fenylcysteinu (1), který zahrnuje vysolení N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) ve formě zásadité soli v přítomnosti vody.

Poprvé bylo zjištěno, že ve vodě rozpustnou zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) je možné snadno vysolit v přítomnosti vody, přičemž je dosahováno vysoké účinnosti, dobrého výtěžku a získaný produkt má vysokou čistotu.

Předmětný vynález je detailně popsán v následujících odstavcích.

Pojmem „zásaditá sůl“ používaným v tomto popisu ve spojení s N-chráněným-S-fenylcysteinem se rozumí taková sloučenina, ve které byl atom vodíku karboxylové skupiny N-chráněného-S-fenylcysteinu nahrazen kationtem jakým je kovový ion nebo amonný ion. Dále se pojmem „volný“ nebo „volná kyselina“ používaným v tomto popisu ve spojení s N-chráněným-

S-fenylcysteinem rozumí, že N-chráněný-S-fenylcystein netvoří sůl se žádnou zásaditou látkou; což lze vyjádřit rovněž tak, že kation, například kovový ion nebo amonný ion, zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu nebo sloučeniny v takovémto stavu byl nahrazen atomem vodíku.

Pojmem „vysolování“ (a „vysolení“) používaným v tomto popisu ve spojení se zásaditou solí N-chráněného-S-fenylcysteinu se rozumí, že dochází k oddělení uvedené zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu z vodného roztoku obsahujícího tuto sůl tak, že se do tohoto roztoku přidává jiná sloučenina (zejména anorganická sůl).

Ve shora uvedeném obecném vzorci (1) je R^1 skupina chránící aminoskupinu, R^2 je atom vodíku, nebo skupina chránící aminoskupinu, která je buď nezávislá nebo je tvořena spolu se substituentem R^1 .

Při způsobu podle předmětného vynálezu je důležité, aby S-fenylcystein obsahoval skupinu chránící aminoskupinu.

Výběr uvedené skupiny chránící aminoskupinu není nijak omezen a může být vybrána například z chránících skupin uvedených v publikaci *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2. vydání, John Wiley & Sons (1991) a dále jí může být například alkylová skupina, aralkylová skupina nebo arylová skupina.

Pokud je zvažována další derivatizace N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) používají se výhodně chránící skupiny uretanového nebo acylového typu, které jsou schopné maskovat bazicitu aminoskupiny. Jako konkrétní příklad takového chránící skupiny je možné mimo, jiné uvést, benzyloxykarbonylovou skupinu, ethoxykarbonylovou skupinu, methoxykarbonylovou skupinu, terc. butoxykarbonylovou skupinu, acetylovou skupinu, tosylovou skupinu, benzoylovou skupinu a

ftaloylovou skupinu. Dále je možné zvláště použít (3S)-tetrahydrofuranyloxykarbonylovou skupinu a 3-hydroxy-2-methylbenzoylovou skupinu, jejíž hydroxylová skupina může být také případně chráněna. Výhodně se používají chránicí skupiny uretanového typu, výhodněji se pak používají aralkyloxykarbonylové a nižší alkoxykarbonylové skupiny. Konkrétně se výhodně používá benzyloxykarbonylová skupina, terc. butoxykarbonylová skupina, methoxykarbonylová skupina a ethoxykarbonylová skupina, z nichž se ještě výhodněji používá benzyloxykarbonylová skupina. Jak bylo popsáno ve zveřejněné mezinárodní přihlášce číslo WO 96/23756 a ve zveřejněné přihlášce evropského patentu číslo EP 604185A1 je například v případě, že aminoskupina je ochráněna benzyloxykarbonylovou skupinou, N-chráněný-S-fenylcystein (1) důležitou sloučeninou, protože je syntetickým meziproduktem inhibitorů HIV-proteasy.

N-chráněný-S-fenylcystein (1) může být případně opticky aktivní sloučenina. I v případě, kdy se podle předmětného vynálezu použije takováto případně opticky aktivní sloučenina, je možné dosáhnou jejího vysolení bez ztráty její optické čistoty.

Skupina zásaditých solí N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) není nijak omezena a mimo jiné zahrnuje soli obsahující kov, jako jsou soli obsahující alkalické kovy, například soli obsahující lithium, soli obsahující sodík, soli obsahující draslík atd., soli obsahující kovy alkalických zemin a amonné soli N-chráněného-S-fenylcysteinu (1). Z těchto solí se výhodně používají soli obsahující kov, přičemž zvláště výhodně se používají soli obsahující alkalický kov, z nichž se nejvýhodněji používá sodná sůl.

Skupina zásad používaných pro konverzi N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) na odpovídající zásaditou sůl není nijak

konkrétně vymezena, ale zahrnuje mimo jiné hydroxidy alkalických kovů, uhličitany alkalických kovů, hydrogenuhličitany alkalických kovů, hydroxidy kovů alkalických kovů, uhličitany kovů alkalických zemin a amoniak. Výhodně se používají hydroxidy alkalických kovů, uhličitany alkalických kovů a hydrogenuhličitany alkalických kovů. Konkrétně je jako příklad takovýchto zásad možné uvést hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid lithný, uhličitan sodný, uhličitan draselný, uhličitan lithný, hydrogenuhličitan sodný a hydrogenuhličitan draselný, přičemž nejvýhodněji se používá hydroxid sodný.

Výhodný způsob konverze N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) na jeho zásaditou sůl zahrnuje reakci uvedeného N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) se shora uvedenou zásadou v neutrálním až zásaditém prostředí. Co se týče hodnoty pH, pro zachování stability skupiny chránící aminoskupinu by hodnota pH reakční směsi neměla nikdy být menší než 7, výhodně by hodnota pH reakční směsi neměla být menší než 8, výhodněji by hodnota pH reakční směsi neměla být menší než 9. Obecně lze říci, že reakci je možné výhodně provádět zhruba při pH v rozmezí od 9 do 11. Použití pH nižšího než 7 je nepřípustné, protože takováto hodnota pH vyvolává konverzi uvedené zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu na volný N-chráněný-S-fenylcystein. Dále je třeba v příkladech kdy skupinou chránící aminoskupinu je taková skupina, která není stálá v zásaditém prostředí, jako je trifluoracetylová skupina, vyloučit silně alkalické podmínky, jako je například hodnota pH 12 nebo vyšší.

Vysolování podle předmětného vynálezu probíhá v přítomnosti vody. Obecně je toto vysolování prováděno ve vodném roztoku N-chráněného-S-fenylcysteinu (1). Protože

N-chráněný-S-fenylcystein (1) je ve směsi přítomen ve formě jeho zásadité soli, provádí se vysolování výhodně v zásaditém prostředí.

V rozsahu, při kterém nedochází ke kolizi s uvedeným procesem, může tento vodný roztok obsahovat organické rozpouštědlo apod. Skupina těchto organických rozpouštědel zahrnuje, mimo jiné, estery kyseliny octové, jako je ethylacetát, isopropylacetát atd.; aromatické uhlovodíky, jejichž představitelem je toluen; alifatické uhlovodíky, jako je hexan, heptan atd.; ethery, jako je methyl terc. butylether, di-n-butylether, tetrahydrofuran atd.; alkoholy, jako je methanol; a ketony, jako je aceton, 2-butanon atd., bez jakéhokoli omezení na uvedené příklady. Přítomností uvedeného organického rozpouštědla v reakční směsi je možné usnadnit rozpouštění a odstranění nečistot rozpustných v tucích (lipofilních nečistot), které jsou v této reakční směsi obsaženy. Organické rozpouštědlo může být ve směsi přítomno od začátku vysolování nebo může být do směsi přidáno v okamžiku, kdy již došlo v dostatečném rozsahu k vysolení.

Aby bylo možné ze směsi vysolit zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu, musí být do této směsi přidána jiná sůl, kterou je výhodně anorganická sůl. Skupina uvedených anorganických solí zahrnuje, mimo jiné, soli alkalických kovů, jako je chlorid sodný, chlorid draselný, síran sodný, síran draselný atd.; síran amonný, chlorid amonný a chlorid vápenatý, bez jakéhokoli omezení na uvedené příklady. Z hlediska jednoduchého použití jsou výhodné soli alkalických kovů, přičemž ještě výhodněji se používá chlorid sodný a síran sodný. Ze všech shora uvedených solí se nejvýhodněji podle předmětného vynálezu používá chlorid sodný, což je, mimo jiné,

dáno jeho nízkou cenou, snadnou manipulovatelností, snadnou likvidací vzniklé odpadní vody, účinností vysolování zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu a vlastnostmi získané soli. Shora uvedenou sůl je možné přidávat do reakční směsi, nebo je možné využít výhody vzniku této soli přímo v reakční směsi při její neutralizaci.

Pro vysolování se výhodně používá sůl, která obsahuje kation, který je shodný s kationtem dané zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu. Tak například N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcystein se výhodně vysoluje ve formě jeho sodné soli a proto je solí používanou pro vysolování výhodně opět sodná sůl, jako je chlorid sodný, síran sodný apod., nejvýhodněji pak chlorid sodný.

Množství soli používané při vysolování podle předmětného vynálezu závisí kromě jiných faktorů na druhu této soli a množství zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu a není možné jej obecně definovat. Výhodně se však používá takové množství soli, které je dostatečné k dosažení dobrého výtěžku vysolení. Konkrétně je možné uvést, že množství anorganické soli přítomné ve směsi je výhodně takové, aby její koncentrace ve vodě byla přibližně 5 hmotnostních procent nebo více. Horní koncentrační hranicí je obecně bod nasycení. Tak například v případě použití chloridu sodného je možné vysolování provádět výhodně při koncentraci v rozmezí od přibližně 5 hmotnostních procent do bodu nasycení.

Koncentrace zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) není nijak konkrétně omezena, ale obecně nepřevyšuje 30 hmotnostních procent, výhodně je v rozmezí od 5 hmotnostních procent do 20 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody přítomné ve směsi.

Aby bylo možné uvedenou zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu snadno a účinně vysolit, je výhodné zajistit, aby daná směs obsahovala účinné množství jak zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, tak soli používané pro vysolování (tj. dostatečné množství potřebné pro vysolení). Proto se výhodně vysolování podle předmětného vynálezu provádí tak, že se;

i) zvyšuje množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, přičemž množství přítomné anorganické soli je udržováno konstantní,

ii) zvyšuje množství přítomné anorganické soli, přičemž množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu je udržováno konstantní,

iii) zvyšuje množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, přičemž množství přítomné anorganické soli je rovněž souběžně zvyšováno.

Teplota, při které dochází k vysolování, není nijak konkrétně omezena, ale může se pohybovat například v rozmezí od teploty tuhnutí směsi do přibližně 100 °C, výhodně v rozmezí od 0 °C do 60 °C. Postup podle předmětného vynálezu je možné výhodně provádět zejména v teplotním rozmezí od 10 °C do 50 °C.

Pokud k vysolování uvedené zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu (1) dochází poměrně obtížně, je možné do směsi přidat očkovací krystaly.

Jak již bylo uvedeno, japonská přihláška Kokai Hei-10-29973 popisuje postup, při kterém je zásaditý vodný roztok (jehož pH je od 10 do 11) obsahující zásaditou sůl (konkrétně sodnou sůl) N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu okyselován kyselinou chlorovodíkovou, čímž dochází ke krystalizaci N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu ve formě

volné kyseliny. Avšak koncentrace chloridu sodného v uvedeném zásaditém roztoku je menší než 3 hmotnostní procenta, což je množství, které není dostatečné pro dosažení vysolení uvedené sloučeniny ze směsi. Dále při okyselování uvedené zásadité soli (konkrétně sodné soli) N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu dochází k její konverzi na volnou kyselinu ještě před tím, než množství přítomné anorganické soli (tedy chloridu sodného) obsažené ve směsi je zvýšeno vlastní neutralizační reakcí, takže nedochází k vysolování uvedené zásadité soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenylcysteinu.

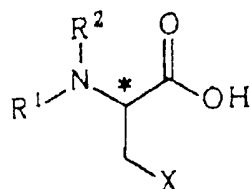
Způsob podle předmětného vynálezu je možné používat pro přečišťování volného N-chráněného-S-fenylcysteinu nebo pro oddělování N-chráněného-S-fenylcysteinu z reakční směsi ve formě jeho zásadité soli.

Pokud se pro uvedené účely použije například vodné médium obsahující dostatečné množství anorganické soli pro dosažení vysolení v zásaditém prostředí, může docházet ke vzniku zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu a zároveň k vysolování takto vzniklé zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu. I v tomto případě je opět možné přidáním očkovacích krystalů do směsi zrychlit tvorbu uvedené zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu a její současné vysolování.

Dále je možné syntetizovat N-chráněný-S-fenylcystein takovým způsobem, že syntéza probíhá v zásaditém prostředí, ve kterém dochází současně k vysolování vznikajícího N-chráněného-S-fenylcysteinu ve formě zásadité soli. Tento postup přispívá ke zlepšení výtěžku a/nebo kvality N-chráněného-S-fenylcysteinu, protože takto je možné zabránit rozkladu a racemizaci uvedeného N-chráněného-S-fenylcysteinu, který nemusí být stabilní v zásaditém prostředí. Dále je možné uvedenou zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu selektivně

vysolit z reakční směsi obsahující strukturní analogy a další nečistoty schopné tvořit soli s použitou zásadou, což vede k tomu, že vzniklý produkt je možné s vysokou účinností přečistit odstraněním uvedených nečistot do vodné fáze.

Konkrétně dochází ve vodném médiu, které obsahuje anorganickou sůl v množství, které je dostatečné k dosažení vysolení v zásaditém prostředí, k reakci sloučeniny obecného vzorce (2)



(2)

kde

R^1 a R^2 mají shora uvedený význam;

X je odstupující skupina,

s thiofenolem za vzniku N-chráněného-S-fenylcysteinu a k současnému vysolování tohoto N-chráněného-S-fenylcysteinu z reakčních směsí ve formě zásadité soli (takže je možné uvést, že vzniklý N-chráněný-S-fenylcystein je z reakční směsi odstraňován ve formě zásadité soli). Tímto způsobem je N-chráněný-S-fenylcystein, který nemusí být dostatečně stabilní v zásaditém prostředí, chráněn proti rozkladu a racemizaci, což se projevuje tím, že je možné získat ve vysokém výtěžku N-chráněný-S-fenylcystein o vysoké čistotě. Samozřejmě, že zásada, zásadité podmínky, anorganická sůl atd. používané při tomto způsobu jsou shodné s těmi, které byly popsány výše.

Skupina odstupujících skupin představovaných ve shora uvedeném obecném vzorci symbolem X není nijak konkrétně omezena a zahrnuje, mimo jiné, atom halogenu, například atom chloru; alkylsulfonyloxyskupiny obsahující od 1 do 10 atomů uhlíku, např. mesyloxyskupinu; arylsulfonyloxyskupiny obsahující od 6 do 10 atomů uhlíku, např. tosyloxyskupinu; aralkylsulfonyloxyskupiny obsahující od 7 do 10 atomů uhlíku; acetyloxyskupinu, trihaloacetyloxyskupinu a fosforylovou skupinu.

Při provádění vysolování podle předmětného vynálezu pro účely zlepšení kvality produktu je možné v tuku rozpustné (lipofilní) nečistoty rozpustit a odstranit tak, že se do směsi přidá organické rozpouštědlo (vybrané ze skupiny zahrnující, mimo jiné estery kyseliny octové, např. ethylacetát, isopropylacetát atd.; aromatické uhlovodíky, např. toluen; alifatické uhlovodíky, např. hexan, heptan atd.; ethery, např. methyl terc. butylether, di-n-butylether, tetrahydrofuran atd.; alkoholy, např. methanol; nebo ketony, např. aceton, 2-butanon atd.). Tento postup je účinný zejména pro vysolování z reakčních směsí, jako je například směs vzniklá při reakční krystalizaci. Uvedené organické rozpouštědlo může být ve směsi přítomné již od počátku vysolování nebo je možné přidávat uvedené organické rozpouštědlo do směsi v okamžiku, kdy vysolování již značně pokročilo.

Zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu vysolenou postupem podle předmětného vynálezu je možné izolovat jakoukoli separační technikou, jako je například filtrace. Izolovaná zásaditá sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu může být promyta vodou [výhodně například studenou vodou obsahující sůl používanou pro vysolování (například vodným roztokem chloridu

sodného)] nebo, v případě potřeby, uvedeným organickým rozpouštědlem, přičemž použité rozpouštědlo, jako je voda, může být odstraněno při atmosférickém nebo sníženém tlaku. Výtěžek vysolování podle předmětného vynálezu je obvykle alespoň 80 procent, výhodně alespoň 90 procent a ještě výhodněji přibližně 100 procent.

Vzniklou zásaditou sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu je možné neutralizovat kyselinou, jako je kyselina chlorovodíková a kyselina sírová, za vzniku volné formy N-chráněného-S-fenylcysteinu. Smísením uvedeného volného N-chráněného-S-fenylcysteinu s organickým rozpouštědlem je možné získat shora zmíněnou směs organického rozpouštědla a volného N-chráněného-S-fenylcysteinu. Právě uvedené organické rozpouštědlo může být vybráno ze skupiny zahrnující, mimo jiné, estery kyseliny octové, jako je ethylacetát, isopropylacetát atd.; aromatické uhlovodíky, jako je toluen; a ethery, jako je methyl terc. butylether, di-n-butylether, tetrahydrofuran atd, bez jakéhokoli omezení na uvedené příklady. Jen pro úplnost je třeba uvést, že uvedenou neutralizaci kyselinou je možné provádět rovněž v přítomnosti uvedeného organického rozpouštědla. Takto připravená směs organického rozpouštědla a volného N-chráněného-S-fenylcysteinu (např. toluenu a volného N-chráněného-S-fenylcysteinu) může být použita při další derivatizaci (například při esterifikaci alkoholem).

Popis obrázků na výkresech

Na obrázku 1 je infračervené absorpční spektrum (měřené v tabletě KBr) sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu získané podle předmětného vynálezu.

Na obrázku 2 je infračervené absorpční spektrum (měřené v tabletě KBr) volného N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

Na obrázku 3 je znázorněn časový průběh množství zbývajících sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu vyjádřeného v procentech při teplotě 40 °C.

Na obrázku 4 je graf závislosti rozpustnosti sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu na koncentraci chloridu sodného.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady, srovnávací příklady a referenční příklady jsou zde uvedeny pouze pro lepší ilustraci předmětného vynálezu a nijak neomezují jeho rozsah.

Kvantitativní analýzy provedené v následujících příkladech pro deriváty S-fenylcysteinu byly vždy prováděny pomocí zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), které byl vybaveno UV detektorem.

Příklad 1

Ke 137,8 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu bylo přidáno 56,4 gramu roztoku obsahujícího 30 hmotnostních procent hydroxidu sodného (tj. 1,0 mol na mol N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) ve 300 mililitrech vody, pH vzniklé směsi bylo upraveno na hodnotu 10,2 a směs byla míchána 1 hodinu při teplotě 40 °C za vzniku čirého roztoku. Následně bylo přidáno 73,5 gramu chloridu sodného (tj. 22 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) a míchání pokračovalo další 1 hodinu, přičemž během této doby došlo k oddělení krystalů. Krystaly byly odsáty a bylo získáno

312,2 gramu mokrých krystalů N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu. Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) bylo zjištěno, že výtěžek krystalizace byl 100 procent.

Referenční příklad 1

310,0 gramů mokrých krystalů sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu získaných v příkladu 1 bylo rozpuštěno v 700 mililitrech vody, která byla následně částečně odpařena při sníženém tlaku a teplotě přibližně 50 °C, takže byl získán koncentrát o hmotnosti 619,5 gramu, čímž došlo k oddělení krystalů. Získané krystaly byly odsáty, promyty 100 mililitry vody a bylo získáno 208 gramů mokrých krystalů.

Veškeré množství takto získaných mokrých krystalů bylo rozpuštěno v 600 mililitrech vody, která byla následně částečně odpařena při sníženém tlaku a teplotě přibližně 50 °C, takže byl získán koncentrát o hmotnosti 209,5 gramu. K tomuto olejovitému koncentrátu bylo přidáno 1000 mililitrů acetonu, čímž bylo dosaženo krystalizace. Vzniklé krystaly byly odsáty, promyty 200 mililitry acetonu a bylo získáno 88,8 gramů mokrých krystalů.

Tyto krystaly byly znovu rozpuštěny ve 400 mililitrech vody a následně rekrystalovány přidáním 2800 mililitrů acetonu. Vzniklé krystaly byly odsáty, promyty 1300 mililitry acetonu a nakonec sušeny ve vakuu (20 hodin při tlaku 0,133 kilopascalu až 3,99 kilopascalu (od 1 mm Hg do 30 mm Hg) a teplotě od 20 °C do 40 °C). Bylo získáno 44,5 gramu krystalů, které obsahovaly 43,8 gramu sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, což znamená, že jejich čistota byla 98,4 procenta (stanoveno vysokoúčinnou

kapalinovou chromatografií (HPLC) pro volný N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cystein a vypočítáno pro sodnou sůl).

Spektrum nukleární magnetické rezonance takto získané sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, měřené při frekvenci 400 megahertz v D₂O obsahující jako vnitřní standard 3-(trimethylsilyl)-propansulfonát sodný, obsahovalo následující signály:

δ (ppm): 3,19 (1H, dd, $J=8,1, 13,9$ Hz), 3,51 (1H, dd, $J=3,4, 13,9$ Hz), 4,15 (1H, dd, $J=3,4, 8,1$ Hz), 4,89-5,01 (2H, ABq, $J=12,4$ Hz), 7,2-7,4 (10H, m).

Infračervené absorpční spektrum (měřené v tabletě KBr) shora uvedené sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu je znázorněno na obrázku 1. Pro srovnání je na obrázku 2 infračervené absorpční spektrum (měřené v tabletě KBr) volného N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

Příklad 2

3 gramy krystalů sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu připravené v referenčním příkladu 1 byly použity při přípravě (A) roztoku této soli ve 30 mililitrech vody a (B) suspenze této soli ve 30 mililitrech vodného roztoku obsahujícího 20 hmotnostních procent chloridu sodného. Hodnota pH připraveného roztoku i suspenze byla upravena vodným roztokem obsahujícím 3 hmotnostní procenta hydroxidu sodného na 9,7 a obě směsi byly míchány při teplotě 40 °C. Z obou směsí byly sériově odebírány vzorky, ve kterých byla analýzou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) zjišťována koncentrace sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu

a bylo sledováno procento sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu zbývajících v roztoku.

Na obrázku 3 je znázorněn časový průběh množství sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu zbývajících v roztoku vyjádřený v procentech při teplotě 40 °C.

Výsledky shora uvedených měření prokázaly, že sodnou sůl N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, která je nestálá v zásaditém prostředí, je možné stabilizovat shora popsáním postupem vysolování.

Příklad 3

K 86,19 gramu vodného roztoku obsahujícího 7,47 gramu β -chloralaninu bylo během 1 hodiny za nepřetržitého míchání při teplotě přibližně 5 °C přikapáno 11,35 gramu benzyloxykarbonylchloridu (1,1 molu na mol β -chloralaninu), přičemž pH reakční směsi bylo pomocí vodného roztoku s obsahem 30 hmotnostních procent hydroxidu sodného udržováno na hodnotě 9,7. Reakce byla ponechána probíhat další 3 hodiny a na konci této doby byla reakční směs promyta 50 mililitry toluenu. Promytá reakční směs, jejíž hmotnost byla 89,53 gramu, obsahovala 15,52 gramu (100 procent) N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu.

K 88,27 gramu shora uvedené reakční směsi, která obsahovala 15,30 gramu N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu, bylo postupně přidáno 13,95 gramu chloridu sodného (takže jeho množství činilo 25 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) a 9,82 gramu thiofenolu (1,5 molu na mol N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu), který byl do směsi přikapán za nepřetržitého míchání v dusíkové atmosféře během 1 hodiny při teplotě 40 °C, přičemž pH reakční směsi bylo

pomocí vodného roztoku s obsahem 30 hmotnostních procent hydroxidu sodného udržováno na hodnotě přibližně 10.

S postupující reakcí docházelo ke krystalizaci N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, který byl produktem této reakce, a reakční směs připomínala svým vzhledem suspenzi. 148,97 gramu suspenze získané po 20 hodinách probíhání reakce obsahovalo 19,21 gramu (98 procentní výtěžek) N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

Příklad 4

K 5,0 gramům přečištěného N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu bylo postupně přidáno 32 gramů vody a chlorid sodný [A: 0,0 gramů (bez jakéhokoli přídavku) nebo B: 8,0 gramů (25 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody)]. Ke vzniklému roztoku bylo za nepřetržitého míchání v dusíkové atmosféře během 1 hodiny při teplotě 40 °C přikapáno 3,2 gramu thiofenolu (1,5 molu na mol N-benzyloxykarbonyl- β -chloralaninu), přičemž pH reakční směsi bylo pomocí vodného roztoku s obsahem 30 hmotnostních procent hydroxidu sodného udržováno na hodnotě přibližně 10. Reakce byla ponechána probíhat dalších 20 hodin a byl stanoven obsah N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu v reakční směsi.

Koncentrace chloridu sodného ve vodě a odpovídající výtěžky N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

	A hmotn. %	B hmotn. %
Koncentrace chloridu sodného (před reakcí)	0	25
Koncentrace chloridu sodného (po reakci)	3	28
Výtěžky N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu	89	97

V případě absence chloridu sodného (A) neměla reakční směs formu suspenze. Naopak k tvorbě suspenze docházelo v přítomnosti chloridu sodného (B).

Ze shora uvedených výsledků je patrné, že přidavek chloridu sodného podporuje vysolování vytvořené sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu a tím i její vyloučení z reakčního pole a účinnou ochranu vzniklého produktu proti rozkladu.

Srovnávací příklad 1

Ke 141,22 gramu suspenze produktu reakce připravené stejným postupem jako v příkladu 3 (která obsahovala 18,41 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) bylo za nepřetržitého míchání v dusíkové atmosféře během 5 hodin při teplotě přibližně 25 °C přikapáno 17,44 gramu koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3,0 moly na mol N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu), takže hodnota pH vzniklé suspenze byla 3. Aby bylo dosaženo důkladné krystalizace, byla směs dále míchána při stejné teplotě po dobu 3 hodin. Vzniklé krystaly byly odsáty a promyty vodou. Bylo získáno 26,11 gramu mokrých

krystalů, které obsahovaly 18,19 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu (99 procentní výtěžek krystalizace) a jejich zdánlivá čistota stanovená vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) činila 74,8 procenta celkové plochy píků.

Příklad 5

Ke 145,34 gramu reakční suspenze připravené stejným postupem jako v příkladu 3 (která obsahovala 18,73 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) bylo přidáno 65 mililitrů toluenu a vzniklá směs byla míchána v dusíkové atmosféře při teplotě přibližně 40 °C po dobu 1 hodiny. Vzniklé krystaly byly odsáty a takto získané mokré krystaly byly postupně promyty toluenem a nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny ve vakuu (20 hodin při tlaku 0,133 kilopascalu až 3,99 kilopascalu (od 1 mm Hg do 30 mm Hg) a teplotě od 20 °C do 40 °C). Bylo získáno 21,96 gramu krystalů, které obsahovaly 19,67 gramu sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu (99 procentní výtěžek krystalizace) a jejich zdánlivá čistota stanovená vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) činila 99,0 procent celkové plochy píků. Ve srovnání s případem, kdy docházelo ke krystalizaci N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu ve formě volné kyseliny (Srovnávací příklad 1) bylo množství nečistot zjištěných vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) extrémně malé, což dokazovalo, že je možné získat vysoce kvalitní N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cystein ve formě jeho zásadité soli.

Příklad 6

Během nepřetržitého přidávání chloridu sodného ke 190,89 gramu vodného roztoku (jehož pH mělo hodnotu 10,8) připraveného z 20,04 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu a 8,04 gramu (1,0 mol na mol N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) hydroxidu sodného byly odebírány vzorky tohoto roztoku a byla stanovována koncentrace v hmotnostních procentech (rozpuštěnost) sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, která zbyla v roztoku po odstranění krystalů. Graf závislosti rozpuštěnosti sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu na koncentraci chloridu sodného je znázorněn na obrázku 4.

Příklad 7

Ve 20 mililitrech vody bylo rozpuštěno 2,05 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu a 0,26 gramu (1,0 mol na mol N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) monohydrátu hydroxidu lithného. K tomuto roztoku bylo přidáno 7,08 gramu (35 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) chloridu lithného a vzniklá směs byla třepána po dobu 10 minut. Výsledkem bylo oddělení krystalů ze směsi.

Příklad 8

Ve 20 mililitrech vody bylo suspendováno 2,02 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu a k této suspenzi byl až do úplného rozpuštění přidáván vodný amoniak o koncentraci 28 hmotnostních procent, přičemž vzniklo 21,93 gramu vodného roztoku, jehož pH bylo 9,2. K tomuto roztoku bylo přidáno

1,01 gramu (5 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) chloridu amonného a vzniklá směs byla třepána po dobu 10 minut. Výsledkem bylo oddělení krystalů ze směsi.

Příklad 9

K 45,52 gramu vodného roztoku (jehož pH bylo 10,8), který obsahoval 5,04 gramu N-benzyl-S-fenylcysteinu a 2,38 gramu hydroxidu sodného (1,0 mol na mol N-benzyl-S-fenylcysteinu), bylo přidáno 9,71 gramu (24 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) chloridu sodného a směs byla míchána po dobu jedné hodiny. Výsledkem bylo oddělení krystalů ze směsi.

Srovnávací příklad 2

K 46,85 gramu vodného roztoku (jehož pH bylo 10,8), který obsahoval 5,12 gramu S-fenyl-L-cysteinu a 3,55 gramu hydroxidu sodného (1,0 mol na mol S-fenyl-L-cysteinu), bylo přidáno 12,29 gramu (30 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody) chloridu sodného. Výsledkem bylo, že nedošlo k vysolení sodné soli S-fenyl-L-cysteinu ani k vyvolání jakékoli změny stavu roztoku.

Z výše uvedeného výsledku vyplývá, že při provedení předmětného vynálezu je nezbytné, aby v molekule byla přítomna skupina chránící aminoskupinu.

Srovnávací příklad 3

K 62,31 gramu vodného roztoku, který obsahoval 4,55 gramu S-fenyl-L-cysteinu a jehož pH bylo přidáváním 30 procentního vodného roztoku hydroxidu sodného za nepřetržitého míchání při

teplotě 25 °C udržováno na hodnotě 11, bylo během 1 hodiny přikapáno 3,94 gramu benzyloxykarbonylchloridu (1,0 mol na mol S-fenyl-L-cysteinu). Směs byla ponechána reagovat dalších 12 hodin. Hmotnost výsledné směsi byla 67,19 gramu, její pH bylo 10,9 a obsahovala 7,12 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu (což odpovídalo koncentraci 10,6 hmotnostních procent a 93 procentnímu výtěžku). Koncentrace chloridu sodného v reakční směsi byla 2,7 hmotnostního procenta, vztaženo na hmotnost vody. U této reakční směsi nedocházelo k vysolování sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

Příklad 10

K 14,98 gramu krystalů sodné soli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu, které byly získány v příkladu 5 (a které obsahovaly 13,42 gramu čisté soli) bylo přidáno 50 mililitrů vody a 260 mililitrů toluenu a pH této směsi bylo koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou upraveno za neustálého míchání při teplotě 40 °C na hodnotu 1,8. Po oddělení fází byla vodná vrstva dána stranou a hmotnost izolované toluenové vrstvy byla 236,65 gramu. Uvedený toluenový roztok obsahoval 2,54 gramu (100 procentní výtěžek izolace) N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

K 235,14 gramu uvedeného toluenového roztoku (který obsahoval 12,46 gramu N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu) bylo přidáno 0,66 gramu monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové. Směs byla ponechána refluxovat po dobu 20 hodin, přičemž bylo použito celkem 25,99 gramu methanolu. Voda, která byla vedlejším produktem reakce byla průběžně azeotropicky oddestilována. Reakční směs byla ochlazená na

teplotu přibližně 30 °C, její hmotnost byla 91,99 gramu a obsahovala 12,50 gramu methylesteru N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cysteinu.

Příklad 11

Ve 160 mililitrech vody bylo rozpuštěno 15,7 gramu (98,1 milimolu) hydrochloridu β -chlor-L-alaninu. Po ochlazení roztoku na teplotu 0 °C až 5 °C bylo přikapáním 36 gramů 30 procentního vodného roztoku hydroxidu sodného za intenzivního míchání upraveno pH na hodnotu 10. Teplota směsi byla dále udržována v rozmezí od 0 °C do 5 °C a za intenzivního míchání k ní bylo během 1 hodiny přikapáno 20,5 gramu (120,0 milimolů) benzylochlorformiátu a směs byla ponechána míchat další 4 hodiny. Během probíhající reakce bylo přikapáváním celkem přibližně 16 gramů 30 procentního vodného roztoku hydroxidu sodného pH směsi udržováno v rozmezí od 9,5 do 10,5. Analýzou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) bylo prokázáno, že tato směs obsahovala 25,1 gramu (97,5 milimolu) N-karbobenzyloxy- β -chlor-L-alaninu.

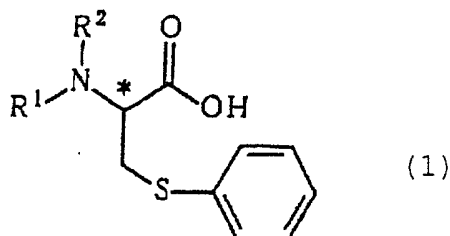
Ke shora uvedené reakční směsi bylo v dusíkové atmosféře za intenzivního míchání přikapáno 22,0 gramů (200,0 milimolů) thiofenolu. Během probíhající reakce bylo přikapáváním celkem přibližně 26 gramů 30 procentního vodného roztoku hydroxidu sodného pH směsi udržováno v rozmezí od 9,7 do 10,3. Teplota směsi byla následně zvýšena na 50 °C a reakce byla ponechána probíhat v dusíkové atmosféře další 3,5 hodiny. Během probíhající reakce bylo přikapáváním celkem přibližně 1 gramu 30 procentního vodného roztoku hydroxidu sodného pH směsi udržováno v rozmezí od 9,7 do 10,3. Během reakce docházelo k vysolování produktu, kterým byl N-karbobenzyloxy-S-fenyl-

L-cystein (neboli N-benzyloxykarbonyl-S-fenyl-L-cystein), ve formě jeho sodné soli, takže reakční směs postupně získala vzhled suspenze. Ke vzniklé suspenzi bylo postupně během 3 hodin přidáno v dusíkové atmosféře za intenzivního míchání přibližně 20 gramů koncentrované kyseliny chlorovodíkové, přičemž přidávání kyseliny bylo ukončeno po dosažení pH 3. Krystaly N-karbobenzyloxy-S-fenyl-L-cysteinu byly odsáty, promyty dvakrát 100 mililitry vody a důkladně zbaveny vody, čímž byly získány mokré krystaly N-karbobenzyloxy-S-fenyl-L-cysteinu, které obsahovaly 29,8 gramu (89,9 milimolu) čistého N-karbobenzyloxy-S-fenyl-L-cysteinu. Optická čistota získaného N-karbobenzyloxy-S-fenyl-L-cysteinu byla 99,9 procenta enantiomerního přebytku (e. e.).

Způsobem podle předmětného vynálezu, kterým byl popsán v předcházejících odstavcích, je možné výhodným a účinným způsobem izolovat vysoce kvalitní N-chráněný-S-fenylcystein, přičemž je zároveň dosahováno dobrých výtěžků.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob izolace N-chráněného-S-fenylcysteinu obecného vzorce (1)



kde

- R^1 je skupina chránící aminoskupinu;
 R^2 je atom vodíku, nebo skupina chránící aminoskupinu, která může být buď nezávislá na R^1 nebo může být tvořena spolu s R^1 ,

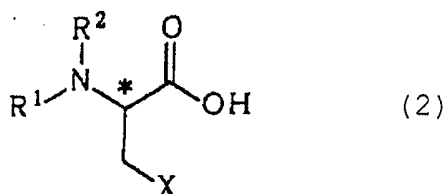
vyznačující se tím, že zahrnuje vysolení uvedeného N-chráněného-S-fenylcysteinu ve formě zásadité soli v přítomnosti vody.

2. Způsob izolace podle nároku 1 **vyznačující se tím, že** uvedené vysolování probíhá v zásaditém prostředí.
3. Způsob izolace podle nároku 1 nebo 2 **vyznačující se tím, že** solí použitou pro vysolování je anorganická sůl.
4. Způsob izolace podle nároku 3 **vyznačující se tím, že** uvedenou anorganickou solí je sůl alkalického kovu.
5. Způsob izolace podle nároku 4 **vyznačující se tím, že** uvedenou anorganickou solí je chlorid sodný nebo síran sodný.

6. Způsob izolace podle nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5 **vyznačující se tím, že** kation soli používané pro vysolování je shodný s kationtem obsaženým v zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, která má být vysolena.
7. Způsob izolace podle nároku 3, 4, 5 nebo 6 **vyznačující se tím, že** uvedená anorganická sůl se používá v množství, které je dostatečné pro dosažení vysolení.
8. Způsob izolace podle nároku 7 **vyznačující se tím, že** uvedená anorganická sůl se používá v koncentraci minimálně 5 hmotnostních procent, vztaženo na hmotnost vody.
9. Způsob izolace podle nároku 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8 **vyznačující se tím, že** vysolení zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu v přítomnosti uvedené anorganické soli je dosaženo tak, že se
- i) zvyšuje množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, přičemž množství přítomné anorganické soli je udržováno konstantní,
 - ii) zvyšuje množství přítomné anorganické soli, přičemž množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu je udržováno konstantní, nebo se
 - iii) zvyšuje množství přítomné zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu, přičemž množství přítomné anorganické soli je rovněž souběžně zvyšováno.
10. Způsob izolace podle nároku 7, 8 nebo 9 **vyznačující se tím, že** zahrnuje vytváření zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu ve vodném médiu, které obsahuje uvedenou

anorganickou sůl v množství, které je dostatečné pro dosažení vysolení v zásaditém prostředí, a současné vysolování takto vytvořené soli N-chráněného-S-fenylcysteinu.

11. Způsob izolace podle nároku 10 **vyznačující se tím, že** zahrnuje reakci sloučeniny obecného vzorce (2)



kde

- R^1 je skupina chránící aminoskupinu;
 R^2 je atom vodíku, nebo skupina chránící aminoskupinu, která může být buď nezávislá na R^1 nebo může být tvořena spolu s R^1 ;
 X je odstupující skupina,

s thiofenolem ve vodném médiu obsahujícím uvedenou anorganickou sůl v množství dostatečném pro dosažení vysolení v zásaditém prostředí, přičemž dochází ke vzniku N-chráněného-S-fenylcysteinu a současnému vysolování zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu z reakční směsi.

12. Způsob izolace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nebo 11 **vyznačující se tím, že** k vysolování dochází v přítomnosti očkovacích krystalů.

13. Způsob izolace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 nebo 12 **vyznačující se tím, že** při vysolování nebo po vysolování je ve směsi přítomno organické

rozpouštědlo pro rozpuštění a odstranění nečistot rozpustných v tuku.

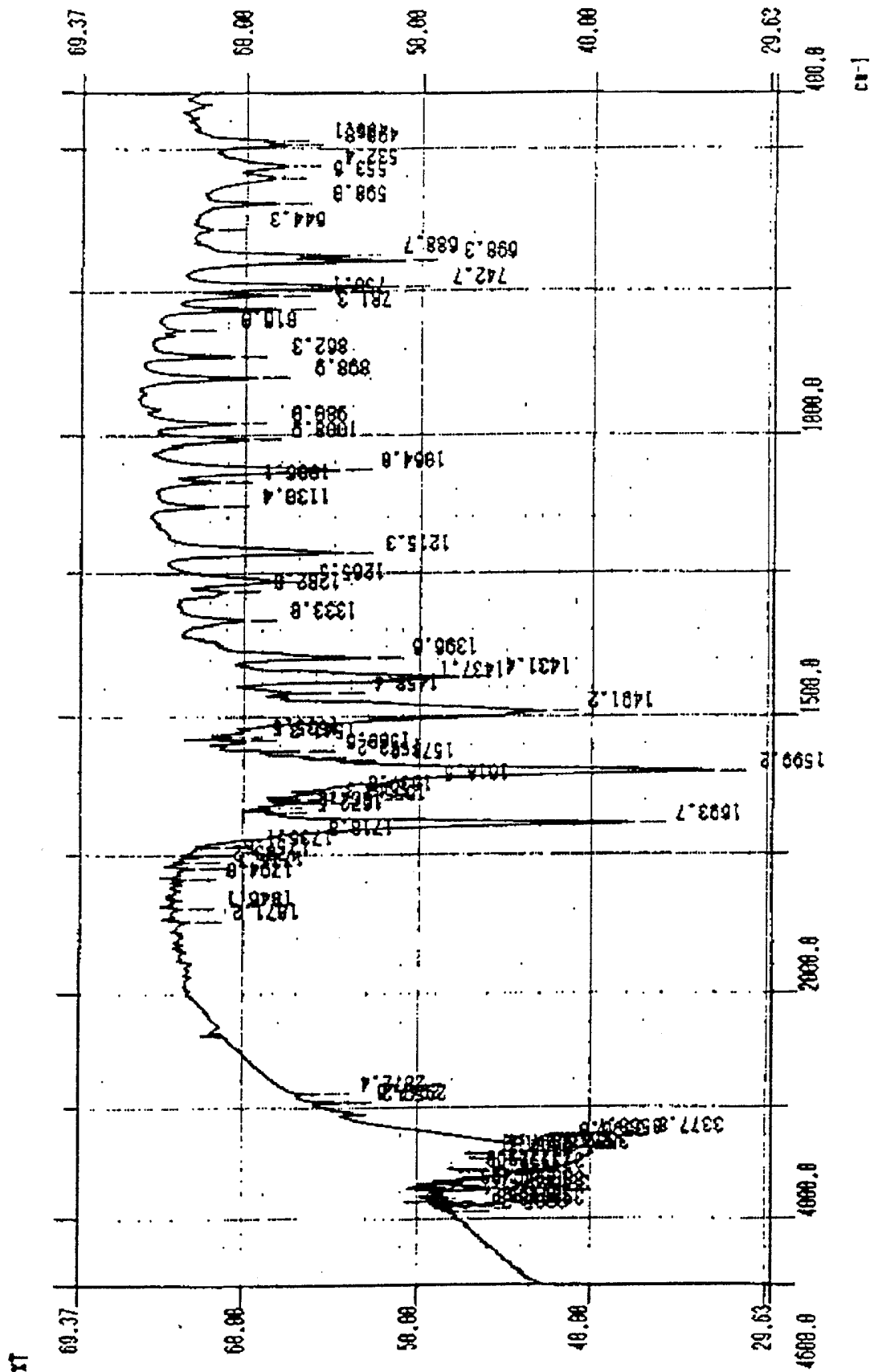
14. Způsob přípravy směsi organického rozpouštědla a volného N-chráněného-S-fenylcysteinu **vyznačující se tím, že** zahrnuje neutralizaci zásadité soli N-chráněného-S-fenylcysteinu pomocí kyseliny, přičemž uvedená sůl je získatelná způsobem izolace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13, za vzniku volného N-chráněného-S-fenylcysteinu a následné smíchání uvedeného volného N-chráněného-S-fenylcysteinu s organickým rozpouštědlem.
15. Způsob podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 nebo 14 **vyznačující se tím, že** zásaditou solí N-chráněného-S-fenylcysteinu je sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu obsahující kov.
16. Způsob podle nároku 15 **vyznačující se tím, že** solí N-chráněného-S-fenylcysteinu obsahující kov je sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu obsahující alkalický kov.
17. Způsob podle nároku 16 **vyznačující se tím, že** solí N-chráněného-S-fenylcysteinu obsahující alkalický kov je sodná sůl N-chráněného-S-fenylcysteinu.
18. Způsob podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nebo 17 **vyznačující se tím, že** skupinou chránící aminoskupinu je chránící skupina uretanového typu.

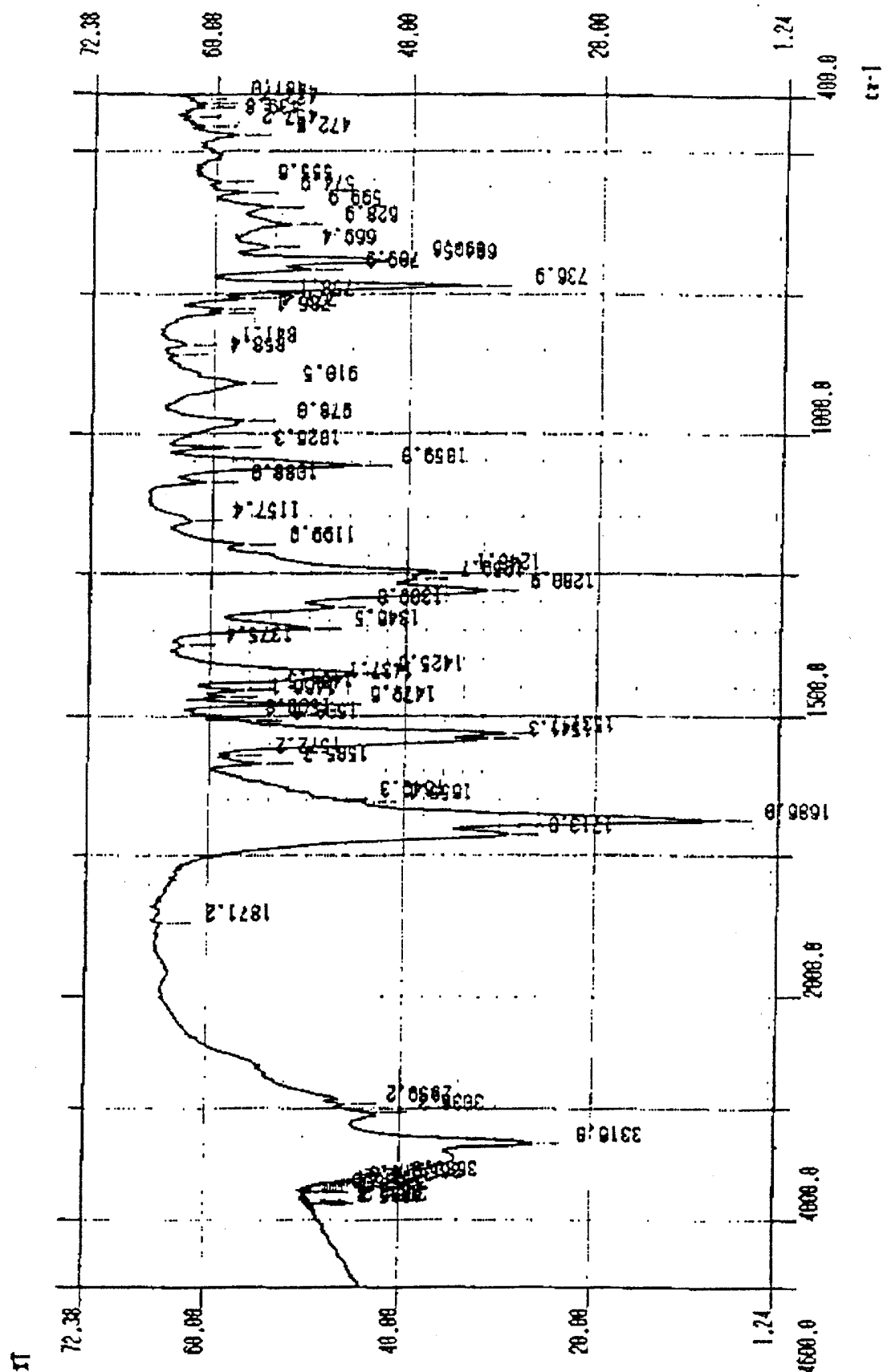
19. Způsob podle nároku 18 **vyznačující se tím, že** skupinou chránící aminoskupinu je aralkyloxykarbonylová skupina nebo nižší alkoxykarbonylová skupina.
20. Způsob podle nároku 19 **vyznačující se tím, že** skupinou chránící aminoskupinu je benzyloxykarbonylová skupina, terc. butoxykarbonylová skupina, methoxykarbonylová skupina nebo ethoxykarbonylová skupina.
21. Způsob podle nároku 20 **vyznačující se tím, že** skupinou chránící aminoskupinu je benzyloxykarbonylová skupina.

Zastupuje:

Dr. Miloš Všetečka

Fig. 1





19.10.00

Pl 2000-3886

3 / 3

