

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年12月24日 (24.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/106689 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/12, 17/04, C07C 323/58, 319/02, 319/14 // C07D 233/76
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07108
- (22) 国際出願日: 2003年6月5日 (05.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-164598 2002年6月5日 (05.06.2002) JP
特願2002-237698 2002年8月16日 (16.08.2002) JP
特願2003-67299 2003年3月12日 (12.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大石 孝洋 (OHISHI, Takahiro) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 難波 弘憲 (NANBA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 菅原 昌信 (SUGAWARA, Masanobu) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 泉田 将司 (IZUMIDA, Masashi) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 本田 達也 (HONDA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 森

耕平 (MORI, Kohei) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 柳澤 恵広 (YANAGISAWA, Satohiro) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 長嶋 伸夫 (NAGASHIMA, Nobuo) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 井上 健二 (INOUE, Kenji) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP).

- (74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE α -METHYLCYSTEINE DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 光学活性 α -メチルシステイン誘導体の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for conveniently producing on an industrial scale an optically active α -methylcysteine derivative or its salt in the form of an L- or D-compound, which is useful as an intermediate of a drug, etc., from a less expensive and easily available material. Namely, a process for producing an optically active α -methylcysteine derivative or its salt in the form of an L- or D-compound which comprises D-selectively cyclizing a racemic N-carbamoyl- α -methylcysteine derivative or its salt with the use of hydantoinase to give a D-5-methyl-5-thiomethylhydantoin derivative or its salt and N-carbamoyl- α -methyl-L-cysteine derivative or its salt, and then deblocking and hydrolyzing the amino group and the sulfur atom of each product.

(57) 要約: 本発明は、医薬品等の中間体として有用な、L体又はD体の光学活性 α -メチルシステイン誘導体又はその塩を、安価で入手容易な原料から、簡便かつ工業的に製造する方法を提供する。本発明は、ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩をヒダントイナーゼによってD体選択的に環化させて、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩及びN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩とし、次いで、それぞれのアミノ基、硫黄原子の脱保護及び加水分解を行うことによる、L体又はD体の光学活性 α -メチルシステイン誘導体又はその塩の製造方法である。



WO 03/106689 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

光学活性 α -メチルシステイン誘導体の製造方法

技術分野

- 5 本発明は、医薬品等の中間体として有用な、光学活性なL体又はD体の α -メチルシステイン誘導体又はその塩の製造方法に関する。

背景技術

10 光学活性なL体又はD体の α -メチルシステイン誘導体又はその塩の製造方法としては、以下の様な方法が知られている。

- 1) 光学活性システインとピバルアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉メチル化による方法 (WO 01/72702)。
- 2) 光学活性アラニンとベンズアルデヒドより得られる光学活性オキサゾロン化合物への不斉チオメチル化による方法 (J. Org. Chem., 1996, 6
15 1, 3350~3357)。
- 3) システインとシアノベンゼンより得られるチアゾリン化合物のメチル化を行い、得られたラセミ体のチアゾリン化合物をキラルHPLCにて分離精製する方法 (Synlett., 1994, 9, 702-704)。
- 4) 光学活性バリンとアラニンより合成される光学活性ジケトピペラジン化合物
20 を不斉プロモメチル化し、得られた化合物の臭素原子をアルカリ金属アルキルチオラートで置換する方法 (Synthesis, 1983, 37~38)。
- 5) 2-メチル-2-プロペン-1-オールのシャープレス不斉酸化により得られる光学活性な2-メチルグリシドールから光学活性アジリジンを合成し、これ
25 にチオールを反応させる方法 (J. Org. Chem., 1995, 60, 790~791)。
- 6) アミノマロン酸誘導体をメチル化した後に、豚肝臓エステラーゼ (以下PLEと略す) による非対称化を行い、得られた非対称エステルをチオ酢酸アルカリ金属塩と反応させる方法 (J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 8449~8450)。

スルフィドになりやすい。例えば、類似構造を有するシステインの場合、システインへの2量化は速やかに進行する（「タンパク質化学1、アミノ酸・ペプチド」共立出版、326ページ）。本化合物においても2量化が進行し、しかもジスルフィド体が一旦生成するとその除去は容易ではなく、製品中への混入を避けることは難しい。故に、ジスルフィド体の生成及び混入を高度に抑制したプロセスの構築も重要である。

このように、工業的に実施可能な、高品質の光学活性 α -メチルシステイン及びその塩を好適に結晶として晶析取得する方法の確立が強く望まれていた。

ところで、光学活性 α -メチルシステイン誘導体を簡便に製造するための従来技術とは異なる方法論の1つとして、ラセミ体の α -メチルシステイン誘導体を酵素的に分割して光学活性な α -メチルシステイン誘導体へと導く方法が考えられる。本方法論を実現するためには、光学分割に供するラセミ体 α -メチルシステイン誘導体の製造方法、並びに、高い光学分割能力を有する酵素反応の確立が重要である。さらには、酵素的光学分割に供するラセミ体 α -メチルシステイン誘導体の選定も大きなポイントとなる。

酵素的光学分割を用いる方法を実現するうえで、基質となるラセミ体 α -メチルシステイン誘導体は、簡便かつ効率的に製造できること、酵素の基質特異性に適合し、かつ高い立体選択性を得るための適切な保護基あるいは補助基を有すること、更には、酵素反応後に前記保護基あるいは補助基が簡単に除去できること、が要求される。このような観点からは、好適なラセミ体 α -メチルシステイン誘導体として、N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体を挙げる事ができる。

古くから、ヒダントインの開環加水分解酵素として知られているヒダントイナーゼは、N-カルバモイル- α -アミノ酸を対応する5-置換ヒダントインに変換する逆反応も触媒することが知られており、当該酵素を用いてラセミ体のN-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体のうち、一方の光学異性体のみを選択的にヒダントインに変換し、光学分割することが期待される。光学分割で得られた光学活性N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体は、脱カルバモイル化して容易に光学活性 α -メチルシステイン誘導体に変換できる。一方、光学

分割のもう一方の生成物である光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体は、光学活性 α -メチルシステイン誘導体の等価体であり、開環加水分解および脱カルバモイル化を経て光学活性 α -メチルシステイン誘導体（光学分割で直接得られるものとは逆の立体を有する）に導くことができる。

5 ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体は、一般的なアミノ酸の化学的合成法とN-カルバモイル化反応とを組み合わせることで製造することができるが、ラセミ体のN-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体を短工程かつ高収率で製造する方法は、未だ確立されていない。

一般的なラセミ体N-カルバモイル- α -二置換アミノ酸の製造方法としては、
10 Bucherer法により、アセトン誘導体をラセミ体5, 5-二置換ヒダントインに変換した後、これを加水分解することによりラセミ体 α -二置換アミノ酸誘導体とし（Agr. Biol. Chem., 1971, 35, 53-58）、
次いでシアン酸カリウムで処理してN-カルバモイル化する方法が知られている。
しかしながら、この方法では、ラセミ体5, 5-二置換ヒダントインのウレイレン基（-NHCONH-）をラセミ体N-カルバモイル- α -二置換アミノ酸誘導体のウレイド基（カルバモイルアミノ基：-NHCONH₂）として有効に利用することができず、また、3工程を要するなど、効率的な方法とは言い難い。

一方、ヒダントイン類を加水分解し、アミノ酸を経由せずカルバモイル体を製造する方法としては、塩基として水酸化カルシウムを用いて加水分解する方法が
20 知られている（US 5338859）。しかしながら、我々が、本特許記載の方法により、ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体の製造を試みたところ、わずか25%の収率でしか目的の化合物が得られないことがわかった。即ち、少ない工程で効率的に、かつ、高収率でラセミ体N-カルバモイル- α -二置換アミノ酸誘導体、特にラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体を製造する方法は確立されていない。
25

一方、ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体の酵素的光学分割に関しては、特開平1-124398号公報には、ラセミ体N-カルバモイル-アミノ酸誘導体にヒダントイナーゼを作用させ立体選択的に環化することにより分割を行う方法が記されているが、N-カルバモイル- α -メチルシステイ

ン誘導体の反応の可能性については、記載も示唆もない。

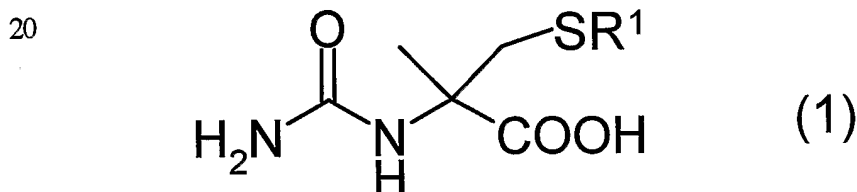
発明の要約

上記に鑑み、本発明の目的は、医薬品等の中間体として有用な、光学活性なL
5 体又はD体の α -メチルシステイン誘導体又はその塩を、安価で入手容易な原料
から簡便に製造でき、工業的生産に対して実用的な方法を提供することにある。

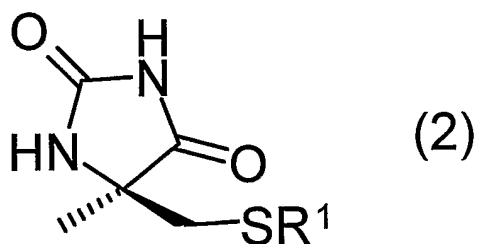
本発明者等は上記に鑑み鋭意検討を行った結果、ラセミ体N-カルバモイル-
 α -メチルシステイン誘導体又はその塩にヒダントイナーゼを作用させることによ
10 りD体選択的に環化させ、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導
体又はその塩及びN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はそ
の塩とし、次いでN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はそ
の塩の脱カルバモイル化と硫黄原子の脱保護を行うことにより α -メチル-L-
システイン誘導体又はその塩を得る方法を見出した。

また、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩の加水
15 分解及び硫黄原子の脱保護を行うことにより、 α -メチル-D-システイン誘導
体又はその塩を得る方法を見出した。さらには、上記方法の原料となるラセミ体
N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体を簡便かつ高収率で製造する方
法も確立し、本発明を完成するに至った。

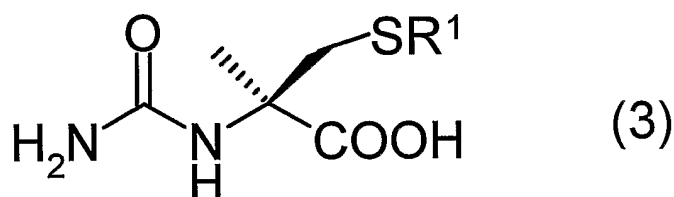
すなわち、本発明は、一般式(1)：



(式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基
25 を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有してい
ても良い炭素数6~20のアリール基を表す)で表されるラセミ体N-カルバモイ
ル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩に、ヒダントイナーゼを作用させD
体選択的に環化させることを特徴とする、一般式(2)：



- 5 (式中、 R^1 は前記と同じ) で表されるD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩、及び、一般式(3) :

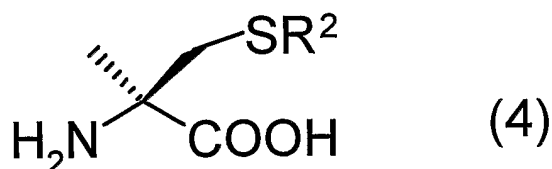


10

(式中、 R^1 は前記と同じ) で表されるN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の製造方法に関する。

また、本発明は、前記N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3) 又はその塩を脱カルバモイル化し、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行う

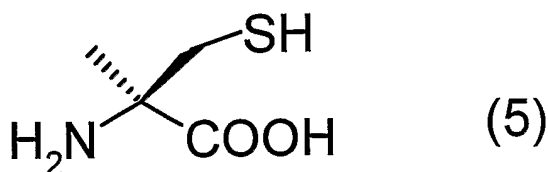
- 15 ことを特徴とする、一般式(4) :



- 20 (式中、 R^2 は前記 R^1 若しくは水素原子を表す) で表される α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の製造方法に関する。

また、本発明は、前記式(3)において R^1 が炭素数4~15の3級アルキル基であるN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩を酸で処理することにより、脱カルバモイル化と硫黄原子の脱保護を同時に行うことを特徴とする、一般式(5) :

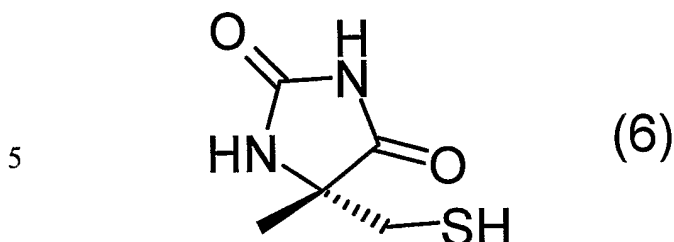
25



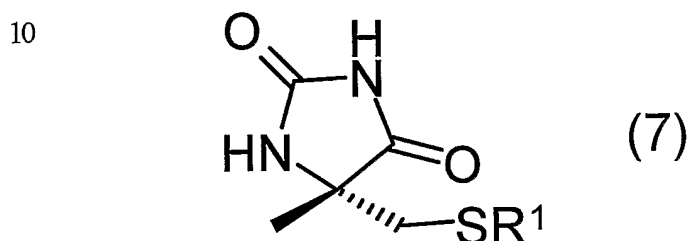
で表される α -メチル-L-システイン又はその塩の製造方法に関する。

また、本発明は、前記N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体

(3) 又はその塩の、環化及び硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式 (6) :

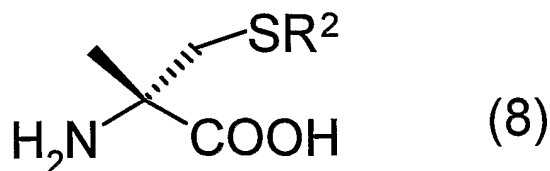


で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法、また、N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体 (3) 又はその塩を環化して、一般式 (7) :



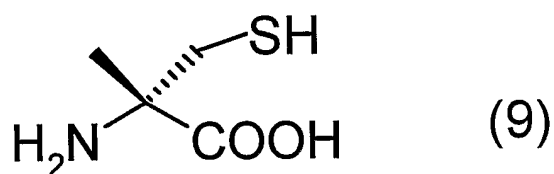
(式中、 R^1 は前記と同じ) で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩とし、次いで酸で処理することにより硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン (6) 又はその塩の製造方法に関する。

また、本発明は、前記 D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体 (2) 又はその塩を加水分解し、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式 (8) :



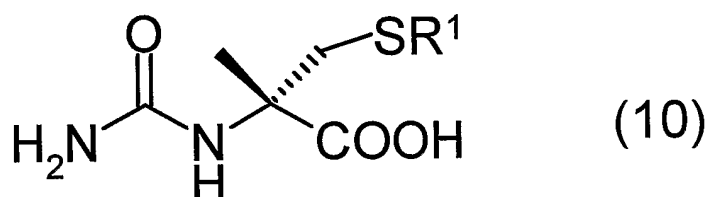
(式中、 R^2 は前記と同じ) で表される α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩の製造方法に関する。

また、本発明は、前記式 (2) において R^1 が炭素数 4 ~ 15 の 3 級アルキル基である化合物を、酸で処理することにより加水分解反応と硫黄原子の脱保護を同時に行うことを特徴とする、一般式 (9) :



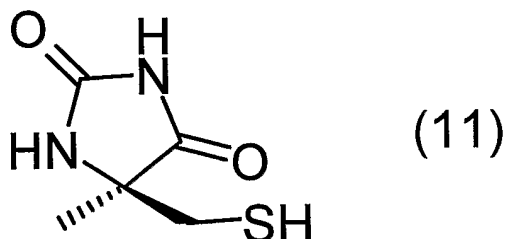
で表される α -メチル-D-システイン又はその塩の製造方法に関する。

- 5 また、本発明は、前記式 (8) において R^2 が R^1 と同じである α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩をカルバモイル化し、一般式 (10) :



10

(式中、 R^1 は前記と同じ) で表される N-カルバモイル- α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩とし、次いで、環化及び硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、下記式 (11) :



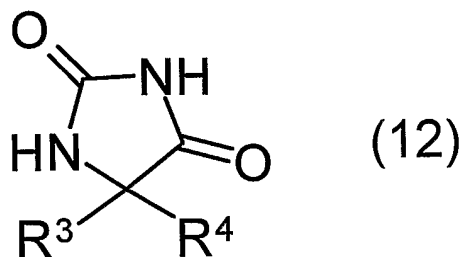
15

で表される D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法に関する。

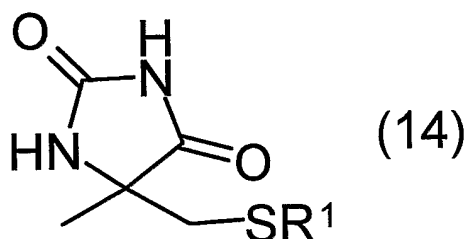
- 20 また、本発明は、前記式 (2) で表される化合物を酸で処理することにより、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、前記式 (11) で表される D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法に関する。これら光学活性 5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩は、加水分解することにより容易に光学活性 α -メチルシステインに変換することができ、光
- 25 学活性 α -メチルシステインと同様に、医薬等の合成中間体として好適に使用できる。

さらに、本発明は、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共存下にこれらの晶出を行うことを特徴とする、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の晶析方法にも関する。

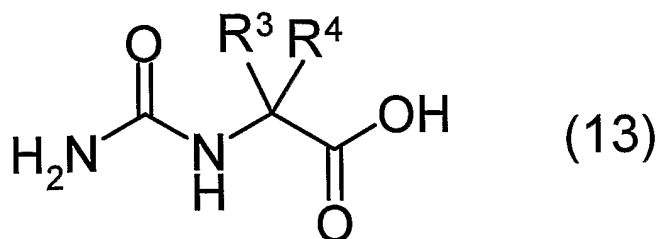
さらに、本発明は、下記式 (12) :



(式中、 R^3 、 R^4 はそれぞれ独立して置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体又はその塩、とりわけ下記式 (14) :



(式中、 R^1 は前記と同じ) で表されるラセミ体5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩を、有機塩基又はアルカリ金属水酸化物を用いて加水分解を行うことを特徴とする、下記式 (13) :



(式中、 R^3 、 R^4 は前記と同じ) で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体又はその塩、とりわけ、前記式 (1) で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩の製造方法にも関する。

さらに、本発明は、前記式 (1) で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩；前記式 (3) 又は (10) で表されるL体

又はD体の光学活性N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩；前記式(2)又は(7)において R^1 が炭素数4~15の3級アルキル基である、D体又はL体の光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩；前記式(4)又は(8)において、 R^2 が置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基である、L体又はD体の光学活性 α -メチルシステイン誘導体又はその塩；前記式(6)又は(11)で表されるL体又はD体の光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩に関する。

10

発明の詳細な開示

以下、本発明を詳細に説明する。まず、本発明の化合物について説明する。

本発明に用いるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体(1)において、 R^1 は、置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す。

炭素数1~20のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基等の直鎖アルキル基、イソプロピル基、イソブチル基、t-ブチル基、ネオペンチル基、t-ペンチル基、t-ヘキシル基等の分枝アルキル基等が挙げられ、好ましくは炭素数1~10のアルキル基である。

炭素数7~20のアラルキル基としては、例えばベンジル基、p-メトキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基等が挙げられ、好ましくは炭素数7~15のアラルキル基である。

炭素数6~20のアリール基としては、例えばフェニル基、ナフチル基等が挙げられ、好ましくは炭素数6~15のアリール基である。

上記アルキル基、アラルキル基、アリール基は、それぞれ無置換であってもよく、また置換基を有していてもよい。置換基としては、アミノ基、ヒドロキシル基、アリール基、アルカノイル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン原子等が挙げられる。

当該置換基としてのアリアル基としては、例えばフェニル基、ナフチル基、p-メチルフェニル基、m-メチルフェニル基、o-メチルフェニル基等の炭素数6~15のアリアル基が挙げられる。アルカノイル基としては、例えばアセチル基、プロパノイル基、ブタノイル基等の炭素数2~10のアルカノイル基が挙げられる。アルケニル基としては、例えばエテニル基、プロペニル基等の炭素数2~10のアルケニル基が挙げられる。アルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基等の炭素数2~10のアルキニル基が挙げられる。アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基等の炭素数1~10のアルコキシ基が挙げられる。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

上記R¹の中でも、脱保護の容易さ及びヒダントイナーゼによる立体選択的環化反応の反応性の点からは、置換基を有していても良い炭素数4~15の3級アルキル基が好ましい。具体的には、t-ブチル基、t-ペンチル基、t-ヘキシル基等が挙げられ、より好ましくはt-ブチル基である。

ラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体(13)において、R³、R⁴は、それぞれ独立して置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリアル基を表す。炭素数1~20のアルキル基、炭素数7~20のアラルキル基、炭素数6~20のアリアル基としては、上記R¹の説明で挙げた基と同様の基を挙げることができる。

上記アルキル基、アラルキル基、アリアル基は無置換であってもよく、置換基を有していても良い。置換基としては、前記R¹の説明で挙げた置換基に加え、下記式(15)：



で表される置換チオ基を挙げることができる。ここで、R¹は上記と同じであり、その好ましい具体例も上記と同じである。

後述するように、対応するヒダントインを加水分解して前記化合物(13)を調製するうえでは、加水分解反応の反応性の観点から、R³、R⁴としては置換基を有していてもよい炭素数1~6のアルキル基が好ましく、具体的には、メチ

ル基、エチル基、プロピル基、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基等が挙げられ、 R^3 、 R^4 の少なくとも一方がメチル基であるのがより好ましい。言うまでもなく、化合物(13)において、 R^3 、 R^4 の一方がメチル基、他方が、前記置換チオ基(15)で置換されたメチル基の場合、化合物(1)を表す。

- 5 ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体(1)及びラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体(13)は塩であってもよく、塩は、塩基との塩を表す。塩基との塩は、特に限定されないが、例えば、アルカリ金属水酸化物(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等)との塩；アルカリ土類金属水酸化物(水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等)との塩等が
- 10 挙げられる。好ましくは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムとの塩である。

前記式(2)、(7)又は(14)で表されるラセミ及び光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体において、 R^1 は、前記式(1)で表される化合物において定義したものと同一である。

- 前記式(12)で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体において、 R^3 、 R^4 は、前記式(13)で表される化合物において定義したものと同様である。言うまでもなく、化合物(12)において、 R^3 、 R^4 の一方がメチル基、他方が前記置換チオ基(15)で置換されたメチル基の場合が、化合物(14)である。
- 15

- これら5, 5-二置換ヒダントイン誘導体は塩であってもよく、塩は、塩基との塩を表し、ヒダントイン環のイミド基上での塩を表す。塩基との塩は、特に限定されないが、例えば、アルカリ金属水酸化物(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等)との塩；アルカリ土類金属水酸化物(水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等)との塩等が挙げられる。好ましくは、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムとの塩である。
- 20

- 前記式(3)又は(10)で表される光学活性N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体において、 R^1 は前記と同じである。これら光学活性N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体は塩であってもよく、塩の種類は、前記式(1)で表される化合物の場合と同様である。
- 25

前記式(4)及び(8)で表される光学活性 α -メチルシステイン誘導体にお

いて、 R^2 は、 R^1 若しくは水素原子を表す。当該 R^1 は、置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表し、前記式(1)で表される化合物で定義したものと同一である。これら光学

5 活性 α -メチルシステイン誘導体は塩であってもよく、塩としては、酸との塩、塩基との塩が挙げられる。酸としては、ハロゲン化水素酸(塩酸、臭化水素酸、フッ化水素酸等)、スルホン酸(メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸等)、硫酸、硝酸、カルボン酸(ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、トリフルオロ酢酸等)等が挙げられる。塩基としては、有機塩基(アンモニア、トリエチルアミン、アニリン、ピリジン等)、アルカリ金属水酸化物(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等)、アルカリ土類金属水酸化物(水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等)等が挙げられる。

10 前記式(6)又は(11)で表される光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントインは、塩であってもよく、塩の種類は、前記式(1)で表される化合物の場合と同様である。

次に、前記式(1)及び(13)で表される化合物の製造法について詳細に記載する。ラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体(13)又はその塩は、前記式(12)で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体又はその塩を、有機塩基又はアルカリ金属水酸化物を用いて加水分解することにより製造

20 することができる。

原料となるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体(12)又はその塩は、対応するケトンから当業者周知のBucherer法により合成することができる。

本製法においては、塩基として有機塩基又はアルカリ金属水酸化物を用いて加水分解する。当該有機塩基としては、特には限定されないが、例えばメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、アニリン等が挙げられる。これら有機塩基は、それぞれ単独で用いても良いし、2種類以上混合して用いても良い。

上記アルカリ金属水酸化物としては、例えば水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化セシウム等が挙げられる。これらアルカリ金属水酸化物は、それぞれ単独で用いても良いし、2種類以上混合して用いても良い。

上記加水分解に用いる塩基は、収率、経済性の点から、好ましくはアルカリ金属水酸化物であり、より好ましくは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムである。

塩基の使用量としては、特には限定されないが、基質に対して、好ましくは1～10モル当量、より好ましくは2～5モル当量である。

反応溶媒は、水単独でも良いし、水と有機溶媒を混合して用いても良い。

上記溶媒として水と混合する有機溶媒は、特には限定されないが、炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、エーテル系溶剤、アルコール系溶剤、ニトリル系溶剤、アミド系溶剤等が挙げられる。好ましくは炭化水素系溶剤である。

上記炭化水素系溶剤としては、特には限定されないが、例えばトルエン、ベンゼン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン等が挙げられ、これらのいずれか一種を単独で用いても良いし、又は二種以上を任意の割合で混合して用いても良い。好ましくはトルエンである。

エステル系溶剤としては、ギ酸エチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、プロピオン酸メチル等が挙げられる。

エーテル系溶剤としては、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、メチルtertブチルエーテル等が挙げられる。

アルコール系溶剤としては、メタノール、エタノール、1-プロパノール、イソプロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール等が挙げられる。

ニトリル系溶剤としては、アセトニトリル、プロピオニトリル等が挙げられる。

アミド系溶剤としては、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等が挙げられる。

反応に用いる水は、基質に対して、好ましくは0.1倍～100倍重量であり、収率、容積効率の点から、より好ましくは0.1倍～10倍重量、さらに好ましくは0.2～3倍重量である。

また、基質に対して、水を0.2倍～3倍重量、塩基を2～5モル当量使用する場合に、最も反応は収率良く進行する。

反応温度は、基質の種類、試材量に依存するので一概に言えないが、50℃～150℃の条件から選択でき、好ましくは80℃～110℃、より好ましくは85℃～100℃である。

反応時間は、基質の種類、試材量、反応温度に依存するので一概に言えないが、1～50時間反応させるのが好ましく、収率良く生成物を得るには、より好ましくは2～24時間である。

反応後の後処理としては、このまま、次の反応に用いても良いし、酸を加えて中和した後に、抽出、精製により単離してもよい。また、反応混合物をろ過して該化合物を単離してもよい。

10 前記式(1)で表される化合物は上記と同様にして、チオアセトン誘導体から Bucherer 法にて前記式(14)で表されるラセミ体5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体を製造し、これを加水分解することにより製造することができる。

次に、ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体(1)又はその塩を、ヒダントイナーゼによってD体選択的に環化反応させ、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩及びN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩を合成する方法について説明する。

ここでヒダントイナーゼとは、5-置換ヒダントイン誘導体又はその塩を加水分解してN-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体を生成する活性を有する酵素である。また、本酵素は、一般に、加水分解反応の逆反応として、N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体を環化して5-置換ヒダントイン誘導体を生成することが知られている(特開平1-1243989号公報)。

本発明で用いるD体選択的な環化反応を触媒するヒダントイナーゼとしては、動物、植物、又は、微生物由来のいずれでも使用できるが、工業的な利用には微生物由来のものが好ましい。酵素源となる微生物としては、当該酵素の生産能力を有する微生物であればいずれも利用できるが、例えば、以下の公知の、当該酵素の生産能力を有する微生物を挙げることができる。

例えば、細菌に属するものとしてはアセトバクター属 (Acetobacte

r)、アクロモバクター属 (*Achromobacter*)、アエロバクター属 (*Aerobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、エシェリヒア属 (*Escherichia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、マイクロバクテリウム属 (*Microbacterium*)、マイクロコッカス属 (*Micrococcus*)、プロタミノバクター属 (*Protaminobacter*)、プロテウス属 (*Proteus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、サルチナ属 (*Sartina*)、セラチア属 (*Serratia*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*) 等；放線菌に属するものとしてはアクチノミセス属 (*Actinomyces*)、ミコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*) 等；かびに属するものとしてはアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、パエシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 等；酵母に属するものとしてはキャンディダ属 (*Candida*)、ピキア属 (*Phichia*)、ロードトルラ属 (*Rhodotulula*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*) 等が挙げられる。

好ましくは、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) に属する微生物由来の酵素が挙げられる。

より好ましくは、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、バチルス・スピーシーズ (*Bacillus* sp.) KNK245 (FERM BP-486

3)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IF O12996、シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas sp.*) KNK003A (FERM BP-3181) 又はリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium sp.*) KNK1415由来の酵素が挙げられる。

5 なお、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium sp.*) KNK712は、FERM BP-1900の受託番号で、1988年5月31日付で；バチルス・スピーシーズ (*Bacillus sp.*) KNK245は、FERM BP-4863の受託番号で、1994年11月2日付で；シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas sp.*) KNK00
10 3Aは、FERM BP-3181の受託番号で、1990年12月1日付で；それぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

15 上記微生物は野生株であってもよく、また、変異処理によってヒダントイナーゼ活性が高められた変異株であってもよい。さらに、遺伝子組換え等の方法を用いて、上記微生物由来のヒダントイナーゼを高生産するように作成された形質転換微生物であってもよい。

20 ヒダントイナーゼを効率良く高生産する形質転換微生物の作成方法としては、例えばWO96/20275記載のように、ヒダントイナーゼ活性を示す菌株からヒダントイナーゼ遺伝子をクローニングした後、適当なベクターとの組換えプラスミドを作成して、これを用いて適当な宿主菌を形質転換することで得られる。なお、組換えDNA技術については当該分野において周知であり、例えば、*Molecular Cloning 2nd Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、*Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates and
25 *Wiley-Interscience*) に記載されている。

このようにして得られた、ヒダントイナーゼを高生産する形質転換微生物としては、WO96/20275記載の、バチルス・スピーシーズ (*Bacillu*

s sp.) KNK245 (FERM BP-4863) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pTH104 (FERM BP-4864)、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pAH1043 (FERM BP-4865)、又はシュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pPHD301 (FERM BP-4866) を挙げることができる。

なお、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pTH104 は、FERM BP-4864 の受託番号で、1994年11月2日付で；エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pAH1043 は、FERM BP-4865 の受託番号で、1994年11月2日付で；エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pPHD301 は、FERM BP-4866 の受託番号で、1994年11月2日付で；それぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

前述のヒダントイナーゼ活性を示す微生物、或いは、上記形質転換微生物によるヒダントイナーゼの生産は、例えば、WO96/20275 に記載されているように、通常の栄養培地を用いて培養を行えば良く、必要に応じて、酵素誘導のための処理を行うこともできる。酵素誘導は、例えば、培地にウラシルを添加して培養することにより行うことができる。

本発明において、上記微生物によって生産されたヒダントイナーゼは、酵素自体として用いることができるほか、本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物としても用いることができる。ここで、微生物の処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、又はそれらの菌体の破砕物

を意味する。

さらにそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化して得た固定化酵素として用いられ得る。なお、酵素を固定化して安定化することで、酵素反応を、より過酷な温度域で行うこと等が可能となり、反応をより効率的に進行させることができる。さらに、酵素の反復使用が可能となること、製造プロセスが簡略化できる等による製造コストの低減等のメリットも期待できる。

固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、物理的吸着法、包括法等で行い得る。酵素の固定化に使用される支持体としては、例えば、Duolite A-568又はDS17186（ローム・アンド・ハース社：登録商標）等のフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、Amberlite IRA935、IRA945、IRA901（ローム・アンド・ハース社：登録商標）、Lewatit OC1037（バイエル社：登録商標）、Diaion EX-05（三菱化学：登録商標）等のポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種の陰イオン交換樹脂が適している。その他、DEAE-セルロース等の支持体も使用することができる。

固定化酵素の好適な製造方法としては、例えば、WO96/20275に示す方法で行い得る。すなわち、ヒダントイナーゼ活性を有する菌株の培養液を集菌し、超音波等により菌体を破碎後、得られた酵素液に例えば陰イオン交換樹脂Duolite A-568を加えて攪拌して酵素を吸着させることができる。この酵素を吸着した樹脂に、例えばグルタルアルデヒド等の架橋試薬を加えて攪拌することで架橋処理を行い、さらに安定性を向上させることもできる。これらの処理を行った後に、樹脂を濾集、洗浄して、固定化ヒダントイナーゼを得ることができる。

本発明の酵素反応は、以下の方法で行うことができる。基質として前記一般式(1)で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩を用い、前述のヒダントイナーゼ存在下、水性媒体中で反応を行う。基質の仕込み濃度は0.1% (w/v) 以上90% (w/v) 以下、好ましくは1% (w/v) 以上50% (w/v) 以下で、溶解又は懸濁した状態で反応を行い、

反応温度は10℃以上80℃以下、好ましくは20℃以上60℃以下の適当な温度で調節し、pH4以上9以下、好ましくはpH5以上8以下に保ちつつ、暫時静置又は攪拌すればよい。また、基質を連続的に添加しうる。反応は、バッチ法又は連続方式で行い得る。さらに、本発明の当該反応は、固定化酵素、膜リアクター等を利用して行うことも可能である。

水性媒体としては、水、緩衝液（例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、炭酸緩衝液等）、これらに水溶性有機溶媒（例えばエタノール、メタノール、アセトニトリル等）を含む溶媒等を用いることができる。なお、上記水性媒体は、水に溶解しにくい有機溶媒（例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、n-ヘキサン等）との2相系として用いることもできる。さらに必要に応じて、抗酸化剤、界面活性剤、補酵素、金属等を添加することもできる。

かくして、ラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体（1）又はその塩は、D体のみが環化され、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体（2）又はその塩と、N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体（3）又はその塩に変換される。

生成したN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体（3）又はその塩は、反応液のまま、脱カルバモイル化反応に供してもよいし、常套分離方法、例えば抽出、濃縮、晶析、又はカラムクロマトグラフィー等や、それらの組み合わせにより、分離、精製することができる。

例えば、前記式（1）においてR¹がt-ブチル基であるN-カルバモイル-S-t-ブチル- α -メチルシステインをヒダントイナーゼによるD体選択的環化反応の基質とした場合、反応後に不溶分として析出するD-5-メチル-5-t-ブチルチオメチルヒダントインを、ろ過により容易に除去することができる。

この場合、得られたN-カルバモイル- α -メチル-L-システインを含むろ液は、そのまま次工程に使用してもよいし、精製して次工程に使用してもよい。精製する場合、例えばpHを酸性にすることで結晶を析出させ、ろ過することにより該化合物を取得することができる。

また、不溶分として析出したD-5-メチル-5-t-ブチルチオメチルヒダントインは、そのまま次工程に用いてもよいし、一旦アルカリ水溶液に溶解して

アルカリ溶液として次の工程に用いることもできる。また、アルカリ水溶液を中和することにより、結晶として取得することもできるが、これらの方法に限られるものではない。

次に、N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩の脱カルバモイル化及び必要に応じた硫黄原子の脱保護による前記式(4)で表される α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の製造方法について説明する。

硫黄原子の保護基は上記R¹で示されるなかから選択される。脱保護としては、脱カルバモイル化(アミノ基の脱保護)と硫黄原子の脱保護を一緒に行ってもよいし、段階的にどちらか片方を行い、続いて残りの保護基を除去してもよい。脱保護の方法は、保護基と目的により適切な方法を選択すればよい。

まず、脱カルバモイル化と硫黄原子の脱保護を一緒に行う方法について説明する。本発明者らは検討を重ねる中で、硫黄原子の保護基(R¹)として、t-ブチル基等に代表される炭素数4~15の3級アルキルを用いた場合、N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩を酸で処理することにより、脱カルバモイル化(アミノ基の脱保護)と硫黄原子の脱保護を一段階で行えることを見出した。

本方法で用いる酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。反応性、経済性から、好ましくは塩酸又は臭化水素酸であり、より好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて使用することができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは反応溶媒を兼ねるのが好適である。

反応条件としては、例えば、硫黄原子の保護基がt-ブチル基であるN-カルバモイル-S-t-ブチル- α -メチルシステインを塩酸で処理することにより一段階で α -メチルシステイン塩酸塩を得る場合、反応温度は、好ましくは70℃~180℃、より好ましくは90℃~150℃である。反応時間は、例えば100℃~110℃、常圧で反応を行った場合、2~4日間程度が好ましく、耐圧

反応器を用いて、より高温で反応を行うことにより、反応時間を短くすることができる。

次に、まずN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩の脱カルバモイル化を行って、前記式(4)においてR²が前記式(1)におけるR¹と同じである α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩とした後に、硫黄原子の脱保護を行い、前記式(5)で表される α -メチル-L-システイン又はその塩を得る方法について説明する。

この場合、脱カルバモイル化はカルバモイル基を除去でき得る方法であれば特に制限されるものではないが、例えば、亜硝酸酸化法、アルカリ加水分解法及び酸加水分解法が挙げられる。硫黄原子上の保護基がt-ブチル基等の3級アルキル基の場合、塩酸等による酸加水分解法では、硫黄原子上の脱保護が進行する傾向にあるので、脱カルバモイル化のみを行いたい場合は、他の方法を用いることが好ましい。

亜硝酸酸化法は、通常の脱カルバモイル化に用いられる反応条件が利用できる。例えば、亜硝酸単独、又は、亜硝酸の塩と適当な酸の組み合わせを用いることができるが、亜硝酸塩と酸の組み合わせを用いることが好ましい。

亜硝酸塩としては、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、亜硝酸カルシウム、亜硝酸セシウム、亜硝酸マグネシウム、亜硝酸バリウム等が挙げられ、亜硝酸カリウム、亜硝酸ナトリウムが好ましい。また組み合わせる酸としては、酢酸、塩酸、硫酸、臭化水素酸等が好ましく、特に好ましくは塩酸である。溶媒としては特に制限されるものではないが、基質の溶解性から、水又はアルコール(例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール等)を用いることが好ましい。

亜硝酸酸化法の反応温度は、-5℃~100℃の範囲で行うことが好ましく、生成物の安定性、収率向上の面から、より好ましくは0℃~50℃の範囲である。

アルカリ加水分解法で用いるアルカリとしては、特に限定されないが、例えば水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等が好ましく、より好ましくは水酸化リチウムである。

アルカリ加水分解の反応温度は、-5℃~150℃の範囲で行うことが好まし

く、生産性及び収率向上の面から、より好ましくは80℃～120℃の範囲である。

前記式(4)においてR²が前記式(1)におけるR¹と同じである化合物は、そのまま次工程に用いてもよいし、精製して次工程に用いてもよい。精製する場合、例えばR²がt-ブチル基である場合、アルカリ加水分解後の反応溶液のpHを、酸を加えることにより下げること、前記式(4)においてR²がt-ブチル基であるα-メチルーL-システイン誘導体又はその塩を結晶として得ることができる。

この場合、アルカリ加水分解に用いるアルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等のなかから任意に選ばれる。また、アルカリ加水分解後の反応溶液に加える酸としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いてもよいし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いてもよいが、中和時に生成する無機塩が水に対して良好な溶解度を有し、脱塩が容易であることから、アルカリとして水酸化リチウム、酸として塩酸の組み合わせを用いることが好ましい。

ここでいう「中和」とは、反応液のpHを結晶が析出する領域に調整することを表す。前記式(4)においてR²がt-ブチル基であるα-メチルーL-システイン誘導体又はその塩を結晶として収率良く得るためには、pHの上限は9.5以下が好ましく、7.0以下がより好ましい。pHの下限は通常、1.0以上であり、2.0以上が好ましく、3.0以上がより好ましい。

以上のようにして脱カルバモイル化した後、さらに硫黄原子の脱保護が必要な場合は、例えば反応液をそのまま、又は、一旦α-メチルーL-システイン誘導体を単離した後、保護基に応じた反応条件で硫黄原子の脱保護を行うことができる。

例えば、保護基がt-ブチル基等の3級アルキル基の場合、酸で処理することにより硫黄原子の脱保護を行うことができる。酸としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いてもよいし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して

用いても良い。好ましくは塩酸又は臭化水素酸であり、より好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸の場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて使用することもできる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、溶媒を兼ねるのが好適である。反応温度は、好ましくは50℃～120℃、
5 より好ましくは80℃～100℃である。

次に、前記式(3)で表されるN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩から、L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(6)又はその塩を経由することによる、 α -メチル-L-システイン(5)又はその塩の製造方法について説明する。

10 まず、N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩の硫黄原子の脱保護と環化反応を一段階で行う方法について説明する。硫黄原子上の保護基がt-ブチル基に代表される3級アルキル基の場合、酸で処理することにより脱保護と環化を同時に行うことが可能である。

用いる酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオ
15 ロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いてもよい。好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸の場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて用いることができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、反応溶媒を兼ねるのが好適である。

20 反応温度は特に限定されるものではないが、L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(6)又はその塩の加水分解を抑制するためには、温和な条件が良く、例えば0℃～100℃、好ましくは60℃～90℃の範囲で数時間反応を行い、目的物が主たる生成物となった時点で反応を停止すればよい。

次に、環化のみを先に行いL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導
25 体(7)又はその塩を得た後に、硫黄原子の脱保護を行う方法を説明する。硫黄原子上の保護基がt-ブチル基に代表される3級アルキル基の場合、酸で環化を行うと先に硫黄原子の脱保護が進行するため、アルカリで処理することが好ましい。

用いるアルカリとしては、特に制限されるものではなく、例えば水酸化ナトリ

ウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化バリウム、水酸化カルシウム等が挙げられるが、入手の容易さ、価格の面等から、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムあるいは水酸化リチウムが好ましい。

環化の際の反応温度としては、好ましくは $0^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $60^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$ である。また、溶媒は、水単独でも良いし、有機溶媒との混合溶媒でも良い。好ましくは水単独である。

L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(7)又はその塩は、そのまま次工程に用いてもよいし、有機溶媒で抽出後に次工程に用いてもよいし、晶析等により単離してから次工程に用いてもよい。

10 得られた(7)又はその塩をさらに酸で処理することにより硫黄原子の脱保護が進行し、L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(6)又はその塩を得ることができる。

用いる酸としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは
15 2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。収率や価格の面から塩酸が好ましい。酸処理は、前述の脱保護と環化を一段階で行う場合と同様の条件にて、好適に実施できる。

以上のようにして得られたL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(6)又はその塩は、酸又はアルカリで加水分解することにより、 α -メチル-L-システイン(5)又はその塩に変換できる。好ましくは酸による加水分解である。
20

酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。塩酸又は臭化水素酸が好ましく、塩酸がより好ましい。また、アルカリとしては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等が好ましい。
25

次に、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩の加水分解反応を行い、得られた前記式(8)において R^2 が前記式(1)における R^1 と同じである α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩の硫黄原子の脱保護を行うことによる α -メチル-D-システイン又はその塩の製造方法に

ついて説明する。

加水分解は、通常、アルカリを用いて行われる。加水分解に用いるアルカリは特に制限されるものではないが、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化バリウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等が挙げられ、好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムである。反応後に生成物の晶析を行う際に、生じる無機塩不純物が水に対して良好な溶解度を有することから、水酸化リチウムを用いることが特に好ましい。

溶媒は、水単独でも良いし、有機溶媒との混合溶媒でも良い。好ましくは水単独である。

10 反応温度としては、好ましくは -5°C ～ 150°C 、より好ましくは 80°C ～ 120°C である。

例えば、 R^2 が t -ブチル基の場合、得られた α -メチルー S - t -ブチルー D -システインは、加水分解反応後に反応液に酸を加えて pH を下げることにより、結晶として取得することができる。

15 ここで用いる酸は、反応液の pH を下げ得るものであれば特に限定されるものではないが、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良く、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。加水分解に水酸化リチウムを用いた場合、中和時に生成する無機塩不純物が水に対して良好な溶解度を有し、結晶中に混入しにくいことから塩酸を用いることが好ましい。

25 ここでいう「中和」とは、反応液の pH を結晶が析出する領域に調整することを表す。 α -メチルー S - t -ブチルー D -システインを結晶として収率良く得るためには、 pH の上限は9.5以下が好ましく、7.0以下がより好ましい。 pH の下限は通常、1.0以上であり、2.0以上が好ましく、3.0以上がより好ましい。

かくして、得られた前記式(8)において R^2 が R^1 と同じである化合物は、硫黄原子の脱保護を行うことにより α -メチルー D -システイン(9)又はその塩に変換することが出来る。脱保護の方法は、硫黄原子上の保護基に応じて選択されるが、保護基として t -ブチル基等の3級アルキル基を用いた場合、酸で処

理することにより容易に脱保護することができる。

本方法で用いる酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。反応性、
5 経済性から、好ましくは塩酸又は臭化水素酸であり、より好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸を用いる場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて使用することができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、溶媒を兼ねるのが好適である。

反応温度としては、好ましくは70℃～180℃、より好ましくは90℃～1
10 50℃である。

次に、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩の加水分解反応と硫黄原子の脱保護を酸により一段階で行う方法を説明する。例えば、前記式(2)におけるR¹がt-ブチル基に代表される炭素数4～15の3級アルキル基の場合、酸で処理することにより一段階でα-メチル-D-システイン(9)又はその塩を得ることができる。
15

ここで用いる酸は、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。好ましくは塩酸又は臭化水素酸であり、より好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸を用いる
20 場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて使用することができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、溶媒を兼ねるのが好適である。

反応温度としては、好ましくは70℃～180℃、より好ましくは90℃～1
50℃である。

次に、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩から、硫黄原子の脱保護を行ってD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(11)又はその塩とし、さらに該化合物を加水分解することによりα-メチル-D-システイン(9)又はその塩を製造する方法について説明する。
25

まず、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩

の硫黄原子の脱保護のみを選択的に行い、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(11)又はその塩を得る方法について説明する。前述したように、硫黄原子の保護基が t -ブチル基等の3級アルキル基である場合、酸で処理することにより容易に脱保護が可能である。

- 5 用いる酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸を用いる場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を反応溶媒を兼ねて使用することができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、溶媒を兼ねるのが好適である。

反応条件は、加水分解を抑制し、選択性良くD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(11)を得られる比較的温和な条件であれば特に限定されるものではないが、100℃以下で数時間反応を行い、目的物が主たる生成物となった時点で反応を停止すればよい。

- 15 次いで、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(11)又はその塩を加水分解して、 α -メチル-D-システイン(9)又はその塩を製造する。

- 加水分解は、酸加水分解、アルカリ加水分解のいずれも可能である。酸加水分解の場合、酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等を挙げることができ、前記から選ばれる任意の1種を単独で用いても良いし、あるいは2種以上を任意の割合で混合して用いても良い。反応性、経済性から好ましくは塩酸または臭化水素酸であり、更に好ましくは塩酸である。塩酸、臭化水素酸を用いる場合は、市販の濃塩酸、濃臭化水素酸を溶媒を兼ねて使用することができる。水や有機溶剤を添加しても良いが、反応性の観点からは、溶媒を兼ねるのが好ましい。反応温度は、好ましくは70℃~180℃、更に好ましくは、90℃~150℃である。反応時間は、例えば100℃~110℃、常圧で反応を行う場合、2~4日間程度が好ましく、耐圧反応器を用いてより高温で反応を行うことにより、反応時間を短縮することができる。

次に、まずD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩の加水分解を先に行うことにより、前記式(8)で表される α -メチル-D

ーシステイン誘導体又はその塩を得た後に、カルバモイル化して、N-カルバモイル- α -メチル-D-システイン誘導体(10)又はその塩で表される化合物に変換し、次いで、環化及び硫黄原子の脱保護を行うことによりD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(11)又はその塩を得る方法について説明する。

- 5 この場合、D-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体(2)又はその塩から α -メチル-D-システイン誘導体(8)又はその塩への変換は、既に記載した方法で行うことができる。

α -メチル-D-システイン誘導体(8)又はその塩のカルバモイル化は、シアン酸のアルカリ金属塩及び酸を用いて行うことができる。シアン酸のアルカリ金属塩としては、例えばイソシアン酸カリウム、シアン酸カリウム、シアン酸ナトリウム等が挙げられる。酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられる。これらを用いて、通常のカムバモイル化反応条件(例えば、水溶媒中、0~100℃)に付すことにより、カルバモイル化する。

- 15 N-カルバモイル- α -メチル-D-システイン誘導体(10)又はその塩の環化及び硫黄原子の脱保護は、前述のN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体(3)又はその塩からL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(6)への変換で記載した方法と同様にして行うことができる。

次に、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の晶析方法について詳細に説明する。光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共存下に、これらの晶出を行うことにより、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を容易に取得することが可能である。

光学活性 α -メチルシステイン又はその塩としては、特には限定されないが、光学活性 α -メチルシステイン、光学活性 α -メチルシステインの酸との塩、光学活性 α -メチルシステインの塩基との塩が挙げられるが、好ましくは酸との塩である。また、光学活性 α -メチルシステインは、L体、D体のいずれでもよい。

前記の酸との塩の酸としては、ハロゲン化水素酸、スルホン酸、硫酸、硝酸、カルボン酸等が挙げられるが、好ましくはハロゲン化水素酸である。

前記ハロゲン化水素酸としては、塩酸、臭化水素酸、フッ化水素酸等が挙げら

れるが、好ましくは塩酸である。

スルホン酸としては、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられ、カルボン酸としては、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられる。また、塩基との塩の塩基としては、

5 アンモニア、トリエチルアミン、アニリン、ピリジン等が挙げられる。

光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液は、その調製法は特に限定されない。例えば、前記従来技術1)～6)の方法により得られる α -メチルシステイン誘導体又はその塩、若しくは保護体を、適切に変換、脱保護して得られる水溶液である。また、本明細書記載の方法に従い得られる該化合物の水溶液

10 液であってもよい。好ましくは、本明細書記載の方法により製造された光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液である。

本晶析方法においては、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液を、有機溶剤との共存下に濃縮することにより、水を系外に除去すると共に、有機溶剤に置換する。これにより、当該化合物が塊状化することを抑制して、取り出し

15 及びろ過が容易なスラリーを得ることができる。得られたスラリーをろ過後、洗浄、乾燥し、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を結晶として取得することが可能である。

本晶析方法の実施にあたっては、有機溶剤の添加に先立ち、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液を予備的に濃縮しておくこともできる。この場合、該化合物の重量濃度が10重量%以上、より好ましくは30重量%以上となる程度に水溶液を濃縮するのが好ましい。

20

置換する有機溶剤の種類は、特に限定されないが、好ましくは水と共沸することができ、共沸時の水の組成が5.0重量%以上の溶媒である。また、水と相溶性の低い又はない有機溶剤がさらに好ましい。

前記水と相溶性の低い又はない有機溶剤として、炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、又はエーテル系溶剤等が挙げられる。水と相溶性が低く、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の溶解性が低く、溶剤の回収再利用が容易である点から、好ましくは炭化水素系有機溶剤である。

25

炭化水素系有機溶剤としては、特に限定されないが、例えばトルエン、ベン

ゼン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタンのいずれかの一種又は二種以上混合して用いても良い。好ましくは経済性の点からトルエンである。

エステル系溶剤としては、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸イソブチル等が挙げられる。

- 5 エーテル系溶剤としては、ジプロピルエーテル、ジブチルエーテル、1, 4-ジオキサン、メチル t-ブチルエーテル等が挙げられる。

これら上記溶剤は、各々単独で用いても良いし、同種または異種の溶剤を任意の割合で混合して用いても良い。

有機溶剤への置換は、一度に行っても良いし、複数回に分けて行っても良い。

- 10 また、置換する有機溶剤の使用量は、有機溶剤の種類、濃縮の減圧度、内温により異なるので一概には言えないが、例えばトルエンの場合、一回の投入量として、水溶液の全重量に対して、好ましくは0.1~100倍重量であり、より好ましくは0.2~10倍重量である。

- 15 有機溶剤添加後、水を系外に除去しつつ、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を晶出させるときの濃度としては、溶質としての光学活性 α -メチルシステイン又はその塩が0.1~70重量%、好ましくは1~70重量%である。

- 20 上記操作により、系外に水を除去した後に最終的に残存する水の量としては、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩に対して、100重量%以下であることが好ましく、得られる結晶の性状、ろ過性、晶出率、スラリーの流動性の点からは、40重量%以下まで水を系外に除去することがより好ましい。

- 25 濃縮を行う際の蒸発速度としては、装置の能力に依存するので一概には言えないが、蒸発速度を大きくすると、発泡が激しくなり得られるスラリーの流動性が極めて悪くなり、また塊状化する傾向にある。したがって、蒸発速度を、単位蒸発面積及び単位時間あたりの速度として1000 L/h \cdot m²以下に制御するのが好ましい。600 L/h \cdot m²以下がより好ましく、300 L/h \cdot m²以下が更に好ましく、100 L/h \cdot m²以下が特に好ましい。

有機溶剤投入後濃縮を行う際の減圧度としては、通常500 mmHg以下であり、好ましくは200 mmHg以下である。下限は特に制限されないが、通常0.1 mmHg以上である。

濃縮時の温度は、減圧度、装置の能力に依存するが、取り扱いが容易な、高品質の結晶を取得する為には、 $0^{\circ}\text{C}\sim 150^{\circ}\text{C}$ であり、好ましくは $10^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $30\sim 70^{\circ}\text{C}$ である。

次に、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、無機塩を除去
5 した後に、該化合物を晶析取得する方法について下記に詳細に記載する。光学活
性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液に有機溶剤を添加し、濃縮を行い、
水を系外に除去すると共に有機溶剤に置換する。このとき、難溶性無機塩の大半
は析出しており、ろ過等の方法により無機塩を除去することができる。そして、
得られたろ液から、貧溶媒添加、冷却、又は濃縮等の操作により、該化合物を晶
10 出させることにより、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を結晶として取
得することができる。

上記操作により、有機溶剤を添加し、系外に水を除去するとき最終的に残存す
る水の量としては、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩に対して、好まし
くは 100 重量%以下であり、除去すべき無機塩の析出量の点から、 40 重量%
15 以下まで水を系外に除去することがより好ましい。

置換する有機溶剤の種類は、特に限定されないが、無機塩が難溶又は不溶で、
かつ、光学活性 α -メチルシステイン塩酸塩が可溶性物性を有している点で、水
と相溶性のある有機溶剤が好ましい。より好ましくは、アルコール系溶剤単独、
水と相溶性のあるエーテル系溶剤単独、又は、各々を任意に混合した溶剤である。

アルコール系溶剤としては、例えばメチルアルコール、エチルアルコール、 n -
プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、 n -ブチルアルコール、イソ
ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール等が挙げ
られる。これらの中から任意に1種を単独で用いても良いし、2種以上を任意の
割合で混合して用いても良いが、脱水効率、経済性、エステル化等の副反応を低
25 減する観点から、好ましくはイソプロピルアルコールである。

上記水と相溶性のあるエーテル系溶剤としては、例えば、ジエチルエーテル、
ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、 $1,4$ -ジオキサン、メチルー
tert-ブチルエーテル等が挙げられる。これらの中から任意に1種を単独で用いて
も良いし、2種を任意の割合で混合して用いても良いが、脱水効率、経済性の点

から、好ましくはテトラヒドロフランである。

難溶性無機塩を除去後、得られるる液から、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を晶出させる方法としては特には限定されず、例えば貧溶媒添加、冷却、又は濃縮等の一般的な晶析操作が実施可能であるが、好ましくは貧溶媒を添加する
5 方法である。

上記貧溶媒としては、特には限定されず、炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、水と相溶性のない又は低いエーテル系溶剤等が挙げられる。結晶の析出量、純度の点から、好ましくは炭化水素系溶剤及びエステル系溶剤である。より好ましくは炭化水素系溶剤である。

10 上記炭化水素系溶剤としては、特には限定されないが、例えばトルエン、ベンゼン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン等が挙げられ、好ましくはトルエン、キシレン、ヘキサン、ヘプタン、より好ましくはトルエンである。

上記エステル系溶剤としては、特には限定されないが、例えば酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル等が挙げられ、好ましくは酢酸エチルである。
15

水と相溶性のない又は低いエーテル系溶剤としては、特には限定されないが、例えばジプロピルエーテル、ジブチルエーテル、1, 4-ジオキサン、メチルテ
ーブチルエーテル等が挙げられる。

これら上記溶剤は、各々単独で用いても良いし、同種または異種の溶剤を任意
20 の割合で混合して用いても良い。

光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を晶出させるときの当該化合物の濃度としては、温度、溶媒比等により異なるが、溶液全体に対して、通常0. 1~70重量%、好ましくは1~70重量%、より好ましくは2~70重量%である。

本発明の晶析方法によれば、高純度の光学活性 α -メチルシステイン又はその
25 塩を工業的に実施可能な工程で良好に取得できる。また、本発明の晶析方法で取得した結晶中の対応するジスルフィド体含有量は、1. 0モル%以下、好ましくは0. 5モル%以下、より好ましくは0. 1モル%以下である。ジスルフィド体の含有量の低い光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を得るために好ましい形態は、酸との塩であり、より好ましくはハロゲン化水素酸との塩、さらに好ま

しくは塩酸との塩である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実
5 施例に限定されるものではない。

(参考例1) ラセミ体5-メチル-5-t-ブチルチオメチルヒダントインの製造方法

窒素風船を備えた反応容器に、5 wt%水酸化ナトリウム水溶液(9.6 g,
10 12 mmol)、t-ブチルメルカプタン(1.13 mL, 10 mmol)を0
°Cで混合し、10分間攪拌した。クロロアセトン(0.79 mL, 10 mmol)
を加え、室温に昇温し2時間反応させた。このとき反応溶液は淡黄色で二相分
離していた。反応容器にジムロート型冷却管を備え、NaCN(588 mg, 1
2 mmol)、(NH₄)HCO₃(2.77 g, 35 mmol)、28%アン
15 モニア水(3.1 mL)を加え、均一な溶液とした後、55-60°Cに昇温した。
6時間加熱攪拌した後、0°Cに冷却し、反応溶液に濃塩酸を加えpH=7.0-
7.6に調整した。生成した白色結晶を濾別し、¹H NMR分析を行ったところ
目的物(1.84 g、収率84.8%)であった。

20 (参考例2) 5-(2-メトキシフェニルメチル)-5-メチル-ヒダントイン
の製造方法

2-メトキシフェニルアセトン(16.4 g、100 mmol)と水164 g
を混合し、これにNaCN(5.88 g、120 mmol)、(NH₄)HCO₃
(27.7 g、350 mmol)、28%アンモニア水27.7 gを加えた。
25 50°Cで4時間、60°Cで12時間攪拌した後に、23°Cまで放冷し、濃塩酸を
加えpH7.5に調整した。析出した固体をろ取し、トルエンで洗浄した後に、
減圧乾燥し、標題化合物22.10 g(収率94.5%)を得た。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.10-6.88(m, 4
H), 5.49(brs, 1H), 3.86(s, 3H), 3.20(d, 1H)

), 2.97 (d, 1H), 1.49 (s, 3H)。

(参考例3) ラセミ体N-カルバモイル-L-チロシン- α -メチルシステインの製造方法

5 ラセミ体5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(4.77g, 22.1mmol)を10%水酸化ナトリウム水溶液(75g)に溶解し、72時間還流させた。室温まで放冷後、反応液を一部抜き取り、HPLC(カラム:コスモシルAR-II(ナカライ社製)、移動相:リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液(pH2.0)/アセトニトリル=97/3、流速:1.0ml/min、検出波
10 長:210nm、カラム温度:40°C、保持時間21.15分)にてラセミ体S-チロシン- α -メチルシステインの生成を確認した。濃塩酸にてpHを8に調整した後、溶液を70°Cに加熱、シアン酸カリウム(2.07g)を蒸留水(10mL)に溶解した溶液を20分かけて滴下した。滴下終了後、5時間攪拌した後、反応液の一部を抜き取りHPLCにて分析したところ未反応のアミノ酸が
15 認められたので、さらにシアン酸カリウム(4.14g)を蒸留水(20mL)に溶かした溶液を20分かけて滴下した。滴下終了後、さらに1時間攪拌し室温まで放冷、濃塩酸にてpHを2とし、析出した固体をろ取した。得られた固体を水洗、乾燥させ¹H NMRで分析したところ目的物であることがわかった(3.38g、収率66%)。

20

(実施例1) N-カルバモイル-L-チロシン- α -メチル-L-システイン及びD-5-チロシンチオメチル-5-メチルヒダントインの製造方法

WO96/20275記載の培養方法と固定化酵素の調製方法に従い、バチルス sp. KNK245株(FERM BP-4863)を培養、集菌後、超音波
25 波破碎して得た酵素液に、固定化用担体である陰イオン交換樹脂、Duolite A-568を添加して酵素を吸着させ、さらにグルタルアルデヒドで架橋処理することで固定化ヒダントイナーゼを得た。

次に、参考例2で得たラセミ体のN-カルバモイル-L-チロシン- α -メチルシステイン15mgに0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)1.5

m l と 0.5 M 硫酸マンガン水溶液 0.003 m l を加え 10 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH 6.5 に調整した溶液に、上記の様に得られた固定化ヒダントイナーゼ 200 mg (湿重量) を加えて、40°C、48 時間攪拌して反応させた。反応中は 6 N 塩酸により pH を 6.5 付近に保った。反応液を HPLC 分析 (カラム: COSMOSIL 5C8-MS、移動相: アセトニトリル/10 mM リン酸二水素カリウム水溶液 = 3/7、流速: 0.8 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 40°C) した結果、N-カルバモイル-L-セーブチル- α -メチルシステインの残存率は 41% であった。さらに、反応液中 N-カルバモイル-L-セーブチル- α -メチルシステインの光学純度を HPLC 分析 (カラム: CHIRALPAK AS (ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール/トリクロロ酢酸 = 7/3/0.01、流速: 0.5 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 30°C) したところ 96.7% ee であった。また、得られた光学活性 N-カルバモイル-L-セーブチル- α -メチルシステインが L 体であることを、実施例 9 及び 10 に示す方法でメチルシステインに誘導して旋光度を測定することで確認した。

一方、上記酵素反応中に生成し析出した化合物を酢酸エチルで抽出した後、キラル HPLC で分析 (カラム: CHIRALPAK AD (ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール = 10/3、流速: 1 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 30°C) したところ、溶出時間が標品と一致したことから光学活性 L-セーブチルチオメチル-L-メチルヒダントインであることを確認した (面積比から化学純度 88%、光学純度 100% ee)。また、得られた光学活性 L-セーブチルチオメチル-L-メチルヒダントインが D 体であることを、別途合成した標品との HPLC 分析 (カラム: CHIRALPAK AD (ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール = 10/1、流速: 1 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 30°C、D 体: 14.7 分、L 体: 25.3 分) による保持時間の比較により確認した。

N-カルバモイル-L-セーブチル- α -メチル-L-システイン: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 3.22 (d, 1H), 3.16 (d, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.29 (s, 9H)

D-5-tert-butylthio-methyl-L-methionine: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 with 3 drops of CD_3OD) δ : 2.90 (d, 1H), 2.80 (d, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.30 (s, 9H)。

5

(実施例2) 形質転換微生物エシェリヒア・コリ HB101 pTH104を用いたN-カルバモイル-S-tert-butyl-L-メチルシステインの製造方法

バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) のヒダントイ
10 ナーゼ遺伝子を組み込んだ形質転換微生物エシェリヒア・コリ HB101 p
TH104 (FERM BP-4864) を10ml液体培地 (10g/1 ト
トリプトン、10g/1 イーストエキス、5g/1 NaCl、pH7を120
℃で15分間殺菌後、100mg/1 アンピシリンをろ過滅菌にて添加) に植
菌し、37℃にて18時間振とう培養した。この培養液1mlを、500ml容
15 坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した50ml液体培地 (10g/1
トリプトン、10g/1 イーストエキス、5g/1 NaCl、pH7) に植
菌し、37℃にて24時間振とう培養した。この培養液1mlから遠心分離によ
り得られた菌体を1.5mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に
懸濁し、ラセミ体のN-カルバモイル-S-tert-butyl-L-メチルシステイン
20 150mgと0.5M硫酸マンガン水溶液0.003mlを添加後、10N水酸化
化ナトリウム水溶液によりpHを6.5に調整した。そして、6N塩酸によりp
Hを6.5付近に保ちつつ、40℃で24時間攪拌して反応させた。反応液をH
PLC分析 (カラム: COSMOSIL 5C8-MS、移動相: アセトニトリ
ル/10mMリン酸二水素カリウム水溶液=3/7、流速: 0.8ml/min、
25 検出波長: 210nm、カラム温度: 40℃) した結果、N-カルバモイル-S
-tert-butyl-L-メチルシステインの残存率は49%であった。さらに、反応
液中N-カルバモイル-S-tert-butyl-L-メチルシステインの光学純度をH
PLC分析 (カラム: CHIRALPAK AS (ダイセル社製)、移動相: ヘ
キサン/イソプロパノール/トリクロロ酢酸=7/3/0.01、流速: 0.5

m l / m i n、検出波長：210 nm、カラム温度：30℃) したところ94.6% eeであり、また、実施例1で得られたN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L-システインとの保持時間の比較からL体であることを確認した。

5

(実施例3) バチルス属細菌を用いたN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L-システインの製造方法

バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) の乾燥保存菌体を、500 ml 容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100 ml 液体培地 (10 g / l ポリペプトン、10 g / l 肉エキス、5 g / l イーストエキス、pH 7.5) に植菌し、45℃にて15時間振とう培養した。この培養液2 ml を、上記培地成分にさらに1 g / l ウラシル、20 mg / l 塩化マンガンを加えた培地に植菌し、45℃にて24時間振とう培養した。この培養液15 ml から遠心分離により得られた菌体を1.5 ml の0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、ラセミ体のN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチルシステイン150 mg と0.5 M硫酸マンガン水溶液0.003 ml を添加後、10 N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを6.5に調整した。そして、6 N塩酸によりpHを6.5付近に保ちつつ、40℃で19時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (カラム：COSMOSIL 5C8-M S、移動相：アセトニトリル / 10 mMリン酸二水素カリウム水溶液 = 3 / 7、流速：0.8 ml / min、検出波長：210 nm、カラム温度：40℃) した結果、N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチルシステインの残存率は44%であった。さらに、反応液中N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチルシステインの光学純度をHPLC分析 (カラム：CHIRALPAK AS (ダイセル社製)、移動相：ヘキサン / イソプロパノール / トリクロロ酢酸 = 9 / 1 / 0.01、流速：0.5 ml / min、検出波長：210 nm、カラム温度：30℃) したところ99.0% eeであり、また、実施例1で得られたN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L-システインとの保持時間の比較からL体であることを確認した。

(実施例 4) シュードモナス属細菌を用いたN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L-システインの製造方法

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO1
5 2996を固体培地(10g/1 ポリペプトン、2g/1 イーストエキス、
1g/1 硫酸マグネシウム七水和物、15g/1 寒天、pH7.0)で30
℃にて24時間培養した。この菌体一白金耳を、500ml容坂口フラスコ中、
120℃で15分間殺菌した100ml液体培地(20g/1 肉エキス、6g
/1 グリセロール、1g/1 ウラシル、2g/1 リン酸二水素カリウム、
10 1g/1 硫酸マグネシウム七水和物、40mg/1 塩化カルシウム二水和物、
20mg/1 硫酸第一鉄七水和物、20mg/1 硫酸マンガン四~六水和物、
20mg/1 硫酸銅五水和物、pH5.5)に植菌し、30℃にて24時間振
とう培養した。この培養液10mlから遠心分離により得られた菌体を1mlの
0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁し、ラセミ体のN-カルバ
15 モイル-S-tert-ブチル- α -メチルシステイン10mgと0.5M硫酸マンガン
水溶液0.002mlを添加した。そして、6N塩酸によりpHを6.5付近
に保ちつつ、40℃で50時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析(カ
ラム: COSMOSIL 5C8-MS、移動相: アセトニトリル/10mMリ
ン酸二水素カリウム水溶液=3/7、流速: 0.8ml/min、検出波長: 2
20 10nm、カラム温度: 40℃)した結果、N-カルバモイル-S-tert-ブチル
- α -メチルシステインの残存率は52%であった。さらに、反応液中N-カル
バモイル-S-tert-ブチル- α -メチルシステインの光学純度をHPLC分析(
カラム: CHIRALPAK AS(ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソ
プロパノール/トリクロロ酢酸=9/1/0.01、流速: 0.5ml/min、
25 検出波長: 210nm、カラム温度: 30℃)したところ95.6% eeであり、
また、実施例1で得られたN-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L
-システインとの保持時間の比較からL体であることを確認した。

(実施例 5) アグロバクテリウム属細菌を用いたN-カルバモイル-S-tert-

チルー α -メチルーL-システインの製造方法

アグロバクテリウム・スピーシーズ KNK712株 (FERM BP-1900) を大型試験管中、120°Cで15分間殺菌した10ml液体培地 (10g/1 ポリペプトン、10g/1 肉エキス、5g/1 イーストエキス、5g/1 グリセリン、5g/1 リン酸二水素カリウム、5g/1 リン酸水素二ナトリウム、pH6.5) に植菌し、30°Cにて24時間振とう培養した。この培養液1mlを、100ml液体培地 (25g/1 グリセリン、5g/1 シュークロース、5g/1 リン酸二水素カリウム、5g/1 リン酸水素二ナトリウム、1g/1 リン酸マグネシウム七水和物、10mg/1 塩化マンガン四水和物、4g/1 イーストエキス、pH6.5を120°Cで15分間殺菌後、2g/1 ウレア、1g/1 D-N-カルバモイル α -p-ヒドロキシフェニルグリシンをろ過滅菌にて添加) に植菌し、33°Cにて23時間振とう培養した。この培養液5mlから遠心分離により得られた菌体を1mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、ラセミ体のN-カルバモイル-S-
15 t-ブチルー α -メチルシステイン10mgと0.5M硫酸マンガン水溶液0.002mlを添加した。そして、6N塩酸によりpHを6.5付近に保ちつつ、40°Cで5時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (カラム: COSMOSIL 5C8-MS、移動相: アセトニトリル/10mMリン酸二水素カリウム水溶液=3/7、流速: 0.8ml/min、検出波長: 210nm、カラム温度: 40°C) した結果、N-カルバモイル-S-t-ブチルー α -メチルシステインの残存率は23%であった。さらに、反応液中N-カルバモイル-S-t-ブチルー α -メチルシステインの光学純度をHPLC分析 (カラム: CHIRALPAK AS (ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール/トリクロロ酢酸=9/1/0.01、流速: 0.5ml/min、検出波長: 210nm、カラム温度: 30°C) したところ85.8% eeであり、また、実施例1で得られたN-カルバモイル-S-t-ブチルー α -メチルーL-システインとの保持時間の比較からL体であることを確認した。

(実施例6) D-5-t-ブチルチオメチルー5-メチルヒダントインの製造方

法

実施例3の方法により得られた酵素とD-5-*t*-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントインの混合物(50g)に不純物として含まれるS-*t*-ブチル- α -メチル-L-システインを除去するために、水(400g)を加え攪拌した後、不溶分をろ取り、水(200g)でさらに洗浄した。これに5wt%水酸化ナトリウム水溶液(120g)を加え、攪拌した。酵素を不溶分としてろ別し、ろ液を濃塩酸にてpH=9に調整した。析出した結晶をろ取り、これを水洗した後に、減圧下にて乾燥を行い、粗生成物を結晶として得た(19.7g)。これをHPLCにて分析(カラム: COSMOSIL 5C8-MS、移動相: アセトニトリル/リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液(pH2.0)=2/8、流速: 1.0ml/min、検出波長: 210nm、カラム温度: 40°C)し、標品との比較により純度及び収率を算出したところ、純度87.5wt%、収率79.6%であった。また光学純度は、HPLC分析(カラム: CHIRALPAK AS(ダイセル社製)、移動相: ヘキサン/イソプロパノール=9/1、流速: 1.0ml/min、検出波長: 210nm、カラム温度: 30°C、保持時間: D体=15.2分、L体=39.8分)により決定し、97.6% eeであった。

(実施例7) S-*t*-ブチル- α -メチル-D-システインの製造方法

実施例1~5のいずれかの方法で取得したD-5-*t*-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントインと酵素混合物(80g)に、10wt%水酸化リチウム水溶液(150mL)を加えて溶解させた。酵素をろ別した後に、母液中に含まれるD-5-*t*-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントインをHPLC(分析条件は実施例6と同じ)にて定量したところ44.2g含有していた。この溶液に水酸化リチウム(54g)、蒸留水(51g)を加え38時間加熱還流した。室温まで放冷し、生じた固体をろ別した。母液を内温20°C付近に保ち、濃塩酸(110g)を加えpH=6.7に調整し、内温2°Cに冷却し2時間攪拌を続けた。次に生じた固体をろ取り、40°Cで24時間真空乾燥し、乾燥結晶(34.9g)を取得した。HPLC(カラム: Cosmosil 5C18-AR

(ナカライ社製)、移動相：リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 90 / 10、流速：1.0 ml / min、検出波長：210 nm、カラム温度：40°C) で分析して、上記目的物であることを確認し、標品との比較により純度及び収率を決定した (純度 96.7 wt%, 収率 85.7%)。

(実施例 8) α -メチル-D-システイン塩酸塩の製造方法

S-tert-ブチル- α -メチル-D-システイン (20 g) を濃塩酸 (180 g) に溶解させ 45 時間加熱還流した。室温まで放冷し、反応溶液を 35 g まで濃縮した。これを 40°C に加温し、トルエン (110 mL) を加え、約 40 g になるまで濃縮した。この操作をさらに 4 回行い、生じた固体をろ取し、60°C で 48 時間真空乾燥し、標題化合物を白色固体として得た (15.3 g)。HPLC (カラム：CAPCELL PAK SCX (資生堂社製)、移動相：リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 95 / 5、流速：0.3 ml / min、検出波長：210 nm、カラム温度：30°C) で分析したところ、上記目的物であることを確認した (収率 84.6%)。また旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_{D_{20}} = -6.28$ (c 1.21, H₂O) であり、符号が実施例 10 で得られた α -メチル-L-システイン塩酸塩と逆であることから、立体が目的とする D 体であることを確認した。

20

(実施例 9) α -メチル-L-システイン塩酸塩の製造方法

N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-L-システイン (100 mg, 0.43 mmol) を濃塩酸 (1 mL) に溶解し、窒素下、60 時間還流させ、 α -メチル-L-システイン塩酸塩の水溶液を得た。

25

(実施例 10) α -メチル-L-システイン塩酸塩の単離方法

実施例 9 で得られた α -メチル-L-システイン塩酸塩反応溶液に、イソプロピルアルコール (0.5 mL) を加えて減圧下濃縮し、共沸脱水を行った。同様の操作を 3 回繰り返す、容量が約 1 / 3 となったところで濃縮を止め、60°C に

加熱、トルエン（1 mL）を加え、攪拌しながら室温まで放冷した。そのまま約1時間攪拌した後、析出した結晶をろ別、トルエンで洗浄し、減圧下乾燥させ、標題化合物を白色固体として得た（44.3 mg）。HPLC（実施例8の分析条件）で分析したところ、上記目的物であることを確認した（収率60.0%）。

5 また旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_{D_{20}} = 8.77$ （ $c 1.15$, H_2O ）であり、符号が文献値（Tetrahedron, 1993, 49, 2131~2138, WO98/38177）と一致することから、立体が目的とするL体であることを確認した。

1H NMR（300 MHz, D_2O ） δ : 3.18（d, 1H）, 2.89（
10 d, 1H）, 1.60（s, 3H）。

（実施例11）S-トープチル- α -メチル-L-システインの製造方法

N-カルバモイル-S-トープチル- α -メチル-L-システイン（82.4 g, 351.4 mmol）を18%水酸化リチウム水溶液（630 g）に溶解し、
15 窒素下、41時間還流させた。室温まで放冷後、不溶分をろ別した後の溶液に濃塩酸（180.1 g）を加えてpHを6に調整し、そのまま約1時間攪拌した後
に4~5°Cに冷却し、さらに1時間攪拌した。得られた結晶をろ別し、水洗の
後に減圧下乾燥を行い、標題化合物を白色固体として得た（53.9 g）。HP
LC（カラム：Cosmosil 5C18-AR（ナカライ社製）、移動相：
20 リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液（pH2.0）/アセトニトリル=90/
10、流速：1.0 ml/min、検出波長：210 nm、カラム温度：40°C）
で分析したところ、上記目的物であることを確認した（収率85.7%）。

1H NMR（300 MHz, D_2O ） δ : 3.18（d, 1H）, 2.91（
d, 1H）, 1.60（s, 3H）, 1.35（s, 9H）。

25

（実施例12） α -メチル-L-システイン塩酸塩の製造方法

実施例11記載の方法で得られたS-トープチル- α -メチル-L-システイン（38.4 g, 201 mmol）に濃塩酸（345.3 g）を加え、24時間還流し、 α -メチル-L-システイン塩酸塩の水溶液を得た。

(実施例 1 3) α -メチル-L-システイン塩酸塩の単離方法

実施例 1 2 により得られた α -メチル-L-システイン塩酸塩反応溶液を 67.5 g にまで濃縮 (減圧度 30~60 mmHg、温度 45°C) し、トルエン (206 g) を加え、減圧濃縮操作 (減圧度 40~60 mmHg、温度 40°C、留出速度 107 L/h \cdot m²) を行い、全量 109 g とした。さらにトルエン (206 g) を加えて濃縮し、同様の操作を合計 6 回繰り返す、得られた α -メチル-L-システイン塩酸塩トルエンスラリー (104 g) を得た。このものの水分含量は 30 重量% (対 α -メチル-L-システイン塩酸塩) であった。ろ過し、トルエンにて結晶を洗浄、減圧下乾燥 (0~100 mmHg、30~80°C、5~10 時間) させ、標題化合物を白色固体として得た (32.2 g、収率 93.4%) 。

(実施例 1 4) α -メチル-L-システイン塩酸塩の製造方法

15 実施例 1 1 記載の方法で得られた S-tert-ブチル- α -メチル-L-システイン (25 g, 131 mmol) に水 (47.6 g) 及び濃塩酸 (177.4 g) を加え、41 時間還流した。さらに濃塩酸 (47.6 g) を加え 3 時間還流させた後に、室温まで放冷した。イソプロピルアルコール (90 mL) を加え減圧下濃縮を行い、共沸脱水を 3 回、同量のイソプロピルアルコールを用いて行った。最後にイソプロピルアルコールを加え濃縮し、容量が約 1/3 となったところで濃縮を止め 60°C に加熱、トルエン (90 mL) を加え、攪拌しながら室温まで放冷した。そのまま約 1 時間攪拌した後、析出した結晶をろ取し、トルエンで洗浄し、減圧下乾燥させ、標題化合物を白色固体として得た (13.5 g、収率 60.0%) 。

25

(実施例 1 5) D-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントインの製造方法

実施例 6 により得られた D-5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (4.38 g) を濃塩酸 (100 g) に溶解し、80°C で 18.5 時間攪拌した。室温まで放冷後、約半量となるまで濃縮した後、30 wt% 水酸化ナトリ

ウム水溶液を30.5g加えてpHを0とした。酢酸エチル(100mL×3)で抽出後、有機相を全量の10%となるまで濃縮した後、トルエン(30mL)を加えて析出した結晶をろ取し、目的のD-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントイン(2.65g)を収率80%で得た。このものの光学純度をHPLC(CHIRALPAK AS(ダイセル社製)、移動相:ヘキサン/イソプロパノール=9/1、流速:1.0ml/min、検出波長:210nm、カラム温度:35°C、保持時間D体;30.4分、L体;33.8分)により測定したところ、L体は検出されなかった。

^1H NMR(400MHz, MeOH-d₄) δ : 1.32(s, 3H), 2.60(d, 1.6Hz, 1H), 2.72(d, 1.6Hz, 1H)。

(実施例16) α -メチル-L-システイン塩酸塩の光学純度決定法

実施例13記載の方法で得られた α -メチル-L-システイン塩酸塩(74.9mg, 0.44mmol)を水(3mL)に溶解させ、炭酸水素ナトリウム(197.7mg)を添加し、エタノール3mLを加えた。窒素置換後、クロロ炭酸ベンジルエステル(0.17mL, 1.10mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に濃塩酸を添加してpH=1.9とし、酢酸エチルで抽出後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。これをPTLC(ヘキサン/酢酸エチル=1/1に少量の酢酸を添加)で精製し ^1H NMRにて分析したところ、目的物(106mg, 収率60%)であることを確認した。これをHPLCにて分析(カラム:CHIRALCEL OD-RH(ダイセル社製)、移動相:リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液(pH2.0)/アセトニトリル=6/4、流速:1.0ml/min、検出波長:210nm、カラム温度:30°C、保持時間19.15分(D)、22.92分(L))した結果、光学純度は98.6% eeであった。

^1H NMR(300MHz, D₂O) δ : 7.30-7.40(m, 10H), 5.22(s, 2H), 5.10(s, 2H), 3.60(s, 2H), 1.63(s, 3H)。

(実施例 17-21) N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-システインの製造方法

5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントインに水酸化ナトリウムと水を加え、所定の温度まで加熱攪拌した。反応液をHPLC分析（カラム：COSMOSIL 5C18-AR（ナカライ社製），移動相：アセトニトリル/10 mMリン酸二水素カリウム水溶液=30/70，流速：1.0 ml/min，検出波長：210 nm，カラム温度：40°C）し、表題化合物の収率を求めた。結果を表1に示す。

表1

実施例	NaOH (モル当量)	水 (倍重量)	反応温度 (°C)	反応時間 (時間)	収率 (%)
17	3.3	1.4	90	44	82
18	3.3	1.4	95	15	81
19	3.3	1.4	100	9	64
20	2.2	1.0	95	13	80
21	1.6	0.7	95	6	54

(実施例 22) N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-システインの製造方法

5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン（5 g、23 mmol）と58%水酸化カリウム水溶液（9.2 g）を混合した後、95°Cまで加熱し、22時間攪拌した。反応液をHPLC分析した結果、反応収率92%で表題化合物が生成していた。

(実施例 23) N-カルバモイル-S-tert-ブチル- α -メチル-システインの製造方法

5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン（5 g、23 mmol）、65%水酸化カリウム水溶液（4.4 g）及び、トルエン5 mlを混合した後、95°Cまで加熱し、27時間攪拌した。反応液をHPLC分析した結果、反応収率88%で表題化合物が生成していた。

(実施例 2 4) N-カルバモイル-5-tert-ブチル- α -メチル-システインの製造方法

5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (5 g、23 mmol)、73%水酸化カリウム水溶液 (5.7 g) 及び、トルエン 10 ml を混合した後、95°C まで加熱し、51 時間攪拌した。反応液を HPLC 分析した結果、反応収率 90% で表題化合物が生成していた。

(実施例 2 5) N-カルバモイル-2-アミノ-2-メチルプロピオン酸の製造方法

10 5, 5-ジメチルヒダントイン 4.0 g、水酸化ナトリウム 4.0 g、水 4.0 g を混合し、85~90°C で 3.5 時間攪拌した。反応混合物を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C18-AR II (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10 mM リン酸二水素カリウム水溶液 = 20/80, 流速: 0.5 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 40°C) にて分析したところ、
15 標題化合物が 3.38 g (収率 74.1%) 生成していた。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ : 1.39 (s, 6H)。

(実施例 2 6) N-カルバモイル-2-アミノ-3-(2-メトキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸の製造方法

20 5-(2-メトキシフェニルメチル)-5-メチルヒダントイン 4.40 g、水酸化ナトリウム 2.64 g、水 3.5 g を混合し、94~96°C で 30 時間反応させた。反応混合物を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C18-AR II (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10 mM リン酸二水素カリウム水溶液 = 20/80, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 40°C) にて分析したところ、標題化合物と 2-アミノ-3-(2-メトキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸と原料が 78.8:5.5:15.5 の面積比で生成していた。

25 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ : 7.32-6.90 (m, 4H), 4.84 (s, 3H), 3.19 (d, 1H), 3.18 (d, 1H), 1.3

7 (s, 3H)。

(実施例 27) N-カルバモイル-S-ベンジル- α -メチル-システインの製造方法

- 5 5-ベンジルチオメチル-5-メチルヒダントイン 5.0 g、水酸化カリウム 3.6 g、水 3 g を混合し、94~96°C で 12 時間反応させた。反応混合物を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C18-AR II (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10 mM リン酸二水素カリウム水溶液 = 30/70, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 254 nm, カラム温度: 40°C) にて
- 10 分析したところ、標題化合物が 3.56 g (収率 66.4%) 生成していた。¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 7.40-7.30 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.15 (d, 1H), 3.14 (d, 1H), 1.41 (s, 3H)。

15 (比較例 1) N-カルバモイル-S-t-ブチル- α -メチル-システインの製造方法

- 5-t-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (5 g, 23 mmol)、水酸化バリウム (11.7)、水 (10 g) を混合した後、95°C まで加熱し、2 時間攪拌した。反応液を HPLC 分析した結果、反応収率 39% で表題化合物
- 20 が生成していた。

(比較例 2) N-カルバモイル-S-t-ブチル- α -メチル-システインの製造方法 (US 5338859 記載の方法により実施)

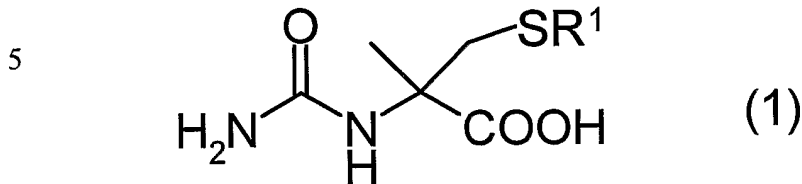
- 5-t-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (純分 10.82 g, 50.0 mmol)、水酸化カルシウム (3.70 g, 50.0 mmol)、水 (60 g) を混合した後、100°C まで加熱し、3.5 時間攪拌した。反応液を HPLC 分析した結果、反応収率 25% で表題化合物が生成していた。
- 25

産業上の利用可能性

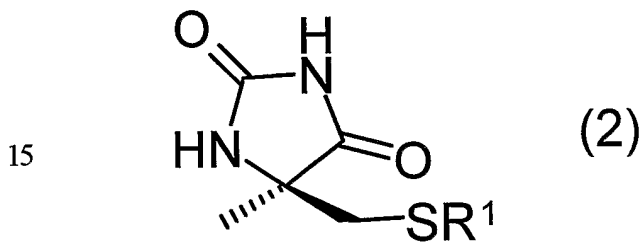
以上述べたように、本発明によれば、安価で入手容易な原料から簡便かつ工業的に実施可能な方法によって、医薬品等の中間体として有用な光学活性 α -メチルシステイン誘導体又はその塩のD体、L体両方を製造することができる。また、該化合物を工業的実施可能な形態で、晶析取得することができる。

請求の範囲

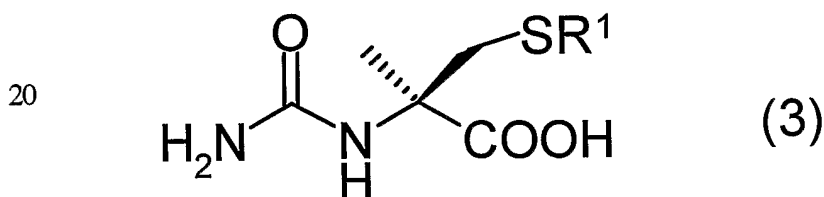
1. 一般式 (1) :



(式中、R¹は置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す) で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩に、ヒダントイナーゼを作用させD体選択的に環化させることを特徴とする、一般式 (2) :



(式中、R¹は前記と同じ) で表されるD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩及び一般式 (3) :



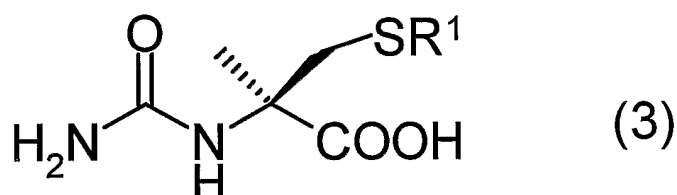
(式中、R¹は前記と同じ) で表されるN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の製造方法。

25

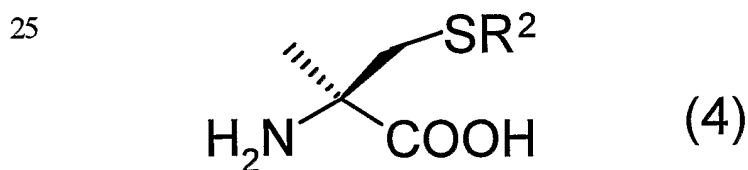
2. ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*) 又はシュードモナス属 (*Pseudomonas*) に属する微生物由来である請求の範囲第1項に記載の製造方法。

3. ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、バチルス・スピーシーズ (*Bacillus* sp.) KNK245 (FERM BP-4863) 又はシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO12996 由来である請求の範囲第1項記載の製造方法。
4. ヒダントイナーゼを固定化酵素として使用することを特徴とする請求の範囲第1から3項のいずれかに記載の製造方法。
- 10 5. R^1 が置換基を有していても良い炭素数4~15の3級アルキル基である請求の範囲第1から4項のいずれかに記載の製造方法。
6. 3級アルキル基が α -ブチル基である請求の範囲第5項記載の製造方法。

- 15 7. 一般式(3) :



- 20 (式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す) で表されるN-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩を脱カルバモイル化し、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式(4) :



- (式中、 R^2 は前記 R^1 若しくは水素原子を表す) で表される α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の製造方法。

8. 脱カルバモイル化を、亜硝酸、又は、亜硝酸の塩及び酸で処理することにより行い、前記式(4)において R^2 が前記式(3)における R^1 と同じである化合物を製造することを特徴とする請求の範囲第7項記載の製造方法。

5

9. 脱カルバモイル化をアルカリで処理することにより行い、前記式(4)において R^2 が前記式(3)における R^1 と同じである化合物を製造することを特徴とする請求の範囲第7項記載の製造方法。

10 10. 脱カルバモイル化に用いるアルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化バリウム、又は水酸化カルシウムであることを特徴とする請求の範囲第9項記載の製造方法。

15 11. 脱カルバモイル化に用いるアルカリが水酸化リチウムであることを特徴とする請求の範囲第9項記載の製造方法。

20 12. 脱カルバモイル化反応後に、反応溶液に酸を加えてpHを下げることにより、前記式(4)において R^2 が前記式(3)における R^1 と同じである化合物を晶析し、結晶を取得する請求の範囲第9から11項のいずれかに記載の製造方法。

13. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第12項記載の製造方法。

25

14. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第12項記載の製造方法。

15. 反応溶液のpHを9.5以下に下げること特徴とする請求の範囲第1

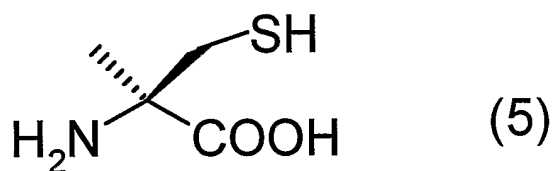
2 から 1 4 項のいずれかに記載の製造方法。

1 6. 前記式 (3) で表される N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩が、請求の範囲第 1 項記載の方法で製造されたものである、

5 請求の範囲第 7 から 1 5 項のいずれかに記載の製造方法。

1 7. 請求の範囲第 7 から 1 5 項のいずれかに記載の方法により得られた、前記式 (4) において R^2 が前記式 (3) における R^1 と同じである化合物を、酸で処理することにより硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式 (5) :

10

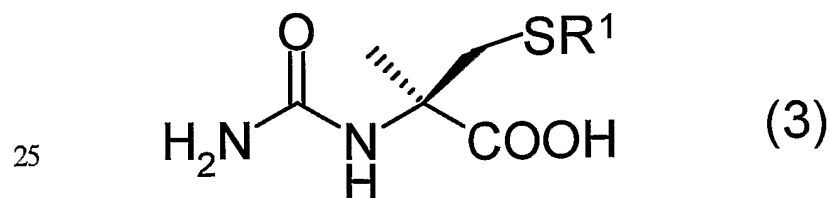


で表される α -メチル-L-システイン又はその塩の製造方法。

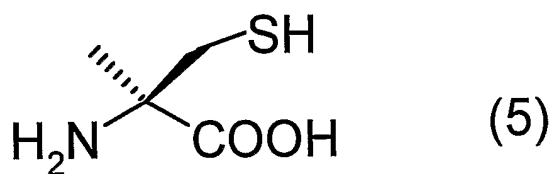
15 1 8. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の 1 種あるいは 2 種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第 1 7 項記載の製造方法。

1 9. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 1 7 項記載の製造
20 方法。

2 0. 一般式 (3) :



25 において R^1 が炭素数 4 ~ 1 5 の 3 級アルキル基である N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩を酸で処理することにより、脱カルバモイル化と硫黄原子の脱保護を同時に行うことを特徴とする、一般式 (5) :



で表される α -メチル-L-システイン又はその塩の製造方法。

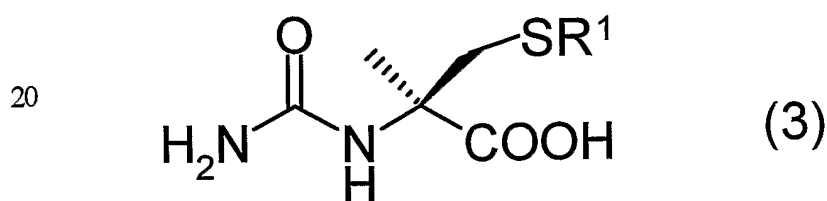
5

21. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第20項記載の製造方法。

10 22. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第20項記載の製造方法。

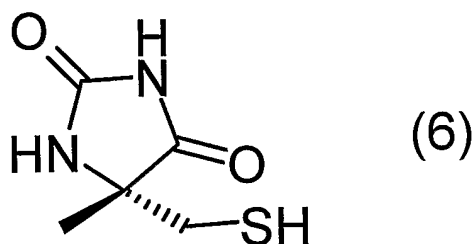
23. 前記式(3)において R^1 が炭素数4~15の3級アルキル基であるN-カルバモイル-L- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩が、請求の範囲第1項記載の方法で製造されたものである請求の範囲第20から22項のいずれかに記載の製造方法。

24. 一般式(3) :



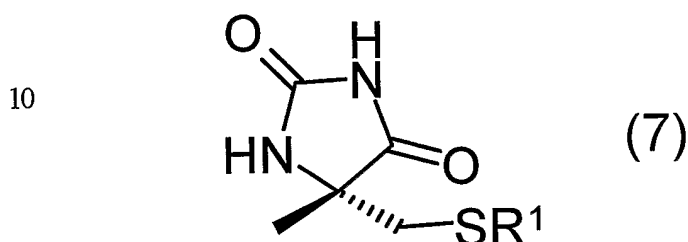
(式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す) で表されるN-カルバモイル-L- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩の、環化及び硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式(6) :

25



5 で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法。

25. 前記式 (3) で表される N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩を環化して、一般式 (7) :



10 (式中、R¹は前記と同じ) で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩とし、次いで酸で処理することにより硫黄原子の脱保護
15 を行うことを特徴とする請求の範囲第 24 項記載の製造方法。

26. 環化反応を、アルカリを用いて行うことを特徴とする請求の範囲第 25 項記載の製造方法。

20 27. 用いるアルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化バリウム、又は、水酸化カルシウムであることを特徴とする請求の範囲第 26 項記載の製造方法。

25 28. 前記式 (3) で表される N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩を酸で処理することにより、硫黄原子の脱保護と環化を同時に行うことを特徴とする請求の範囲第 24 項記載の製造方法。

29. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の 1 種あるいは 2 種以上の混酸であることを特徴とする請求の

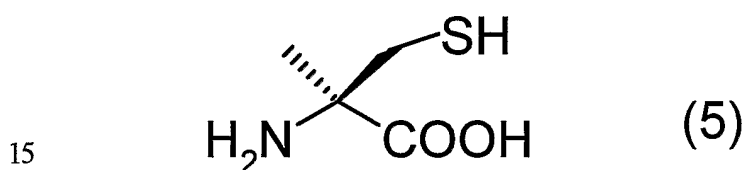
範囲第 25 から 28 項のいずれかに記載の製造方法。

30. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 25 から 28 項のいずれかに記載の製造方法。

5

31. 前記式 (3) で表される N-カルバモイル- α -メチル-L-システイン誘導体又はその塩が、請求の範囲第 1 項記載の方法により得られたものである請求の範囲第 24 から 29 項記載の製造方法。

10 32. 請求の範囲第 24 項記載の方法により得られた前記式 (6) で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩を加水分解することを特徴とする、一般式 (5) :



で表される α -メチル-L-システイン又はその塩の製造方法。

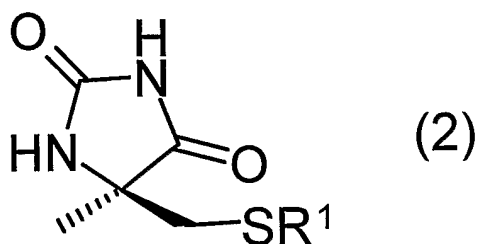
33. 加水分解を酸で行うことを特徴とする請求の範囲第 32 項記載の製造方法。

20

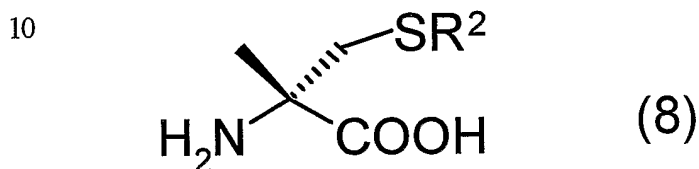
34. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の 1 種あるいは 2 種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第 33 項記載の製造方法。

25 35. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 33 項記載の製造方法。

36. 一般式 (2) :



- 5 (式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基を表す) で表されるD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩を加水分解し、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式(8) :



(式中、 R^2 は前記 R^1 若しくは水素原子を表す) で表される α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩の製造方法。

15

37. 加水分解を、アルカリを用いて行い、前記式(8)において R^2 が前記式(2)における R^1 と同じである化合物を製造することを特徴とする請求の範囲第36項記載の製造方法。

20

38. 加水分解に用いるアルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化バリウム、水酸化マグネシウム、又は、水酸化カルシウムであることを特徴とする請求の範囲第37項記載の製造方法。

25

39. 加水分解反応後に、反応溶液に酸を加えてpHを下げることにより、前記式(8)において R^2 が前記式(2)における R^1 と同じである化合物を晶析し、結晶を取得する請求の範囲第36から38項のいずれかに記載の製造方法。

40. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の

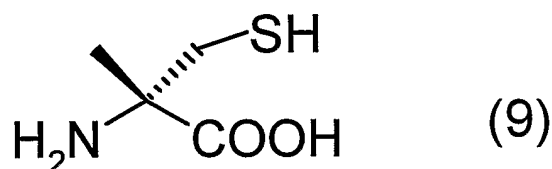
範囲第 3 9 項記載の製造方法。

4 1. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 3 9 項記載の製造方法。

5

4 2. 反応溶液の pH を 9.5 以下に下げること特徴とする請求の範囲第 3 9 から 4 1 項のいずれかに記載の製造方法。

4 3. 請求の範囲第 3 6 項記載の方法により得られた前記式 (8) で表される化合物において R^2 が前記式 (2) における R^1 と同じである化合物を、酸で処理することにより硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式 (9) :



15 で表される α -メチル-D-システイン又はその塩の製造方法。

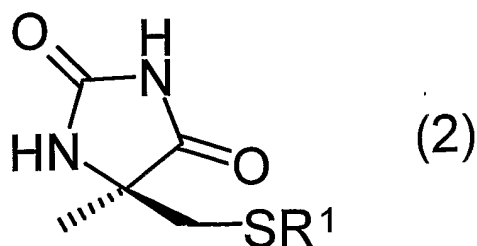
4 4. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の 1 種あるいは 2 種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第 4 3 項記載の製造方法。

20

4 5. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 4 3 項記載の製造方法。

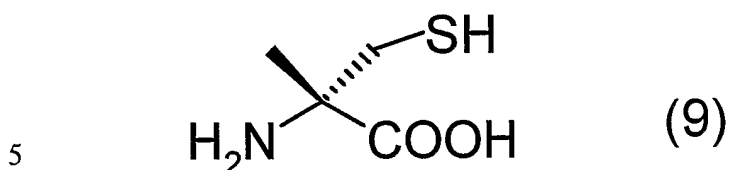
4 6. 一般式 (2) :

25



において R^1 が炭素数 4 ~ 15 の 3 級アルキル基である化合物を、酸で処理する

ことにより加水分解反応と硫黄原子の脱保護を同時に行うことを特徴とする、一般式（9）：



で表される α -メチルーD-システイン又はその塩の製造方法。

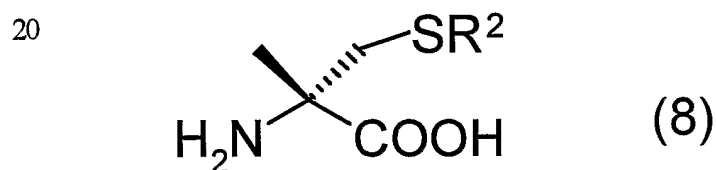
47. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第46項記載の製造方法。

10

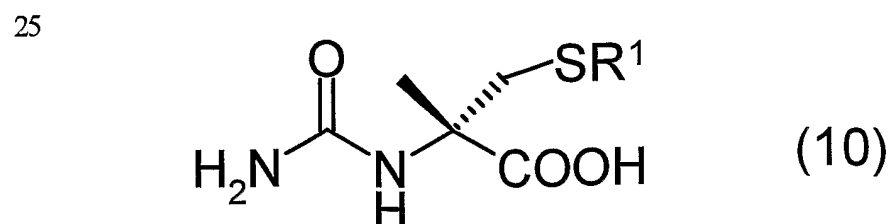
48. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第46項記載の製造方法。

15 49. 前記式（2）において R^1 が炭素数4～15の3級アルキル基である化合物が、請求の範囲第1項記載の方法で製造されたものである、請求の範囲第46から48項のいずれかに記載の製造方法。

50. 一般式（8）：

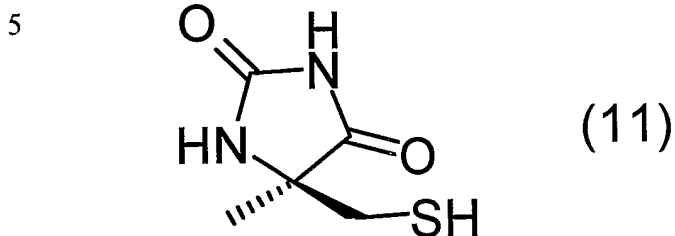


において R^2 が下記式（10）における R^1 と同じである化合物をカルバモイル化し、一般式（10）：



（式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基

を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基を表す) で表されるN-カルバモイル- α -メチル-D-システイン誘導体又はその塩とし、次いで環化及び硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式(11) :



で表されるD-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法。

10

5 1. カルバモイル化を、シアン酸のアルカリ金属塩及び酸を用いて行うことを特徴とする請求の範囲第50項記載の製造方法。

5 2. 硫黄原子の脱保護と環化反応を酸で行うことを特徴とする請求の範囲第

15 50又は51項記載の製造方法。

5 3. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第52項記載の製造方法。

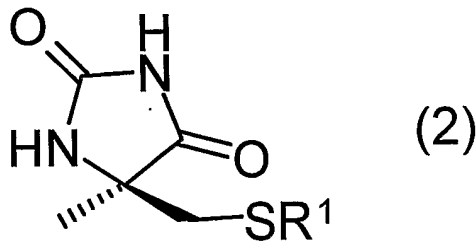
20

5 4. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第52項記載の製造方法。

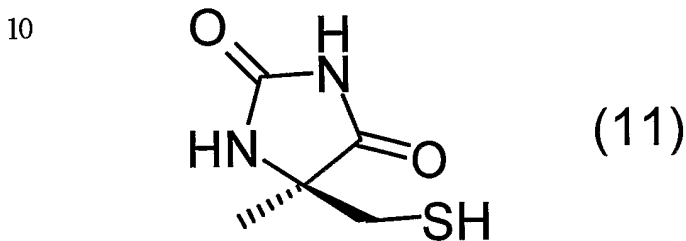
5 5. 前記式(8)において R^2 が前記式(10)における R^1 と同じである化合物が、請求の範囲第36項記載の方法により得られたものであることを特徴とする請求の範囲第50から54項のいずれかに記載の製造方法。

25

5 6. 一般式(2) :



- 5 (式中、R¹は置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基を表す) で表されるD-5-メチルー5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩を酸で処理することにより、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする、一般式(11) :



10 で表されるD-5-メチルー5-チオメチルヒダントイン又はその塩の製造方法。

15

57. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸から選ばれる任意の1種あるいは2種以上の混酸であることを特徴とする請求の範囲第56項記載の製造方法。

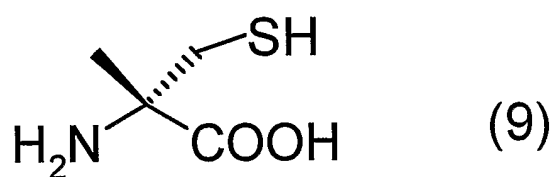
20

58. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第56項記載の製造方法。

25

59. 前記式(2)で表される化合物が、請求の範囲第1項記載の方法により得られたものであることを特徴とする、請求の範囲第56から58項のいずれかに記載の製造方法。

60. 請求の範囲第56項記載の方法で得られた、前記式(11)で表されるD-5-メチルー5-チオメチルヒダントイン又はその塩を加水分解することを特徴とする、一般式(9) :



で表される α -メチルーD-システイン又はその塩の製造方法。

5

6 1. 加水分解を酸で行うことを特徴とする請求の範囲第 6 0 項記載の製造方法。

6 2. 用いる酸が、塩酸、硫酸、臭化水素酸、硝酸、酢酸、トリフルオロ酢酸
10 から選ばれる任意の 1 種あるいは 2 種以上の混酸であることを特徴とする請求の
範囲第 6 1 項記載の製造方法。

6 3. 用いる酸が塩酸であることを特徴とする請求の範囲第 6 1 項記載の製造
方法。

15

6 4. 光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共
存下に、該化合物の晶出を行うことを特徴とする光学活性 α -メチルシステイン
又はその塩の晶析方法。

20 6 5. 光学活性 α -メチルシステインの酸との塩を取得する請求の範囲第 6 4
項記載の晶析方法。

6 6. 光学活性 α -メチルシステインのハロゲン化水素酸との塩を取得する請
求の範囲第 6 5 項記載の晶析方法。

25

6 7. 光学活性 α -メチルシステイン塩酸塩を取得する請求の範囲第 6 5 項記
載の晶析方法。

6 8. 請求の範囲第 7、17、20、32、36、43、46 又は 6 0 項に記

載の方法により製造された光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を晶析する、請求の範囲第64から67項のいずれかに記載の晶析方法。

69. 光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共存下に、濃縮を行い、水を系外に除去すると共に、有機溶剤に置換し、該化合物を晶出させる請求の範囲第64から68項のいずれかに記載の晶析方法。

70. 有機溶剤として、水と相溶性の低い又はない有機溶剤を用いる請求の範囲第69項記載の晶析方法。

10

71. 有機溶剤として、炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、又はエーテル系溶剤を用いる請求の範囲第69又は70項記載の晶析方法。

72. 有機溶剤として、炭化水素系溶剤を用いる請求の範囲第69又は70項記載の晶析方法。

15

73. 炭化水素系溶剤として、トルエン、ベンゼン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン及びヘプタンから選ばれる一種又は二種以上の混合溶剤を用いる、請求の範囲第72項記載の晶析方法。

20

74. 光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の濃度が1~70重量%で晶出を行う、請求の範囲第69から73項のいずれかに記載の晶析方法。

75. 残存する水の量として、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩に対して100重量%以下まで濃縮、溶剤置換し、晶出する光学活性 α -メチルシステイン又はその塩を取得する、請求の範囲第69から74項のいずれかに記載の晶析方法。

25

76. 濃縮時の蒸発速度を、 $1000\text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ 以下に制御して行う請求の

範囲第69から75項のいずれかに記載の晶析方法。

77. 濃縮時の蒸発速度を、 $600\text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ 以下に制御して行う請求の範囲第69から75項のいずれかに記載の晶析方法。

5

78. 濃縮時の蒸発速度を、 $300\text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ 以下に制御して行う請求の範囲第69から75項のいずれかに記載の晶析方法。

79. 濃縮時の減圧度を、 500 mmHg 以下に制御する請求の範囲第69から78項のいずれかに記載の晶析方法。

10

80. 光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共存下に、濃縮を行い、水を系外に除去すると共に有機溶剤に置換し、析出する難溶性無機塩をろ別した後、該化合物の溶液から、貧溶媒添加、冷却、又は濃縮の操作により、該化合物を晶出させる請求の範囲第64から68項のいずれかに記載の晶析方法。

15

81. 残存する水の量として、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩に対して 100 重量%以下まで水分を系外に除去する請求の範囲第80項記載の晶析方法。

20

82. 置換する有機溶剤として、アルコール系溶剤単独、エーテル系溶剤単独、又は、各々を任意に混合した溶剤を用いる請求の範囲第80又は81項のいずれかに記載の晶析方法。

25

83. アルコール系溶剤が、メチルアルコール、エチルアルコール、 n -プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、 n -ブチルアルコール、 sec -ブチルアルコール、イソブチルアルコール、 t -ブチルアルコールのいずれか1種あるいは2種以上の混合溶媒である請求の範囲第82項記載の晶析方法。

84. エーテル系溶剤が、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、メチル-tert-ブチルエーテルのいずれか1種あるいは2種以上の混合溶媒である請求の範囲第82項記載の晶析方法。

5

85. α -メチルシステイン又はその塩を晶出させる為に、貧溶媒を加えることを特徴とする請求の範囲第80から84項のいずれかに記載の晶析方法。

86. 貧溶媒が、炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、エーテル系溶剤のいずれか一種又は二種以上の混合溶媒である請求の範囲第85項記載の晶析方法。

10

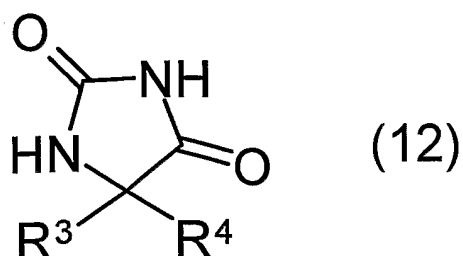
87. 貧溶媒が、炭化水素系溶剤である請求の範囲第85項記載の晶析方法。

88. 炭化水素系溶剤が、トルエン、キシレン、ヘキサン、ヘプタンのいずれか一種又は二種以上の混合溶媒である請求の範囲第87項記載の晶析方法。

15

89. 光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の晶析時の濃度が、1~70重量%である請求の範囲第80から88項のいずれかに記載の晶析方法。

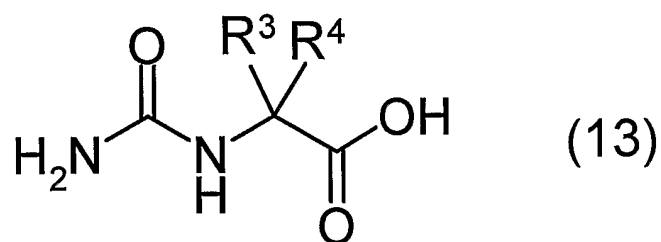
20 90. 一般式(12) :



(式中、 R^3 、 R^4 はそれぞれ独立して置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6~20のアリール基を表す) で表される

25 ラセミ体5,5-二置換ヒダントイン誘導体又はその塩を、有機塩基又はアルカ

リ金属水酸化物を用いて加水分解を行うことを特徴とする、一般式 (13) :



(式中、 R^3 、 R^4 は前記と同じ) で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体又はその塩の製造方法。

5

9 1. 用いるアルカリ金属水酸化物が、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムであることを特徴とする請求の範囲第90項記載の製造方法。

9 2. 前記式 (12) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体
10 又はその塩に対し、0.1倍から10倍重量の水を用いることを特徴とする、請求の範囲第90又は91項のいずれかに記載の製造方法。

9 3. 前記式 (12) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体
15 又はその塩に対し、0.2倍から3倍重量の水を用いることを特徴とする、請求の範囲第90から92項のいずれかに記載の製造方法。

9 4. 前記式 (12) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体
又はその塩に対し、1モル当量から10モル当量の塩基を用いることを特徴とする、請求の範囲第90から93項のいずれかに記載の製造方法。

20

9 5. 前記式 (12) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体
又はその塩に対し、2モル当量から5モル当量の塩基を用いることを特徴とする、請求の範囲第90から94項のいずれかに記載の製造方法。

25 9 6. 前記式 (12) で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体

又はその塩に対し、0.2倍から3倍重量の水と、2モル当量から5モル当量の塩基を用いることを特徴とする、請求の範囲第90から95項のいずれかに記載の製造方法。

5 97. 溶媒として、水単独、又は、水と有機溶剤の混合溶媒を使用する請求の範囲第90から96項のいずれかに記載の製造方法。

98. 水と組み合わせる有機溶剤として、炭化水素系有機溶媒を用いる請求の範囲第97項記載の製造方法。

10

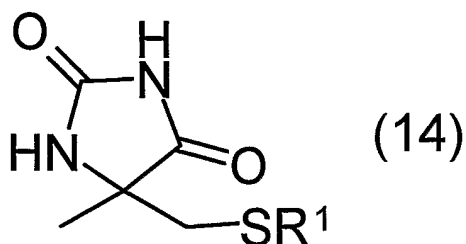
99. 反応温度が80℃から110℃であることを特徴とする請求の範囲第90から98項のいずれかに記載の製造方法。

100. 前記式(12)において、R³が置換基を有していても良い炭素数1
15 ~6の1級アルキル基であることを特徴とする請求の範囲第90から99項のいずれかに記載の製造方法。

101. 前記式(12)において、R³がメチル基であることを特徴とする請求の範囲第100項に記載の製造方法。

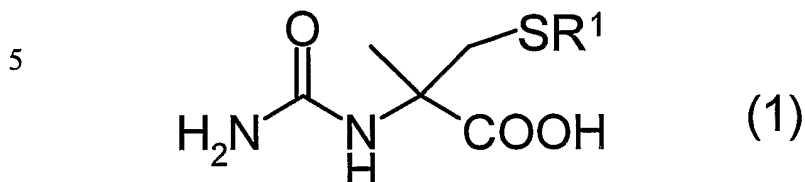
20

102. 前記式(12)で表されるラセミ体5, 5-二置換ヒダントイン誘導体として、一般式(14)：



(式中、R¹は置換基を有していても良い炭素数1~20のアルキル基、置換基
25 を有していても良い炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換基を有していて

も良い炭素数6～20のアリール基を表す)で表される化合物を用い、前記式(13)で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体として、一般式(1):



(式中、 R^1 は前記と同じ)で表される化合物を製造する請求の範囲第90から101項のいずれかに記載の製造方法。

10

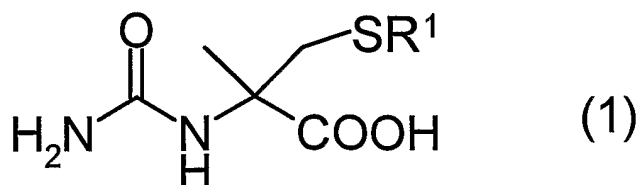
103. 前記式(14)において R^1 が t -ブチル基であることを特徴とする請求の範囲第102項に記載の製造方法。

104. 請求の範囲第102又は103項のいずれかの方法により製造された前記式(1)で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩を用いることを特徴とする、請求の範囲第1から5項のいずれかに記載の製造方法。

15

105. 一般式(1):

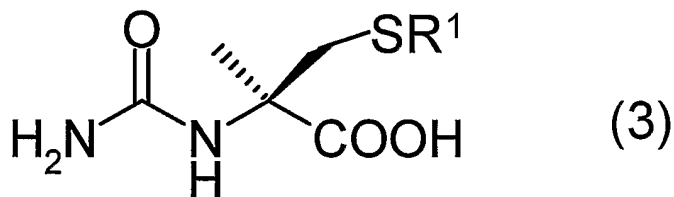
20



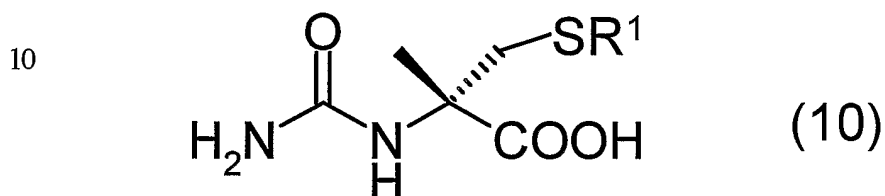
(式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基を表す)で表されるラセミ体N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩。

25

106. 一般式(3):



(式中、 R^1 は置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基を表す)、又は、一般式(10)：



(式中、 R^1 は前記と同じ)で表される、L体又はD体の光学活性N-カルバモイル- α -メチルシステイン誘導体又はその塩。

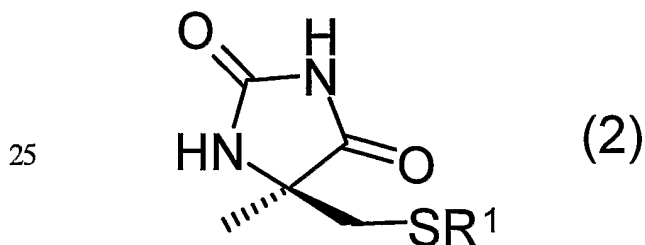
15

107. R^1 が炭素数4～15の3級アルキル基である請求の範囲第105又は106項記載の化合物。

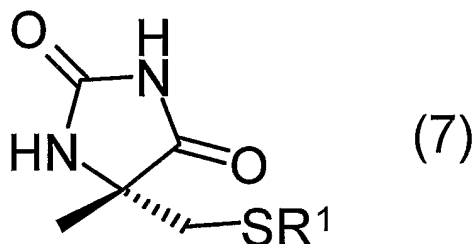
108. 3級アルキル基がt-ブチル基である請求の範囲第107項記載の化合物。

20

109. 一般式(2)：



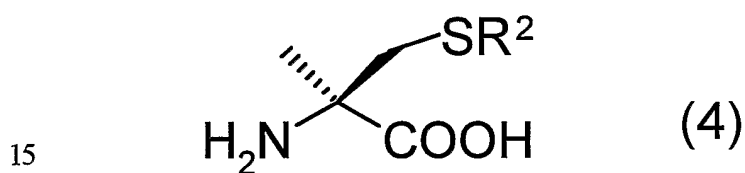
又は一般式(7)：



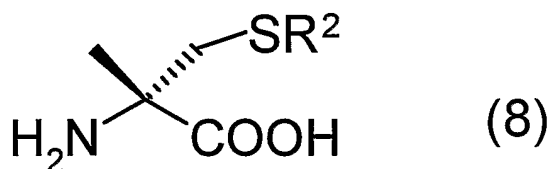
においてR¹が炭素数4～15の3級アルキル基である、D体又はL体の光学活性5-メチル-5-チオメチルヒダントイン誘導体又はその塩。

110. 3級アルキル基がt-ブチル基である請求の範囲第109項記載の化合物。

111. 一般式(4) :



又は一般式(8) :

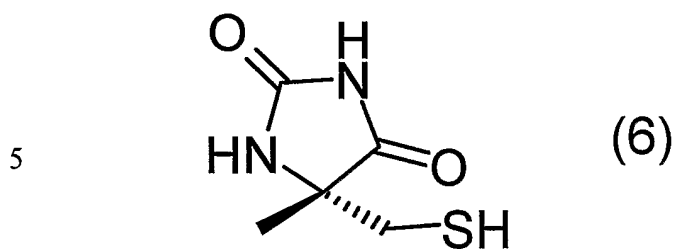


20 において、R²が置換基を有していても良い炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換基を有していても良い炭素数6～20のアリール基である、L体又はD体の光学活性α-メチルシステイン誘導体又はその塩。

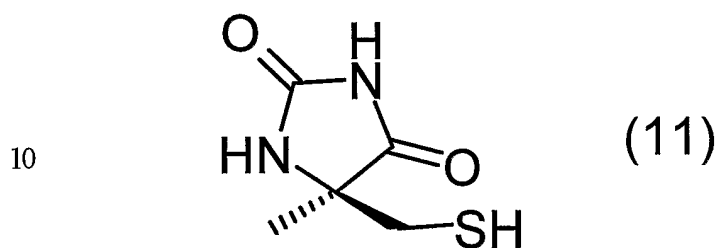
25 112. R²が炭素数4～15の3級アルキル基である請求の範囲第111項記載の化合物。

113. 3級アルキル基がt-ブチル基である請求の範囲第112項記載の化合物。

114. 一般式(6) :



又は一般式(11) :



で表される、L体又はD体の光学活性5-メチルー5-チオメチルヒダントイン
又はその塩。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07108

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁷ C12P13/12, 17/04, C07C323/58, 319/02, 319/14//C07D233/76</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																																			
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁷ C12P13/12, 17/04, C07C323/58, 319/02, 319/14//C07D233/76</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS (STN), REGISTRY (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)</p>																																			
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/72702 A2 (PHARMACIA CORP.), 04 October, 2001 (04.10.01), Full text & EP 1265859 A2 & JP 2003-528852 A</td> <td>64-89, 109-114</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5338859 A (HOECHST CELANESE CORP.), 16 August, 1994 (16.08.94), Full text (Family: none)</td> <td>90-103,105</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>MULQUEEN G.C. et al., Synthesis of the Thiazoline-based Siderophore (S)-Desferrithiocin, Tetrahedron, 1993, 49(24), pages 5359 to 5364</td> <td>64-89</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>PATTENDEN G. et al., Enantioselective Synthesis of 2-Alkyl Substituted Cysteines, Tetrahedron, 1993, 49(10), pages 2131 to 2138</td> <td>64-89</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p> <table border="1"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td>Date of the actual completion of the international search 15 October, 2003 (15.10.03)</td> <td>Date of mailing of the international search report 04 November, 2003 (04.11.03)</td> </tr> <tr> <td>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</td> <td>Authorized officer</td> </tr> <tr> <td>Facsimile No.</td> <td>Telephone No.</td> </tr> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/72702 A2 (PHARMACIA CORP.), 04 October, 2001 (04.10.01), Full text & EP 1265859 A2 & JP 2003-528852 A	64-89, 109-114	X	US 5338859 A (HOECHST CELANESE CORP.), 16 August, 1994 (16.08.94), Full text (Family: none)	90-103,105	X	MULQUEEN G.C. et al., Synthesis of the Thiazoline-based Siderophore (S)-Desferrithiocin, Tetrahedron, 1993, 49(24), pages 5359 to 5364	64-89	X	PATTENDEN G. et al., Enantioselective Synthesis of 2-Alkyl Substituted Cysteines, Tetrahedron, 1993, 49(10), pages 2131 to 2138	64-89	* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		Date of the actual completion of the international search 15 October, 2003 (15.10.03)	Date of mailing of the international search report 04 November, 2003 (04.11.03)	Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	Facsimile No.	Telephone No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																																	
X	WO 01/72702 A2 (PHARMACIA CORP.), 04 October, 2001 (04.10.01), Full text & EP 1265859 A2 & JP 2003-528852 A	64-89, 109-114																																	
X	US 5338859 A (HOECHST CELANESE CORP.), 16 August, 1994 (16.08.94), Full text (Family: none)	90-103,105																																	
X	MULQUEEN G.C. et al., Synthesis of the Thiazoline-based Siderophore (S)-Desferrithiocin, Tetrahedron, 1993, 49(24), pages 5359 to 5364	64-89																																	
X	PATTENDEN G. et al., Enantioselective Synthesis of 2-Alkyl Substituted Cysteines, Tetrahedron, 1993, 49(10), pages 2131 to 2138	64-89																																	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																																		
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																																		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family																																		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																																			
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																																			
Date of the actual completion of the international search 15 October, 2003 (15.10.03)	Date of mailing of the international search report 04 November, 2003 (04.11.03)																																		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer																																		
Facsimile No.	Telephone No.																																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07108

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EP 801131 A1 (KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.), 15 October, 1997 (15.10.97), Full text & WO 96/20275 A1 & JP 8-520361 A	1-6,106-110/ 7-114
X/Y	EP 725142 A1 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISYA), 07 August, 1996 (07.08.96), Full text & US 5962279 A & WO 96/00296 A1 & JP 8-503010 A	1-6,106-110/ 7-114
Y	EP 175312 A2 (KENEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISYA), 26 March, 1986 (26.03.86), Full text & US 4812406 A & JP 61-72762 A & JP 1-124398 A	7-114
Y	JP 49-48534 B1 (Asahi Kasei Corp.), 21 December, 1974 (21.12.74), Full text (Family: none)	20-55,60-114
P,X	WO 02/74750 A1 (ASTRAZENECA AB.), 26 September, 2002 (26.09.02), Full text (Family: none)	109-110
A	JP 56-58493 A (KENEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISYA), 21 May, 1981 (21.05.81), Full text (Family: none)	1-114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07108

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

<Unity of invention>

The "special technical feature" of claims 1 to 35 and 90 to 114 resides in a process for producing α -methyl-L-cysteine or its salt from a compound represented by the general formula (14) via the compounds represented by the general formulae (1) and (3);

the "special technical feature" of claims 1 to 6, 36 to 63 and 90 to 114 resides in a process for producing α -methyl-D-cysteine or its salt from a compound represented by the general formula (14) via the compounds represented by the general formulae (1) and (2); and

the "special technical feature" of claims 64 to 89 resides in a process for crystallizing an optically active α -methylcysteine or its salt characterized in that the compound is crystallized from an aqueous solution of the optically active α -methylcysteine or its salt in the coexistence of an organic solvent.

Since there is no technical relationship among these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the claims have the following three groups of inventions:

- 1.the inventions as set forth in claims 1 to 35 and 90 to 114;
 - 2.the inventions as set forth in claims 1 to 6, 36 to 63 and 90 to 114;
- and
- 3.the inventions as set forth in claims 64 to 89.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12P13/12, 17/04, C07C323/58, 319/02, 319/14 // C07D233/76

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12P13/12, 17/04, C07C323/58, 319/02, 319/14 // C07D233/76

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAS(STN), REGISTRY(STN), WPI/BIOSIS(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/72702 A2 (PHARMACIA CORPORATION) 2001. 10. 04 全文 & EP 1265859 A2 & JP 2003-528852 A	64-89, 109-114
X	US 5338859 A (HOECHST CELANESE CORPRATION) 1994. 08. 16 全文(ファミリーなし)	90-103, 105
X	MULQUEEN G. C. et al., Synthesis of the Thiazoline-based Siderophore (S)-Desferrithiocin Tetrahedron, 1993, 49 (24), p. 5359-5364	64-89

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願


の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 10. 03

国際調査報告の発送日 04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 3131
 本間 夏子 
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	PATTENDEN G. et al., Enantioselective Synthesis of 2-Alkyl Substituted Cysteines Tetrahedron, 1993, 49(10), p. 2131-2138	64-89
X/Y	EP 801131 A1 (KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 1997. 10. 15, 全文 & WO 96/20275 A1 & JP 8-520361 A	1-6, 106-110/ 7-114
X/Y	EP 725142 A1 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISYA) 1996. 08. 07, 全文 & US 5962279 A & WO 96/00296 A1 & JP 8-503010 A	1-6, 106-110/ 7-114
Y	EP 175312 A2 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISYA) 1986. 03. 26, 全文 & US 4812406 A & JP 61-72762 A & JP 1-124398 A	7-114
Y	JP 49-48534 B1 (旭化成工業株式会社) 1974. 12. 21 全文(ファミリーなし)	20-55, 60-114
PX	WO 02/74750 A1 (ASTRAZENECA AB) 2002. 09. 26 全文(ファミリーなし)	109-110
A	JP 56-58493 A (鐘淵化学工業株式会社) 1981. 05. 21 全文(ファミリーなし)	1-114

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<発明の単一性について>

請求の範囲1-35, 90-114の「特別な技術的特徴」は、一般式(14)で表される化合物から、一般式(1)、一般式(3)で表される化合物を経て、 α -メチル-L-システイン又はその塩を製造する方法に関し、

請求の範囲1-6, 36-63, 90-114の「特別な技術的特徴」は、一般式(14)で表される化合物から、一般式(1)、一般式(2)で表される化合物を経て、 α -メチル-D-システイン又はその塩を製造する方法に関し、

請求の範囲64-89の「特別な技術的特徴」は、光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の水溶液から、有機溶剤の共存下に、該化合物の晶出を行うことを特徴とする光学活性 α -メチルシステイン又はその塩の晶析方法に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、請求の範囲には、

- ①請求の範囲1-35, 90-114に記載の発明
 - ②請求の範囲1-6, 36-63, 90-114に記載の発明
 - ③請求の範囲64-89に記載の発明
- の3発明が記載されている。