



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I685480 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：103137359

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07C319/28 (2006.01)

C07C323/58 (2006.01)

C07C323/59 (2006.01)

C12P41/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/11/01 日本

2013-228790

(71)申請人：日商糖鎖工學研究所股份有限公司 (日本) GLYTECH, INC. (JP)

日本

(72)發明人：梶原康宏 KAJIHARA, YASUHIRO (JP) ; 森下靖仁 MORISHITA, YASUHITO (JP) ; 村瀬健文 MURASE, TAKEFUMI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 1553959A

WO 97/34871A

Y. Morishita et al., "P-003: Development of a concise synthetic strategy of β -mercapto amino acid derivatives", The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & THE 50TH JAPANESE PEPTIDE SYMPOSIUM APIPS 2013, KOEN YOSHISHU, 06-08/11/, 20131010; 20131106-20131108 Japanese Peptide Society, JP.

Clarence T. T. Wong et al., "Synthetic cysteine surrogates used in native chemical ligation", Mol. BioSyst., Vol.9, No.5, January 2013, pages 826-833.

審查人員：王嘉薇

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：2 共 74 頁

(54)名稱

具有硫醇基之 D-體或 L-體胺基酸衍生物的製造方法

(57)摘要

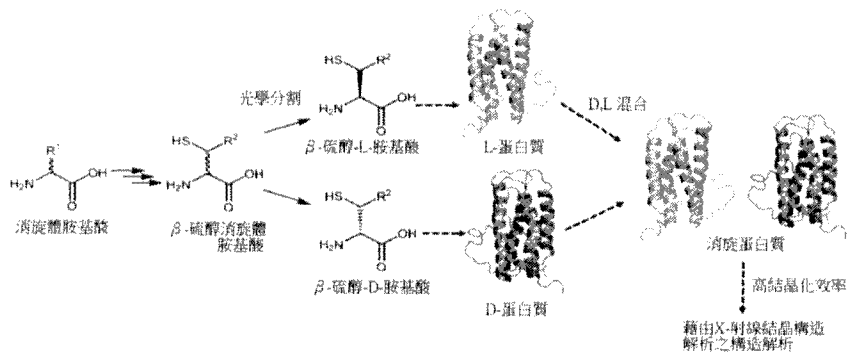
本發明是提供將在側鏈有硫醇基之光學活性 D-體及/或 L-體胺基酸，以簡易的方法，以高收率製造的方法做為課題。

本發明是提供在側鏈有硫醇基的胺基酸衍生物的製造方法，及其中間體，該製造方法係製造包含在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物的 D-體及 L-體的中間體組成物，使 D-或 L-胺基酸選擇性的水解酶反應，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物。

This invention provides a producing method of an optical active D-form and/or L-form amino acid having a thiol group on its side chain by a simple method with good yield.

This invention provides a producing method of an amino acid derivative having a thiol group on its side chain, and an intermediate thereof, wherein the producing method is characterized by producing an intermediate composition comprising a D-form and L-form of amino acid derivate having a thiol group at β -position, reacting D- or L-amino acid selective hydrolytic enzyme, and isolating the hydrolyzed D- or L-amino acid derivative.

指定代表圖：



第1圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有硫醇基之 D-體或 L-體胺基酸衍生物的製造方法

A PRODUCING METHOD OF D-FORM OR L-FORM
AMINO ACID DERIVATIVES HAVING A THIOL GROUP

【技術領域】

【0001】 本發明是關於側鏈有硫醇基的 D-體或 L-體胺基酸衍生物的製造方法。又，本發明是關於在側鏈有硫醇基的 D-體或 L-體胺基酸衍生物的製造方法所使用的中間體。

【先前技術】

【0002】 近年，生物醫藥的研究開發的進展，由合成胜肽及蛋白質進行構造及機能的解析之例，及將胜肽及蛋白質做為醫藥使用之例正增加。胜肽及蛋白質是由胺基酸構成，構成蛋白質的 α -胺基酸除了側鏈取代基是氫原子的情況外， α 碳原子是不對稱原子之故，有稱為 D-體及 L-體的鏡像異構物存在。在生體內存在的胜肽及蛋白質，由 L-胺基酸所構成，所以要合成在生體內存在的胜肽及蛋白質，其原料需要是有光學活性的 L-胺基酸。又，近年來，在蛋白質的構造解析上，期待提高蛋白質的結晶化效率，而使用消旋蛋白質的 X 射線結晶構造解析受到注目。在這裡，消旋蛋白質就是只有 D-胺基酸所成的蛋白質與只有 L-胺基酸所成的蛋白質的等量混合物的蛋白質。解析蛋白質

的構造是理解蛋白質機能的重要的知識。爲了由這種消旋蛋白質的結晶化而進行構造解析起見，合成 D-蛋白質及 L-蛋白質的雙方的需要性提高。要將這種 D-蛋白質及 / 或 L-蛋白質製造並安定的供給，則有必要將做爲原料的光學活性 D-胺基酸、L-胺基酸各分別大量以高效率製造。特別是，D-蛋白質爲天然不存在，只有由化學合成才有合成的可能，成爲原料的 D-胺基酸的工業生產是必要不可欠的。

【0003】 又，要合成高分子的蛋白質時，以固相合成等製造胜肽的方法，則能製造的胜肽的長度有限，所以需要將所製造的胜肽連結起來。胜肽結合法而言，是採用名爲自然化學接合法 NCL(Native Chemical Ligation)的方法。在 NCL 中，將 N 末端具有在側鏈有硫醇基的胺基酸的胜肽，與其他胜肽的 C 末端，利用硫醇基的反應性而結合。因而，在 NCL 中，主要是在側鏈有硫醇基的胺基酸的半胱胺酸做爲結合部位而設計蛋白質合成。又，在使用硫醇基的結合反應後將構造改變爲其他的胺基酸，而想出以丙胺酸等做爲結合部位的方法等。但是，雖然如此，可能做爲結合部位的胺基酸仍舊是非常有限，這一點成爲蛋白質合成的限制因素。

【0004】 因而，高分子的 D-或 L-蛋白質的製造上，要製造可做爲 NCL 的結合部位的胺基酸的話，需要製造在側鏈經導入硫醇基的光學活性 D-或 L-胺基酸。但是，這種胺基酸的製造方法而言，以 D-或 L-胺基酸做爲原料，有嚐試不要發生異構化而經由多數的複雜的步驟而在側鏈導入

硫醇基的方法，但由這種方法要以高收量及高收率製造目的之胺基酸是非常困難。並且，製造光學活性胺基酸的方法而言，亦存在有關使用立體選擇性的酶的方法等的報告（參照專利文獻 1，2）。但是，在這些中，沒有特別述及在側鏈有硫醇基等的所希望的取代基的胺基酸的製造等。又，酶有基質特異性，所以對於在 β 位有例如經保護的硫醇基之容積大的取代基的胺基酸衍生物也不能說酶有效。然後，高分子的 D-或 L-蛋白質的製造上，可做為 NCL 的結合部位使用之光學活性 β -硫基胺基酸衍生物，至今為止，還沒有達到以可使 D-或 L-蛋白質的工業生產的態樣而製造的程度。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻 1] 日本專利特開平 6-125786

[專利文獻 2] 日本專利特開平 11-69992

【發明內容】

[發明要解決的課題]

【0006】 本發明的課題是提供在側鏈有硫醇基的光學活性的 D-體及/或 L-體胺基酸，能以簡易的方法，以高收率製造的方法為課題。特別是，本發明者等，爲了要增加可做為藉由 NCL 的結合部位的胺基酸的變化，將側鏈有硫醇基的天然型或非天然型的種種 D-或 L-胺基酸，以高收率製造做為課題。

[解決課題的手段]

【0007】 本發明者等爲了要解決前述課題精心進行研究。根據光學活性 D-或 L-胺基酸做爲原料的以往方法，不對稱碳原子的立體異構的調控非常困難。於是，本發明者等刻意將有硫醇基的胺基酸衍生物做爲立體異構物混合存在的中間體組成物而製造之後，使用酶將 α 碳原子的 D-體與 L-體分離，驚訝的是發現以比以往較少的步驟數的簡易方法，以高收率，而可製造在側鏈有硫醇基的光學活性胺基酸衍生物。即，本發明者等著眼於，在 NCL 法中，可使用將用於肽結合反應的硫醇基在結合反應後除去的方法。本發明者等想到，將在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物 (β -硫基胺基酸衍生物)，不實施 α 及 β 碳原子的立體異構的調控，在最後做爲 α 碳原子以光學活性體精製所得者可用於 NCL 的結合部位。即， α 及 β 碳原子是不對稱原子的 β -硫基胺基酸衍生物的 D-體或 L-體，藉由在 NCL 反應後除去硫醇基，則可變成只有 α 碳原子爲不對稱碳原子的 α 碳原子的光學活性 D-體或 L-體，而可合適當作用於 NCL 結合部位的胺基酸而使用。

【0008】 再者，本發明者等，爲了要製造對天然型或非天然型的種種的胺基酸經導入硫醇基的光學活性衍生物，精心檢討作爲中間體的立體異構物混合存在的胺基酸衍生物組成物的製造方法。其結果，本發明者等發現，藉由使用芳族胺基酸或甘胺酸做爲原料，對包括天然型胺基酸的種種的胺基酸在側鏈經導入硫醇基的非天然型胺基

酸，可簡易且以高收率製造成為 D-體或 L-體胺基酸。

【0009】 即，本發明是提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法。該製造方法的特徵在於，製造包括 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物，對所得的胺基酸衍生物使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶中的任一種酶反應，繼而，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物。

【0010】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，其特徵是含有以下的步驟，

(I)對胺基酸衍生物，實施以下的反應，而製造含有 D-體及 L-體，在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(A)在該胺基酸衍生物的 β 碳原子導入保護或無保護的硫醇基的反應，

及，

(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基或羧基，轉變為會成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，

及，

(II)對(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶中的任一種酶反應，繼而，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0011】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位

有經保護或未經保護的硫醇基及取代基 R^1 的 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物〔在這裡， R^1 是指構成胺基酸的側鏈的取代基中，結合在 β 碳原子的取代基部分而言(但，氫原子的情況除外)。〕的製造方法。

【0012】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於前述「在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基及取代基 R^1 的 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法」中，

在前述步驟(I)中，前述反應(A)之前，包含作為步驟(P)之製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟，

前述反應(A)是與使前述脫離基 L 脫離胺基酸衍生物的 β 碳原子的反應一起實施。

【0013】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於前述取代基 R^1 是芳族取代基，前述步驟(P)包含作為步驟(P-1)之對在 β 碳原子有取代基 R^1 的胺基酸衍生物，在 β 碳原子導入脫離基 L 的步驟。

【0014】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於前述步驟(P)，包含作為步驟(P-2)之使甘胺酸與以 $R^1CH=O$ 代表的醛化合物反應的步驟。

【0015】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於前述步驟(B)是，將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基變換為醯基胺基的反應，在前述步驟(II)中的 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶是 D-或 L-胺基醯化酶(aminoacylase)。

【0016】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在

前述步驟(II)中，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟，含有對經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物導入脂溶性保護基的步驟，藉由因脂溶性保護基的有無而產生的疏水性的差異，分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0017】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的 D-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，在前述步驟(II)中，使用 D-胺基酸選擇性水解酶，繼而，分離經水解的 D-胺基酸衍生物。

【0018】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，在前述步驟(II)中，使用 L-胺基酸選擇性水解酶，繼而，分離經水解的 L-胺基酸衍生物。

【0019】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在前述步驟(A)中導入的硫醇基是經從 PMB(對甲氧基苄基)、Acm(乙醯胺基甲基)、苄基、Trt(三苯甲基)、二硫基、三級丁基選出的保護基所保護的硫醇基。

【0020】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的經光學分割的 D-非天然型胺基酸衍生物及 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，該製造方法含有以下步驟，

(I)對胺基酸衍生物，實施以下的反應，而製造含有 D-體及 L-體，在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(A)在該胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的反應，
及，

(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基或羧基，變換為會成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，

(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟，
及，

(III)水解在(II)未經水解的 L-胺基酸衍生物，繼而，取得經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0021】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的經光學分割的 D-非天然型胺基酸衍生物及 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，該製造方法包含以下的步驟，

(I)對胺基酸衍生物，實施以下的反應，製造包含 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(A)在該胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的反應，
及，

(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基或羧基，變換為會成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，

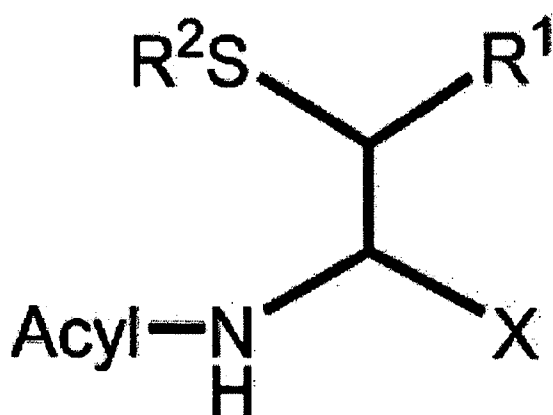
(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟，及，

(III)水解在(II)未經水解的 D-胺基酸衍生物，繼而，取得經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟。

【0022】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之經光學分割的 D-非天然型胺基酸衍生物及 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，

前述步驟(B)是將在該胺基酸衍生物的 α 碳原子結合的胺基，變換為醯基胺基的反應，

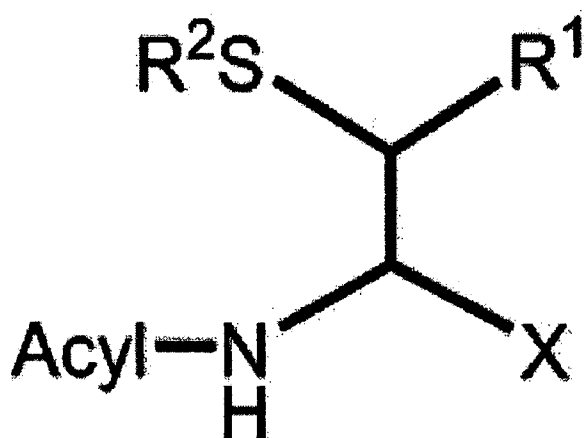
在步驟(II)所述的「(I)所得的胺基酸衍生物」是包含以下的式所代表之關於 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物



[在這裡， R^2 代表氫原子或硫醇基的保護基，X代表經保護或未經保護的羧基，Acyl表示醯基， R^1 表示構成胺基酸的側鏈的取代基中，結合在 β 碳原子的取代基部分(但，氫原子的情況除外)。]，

前述步驟(II)中，D-或 L-胺基酸選擇性水解酶是 D-或 L-胺基醯化酶。

【0023】 又，本發明的另外的實施態樣，提供包含以下式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物



[在這裡， R^2 代表氫原子或硫醇基的保護基，X 代表經保護或未經保護的羧基，Acyl 表示鹽基， R^1 表示構成天然型胺基酸的側鏈的取代基中，在 β 碳原子結合的取代基部分(但，氫原子的情況除外)。]。又，這種胺基酸衍生物亦可為前述式所代表的化合物的鹽。

【0024】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於包含前述式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物中，前述取代基 R^1 是結合在由 Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、及 Tyr 所成的群選出的胺基酸的 β 碳原子的取代基部分(但，不是氫原子)。

【0025】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於包含前述式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物中，前述取代基 R^2 是硫醇基的保護基。

【0026】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於包

含前述式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物中，前述取代基 X 是 COOH。

【0027】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於包含前述式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物中，前述取代基 R^1 是結合在由 Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、及 Tyr 所成之群選出的胺基酸的 β 碳原子的取代基部分(但，不是氫原子)，前述取代基 R^2 是硫醇基的保護基，前述取代基 X 是 COOH。

【0028】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於包含前述式所代表之關於胺基酸衍生物的 α 碳原子的 D-體及 L-體的組成物是前述 D-體及 L-體的等量混合物。

【0029】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基及取代基 R^1 之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物〔在這裡， R^1 是指芳族取代基而言。〕的製造方法，而含有以下的步驟，

(I)對胺基酸衍生物，實施以下的步驟，製造含有 D-體及 L-體，在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(P-1)對於在 β 碳原子有取代基 R^1 的胺基酸衍生物，在該 β 碳原子導入脫離基 L，製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟，

(A)由該胺基酸衍生物的 β 碳原子使前述脫離基 L 脫離，且，在該 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫

醇基的步驟，

及，

(B)將該胺基酸衍生物之 α 碳原子結合的胺基或羧基，變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基步驟，

及，

(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0030】 又，本發明的一實施態樣中，提供在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基及取代基 R^1 之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法〔在這裡， R^1 是指構成胺基酸的側鏈的取代基中，結合在 β 碳原子的取代基部分而言(但，除氫原子的情況)。〕，而含有以下的步驟，

(I)對胺基酸衍生物，實施以下的步驟，製造含有 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(P-2)使甘胺酸與以 R^1CHO 代表的醛化合物反應，製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟，

(A)由該胺基酸衍生物的 β 碳原子使前述脫離基 L 脫離，且，在該 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的步驟，

及，

(B)將該胺基酸衍生物的 α 碳原子結合的胺基或羧基，變換成爲 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的步驟，

及，

(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0031】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法中，原料是使用包含關於 α 碳原子的 D-體及 L-體的胺基酸衍生物，或， α 碳原子不是不對稱碳原子的胺基酸衍生物。

【0032】 又，本發明的一實施態樣中，特徵在於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法中，原料是使用關於 α 碳原子的 D-體及 L-體的等量混合物之胺基酸衍生物，或， α 碳原子不是不對稱碳原子的胺基酸衍生物。

【0033】 以上所述的本發明之一個或多數個的特徵任意組合的發明，此項技術領域中具有通常知識者應可理解，也包括在本發明的範圍。

[發明效果]

【0034】 依照本發明的製造方法，則比使用光學活性胺基酸爲原料的以往方法，可以用較簡易方法而且以高收率製造在側鏈有硫醇基之非天然型胺基酸的 D-體或 L-

體胺基酸。即，依照以往的 D-體或 L-體的胺基酸為原料的製造方法，則為了不產生 α 不對稱碳原子的立體異構化，不能使用加熱條件，及不能使用強鹼性或強酸性條件的反應。與此相比，依照本發明的製造方法，則在含導入硫醇基的所希望的胺基酸的製造步驟中，可以使用這些過分激烈的條件，反應效率優異的，更簡便的製造步驟。

【0035】 又，依照本發明的製造方法，對於包括天然型胺基酸的種種胺基酸，在側鏈經導入硫醇基的非天然型胺基酸，可簡易且以高收率做為 D-體或 L-體胺基酸而製造。

【0036】 使用依照本發明的製造方法所得的胺基酸衍生物，則可將半胱胺酸以外的天然型及非天然型的種種胺基酸做為胜肽結合法中的結合部位而使用。即，在蛋白質合成上不需要為了胜肽結合而變更胺基酸序列，又，就可以在胺基酸序列中的種種胺基酸做為結合部位而設計蛋白質合成之點而言，本發明的製造方法，擴大蛋白質合成上的胜肽結合法的利用可能性，利用價值高。

【0037】 又，依照本發明的製造方法，將目的之胺基酸的 D-體及 L-體衍生物不需區別異構物而同時合成，所以做為本發明的一態樣，可以分離做為目的之胺基酸衍生物的 D-體及 L-體，並且，將 D-體及 L-體的雙方做為光學活性體而可分別同時得到。這種方法做為回應合成 D-體及 L-體的雙方的蛋白質的需求的原料的提供方法而有高的利用價值。

【0038】 依照本發明的製造方法，則可合成對應於幾乎所有的胺基酸殘基的 β -硫基胺基酸。如前述，在利用NCL法的胜肽結合法，可做為結合部位的胺基酸非常有限的限制，但使用本發明的製造方法的 β -硫基胺基酸，則可解消NCL法的胜肽結合部位的限制。如此，在多胜肽(或蛋白質)的化學合成上，可顯著節省貴重的胺基酸的消費量。

【0039】 例如，貴重的胺基酸是糖鏈-胺基酸的情況時，在以往的糖胜肽合成中，將糖鏈-胺基酸利用於胜肽固相合成，所以消費過多量的糖鏈-胺基酸做為原料。但是，如上述，依照本發明的製造方法，由於可合成對應於幾乎所有胺基酸殘基的 β -硫基胺基酸衍生物，所以可以合成包含糖鏈-胺基酸，在N末端有 β -硫基胺基酸，C末端有硫基酯等活性化基的若干殘基程度的短鏈胜肽而使用於NCL法等(液相反應)的胜肽結合反應。即，以貴重的糖鏈-胺基酸為中心向N末端側，C末端側的方向以高效率延長胜肽。如此，比以往的固相合成法，可以顯著節省貴重的糖鏈胺基酸及修飾胺基酸的消費量。例如，貴重的胺基酸是有糖鏈的胺基酸，短鏈胜肽是 β -硫基胺基酸及糖鏈-Asn所構成的2胺基酸單元時的反應的概略圖示於第2圖。

【圖式簡單說明】

【0040】

第1圖顯示本發明的製造方法的一態樣的概略圖。

第2圖顯示依照本發明的製造方法的一態樣製造的關

於 β -硫基胺基酸的應用例的概略圖。

【實施方式】

【0041】 「胺基酸」一般是指有胺基及羧基二者的有機化合物。該羧基結合的碳原子稱為 α 碳原子，由 α 碳原子起有碳原子結合時，由 α 碳原子鄰接的碳原子起依序稱為 β 碳原子、 γ 碳原子。 α 碳原子也稱為 α 位碳原子，或，為了顯示取代基的結合位置也單稱為 α 位。關於 β 碳原子等也是同樣情形。

【0042】 在本發明中，「胺基酸」就是以其最廣義的意義使用，天然的胺基酸，例如，不只是絲胺酸(Ser)，天冬醯胺(Asn)，纈胺酸(Val)，白胺酸(Leu)，異白胺酸(Ile)，丙胺酸(Ala)，酪胺酸(Tyr)，甘胺酸(Gly)，離胺酸(Lys)，精胺酸(Arg)，組胺酸(His)，天冬醯胺酸(Asp)，麩胺酸(Glu)，麩醯胺(Gln)，蘇胺酸(Thr)，半胱胺酸(Cys)，蛋胺酸(Met)，苯丙胺酸(Phe)，色胺酸(Trp)，脯胺酸(Pro)，也包括胺基酸變異體及衍生物等非天然胺基酸。如為此項技術領域中具有通常知識者，考慮此廣義的定義，應可理解做為本發明的胺基酸，例如可舉 L-胺基酸；D-胺基酸；胺基酸變異體及衍生物等經化學修飾的胺基酸；正白胺酸、 β -丙胺酸、鳥胺酸等不會在生體內成為蛋白質的構成材料的胺基酸；及本技術領域中具有通常知識者公知的有胺基酸特性的化學合成的化合物等。

【0043】 在本發明的製造方法中做為目的化合物而製造的胺基酸，只要 α 碳原子是不對稱碳原子則無特別的

限定，但在本發明的一態樣中，在 α 碳原子有胺基結合的 α -胺基酸為理想。在本發明的一態樣中，在製造用於合成胜肽或蛋白質的胺基酸衍生物之觀點上，胺基酸是天然型或非天然型的蛋白質構成胺基酸為理想。本發明的一態樣中，由製造實質上與在生體存在的蛋白質有略相同的胺基酸序列的胺基酸之觀點而言，胺基酸是天然型的胺基酸為理想。

【0044】 在本說明書中，胺基酸衍生物，包括胺基酸的側鏈取代基再經其他的取代基所取代的化合物，及對胺基或羧基等官能基，藉由結合保護基或其他的取代基而衍生物化的化合物。即，本說明書中，胺基酸衍生物是，用以總稱包括如這些的例之經衍生物化的胺基酸，不是要排除沒有衍生物化的胺基酸的意思。

【0045】 胺基酸在胺基酸的 α 碳原子有胺基結合的 α 胺基酸的情況時， α 碳原子結合的其他2個取代基只要是不相同的取代基(例如，氫原子)， α 碳原子是不對稱原子，有稱為D-體，L-體的鏡像異構物存在。本說明書中，D-體的胺基酸稱為「D-胺基酸」，或「D-體胺基酸」等，L-體的胺基酸稱為「L-胺基酸」，或「L-體胺基酸」等。

【0046】 β 碳原子也是不對稱碳原子的胺基酸衍生物的情況時，以 β 碳原子為掌性中心的光學異構物也會存在。本說明書中，就 α 碳原子而說D-體或L-體的情況時，有關 β 碳原子的光學異構物的存在比可以是任意的。即，有關 β 碳原子的光學異構物，可為經光學分割的狀態，但

有關 β 碳原子的光學異構物亦可為以任意的比率含有的化合物。即，本說明書中指稱光學活性胺基酸衍生物的場合時，至少有關 α 碳原子的光學異構物是經光學分割的光學活性體即可。

【0047】 又，本說明書中，有關 α 碳原子的 D-體及 L-體的等量混合物的情況時，亦稱為胺基酸衍生物是消旋體，或，消旋體胺基酸衍生物。消旋體就是，如通常廣泛所解釋，D-體及 L-體的實質上是等量混合物即可，又，亦可為被稱為消旋混合物，消旋化合物，消旋固溶體的形狀而存在的化合物。

【0048】 本發明的一態樣中，本發明是關於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-胺基酸衍生物的製造方法。在這裡，在 β 位的取代基 R，與 β 碳原子結合取代基 R 是相同的意思。

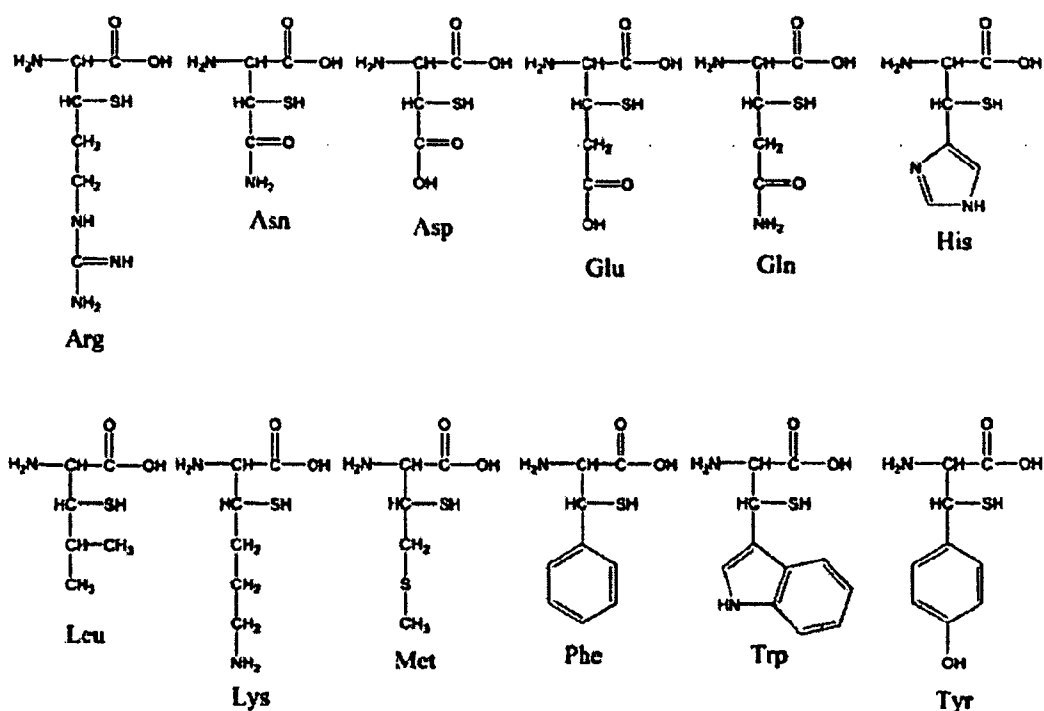
【0049】 本說明書中，「經保護或未經保護的」取代基 R 意指藉由保護基受到保護的取代基 R，或，沒有受到保護的取代基 R。例如，「經保護或未經保護的硫醇基」意指藉由保護基受到保護的硫醇基，或沒有受到保護的硫醇基。硫醇基的保護基而言，可做為硫醇基的保護基使用的化合物沒有任何限定。硫醇基的保護基而言，例如，可舉 PMB(對甲氧基苄基)、Acm(乙醯胺基甲基)、苄基、Trt(三苯甲基)、二硫基、三級丁基等。

【0050】 本說明書中，指稱「在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物」時，意

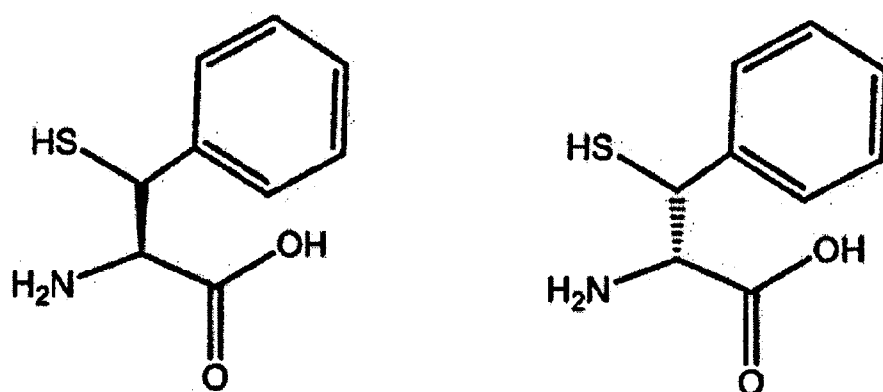
指在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸的狀態下之非天然型胺基酸。即，公知的天然型胺基酸的半胱胺酸是在 β 位有未經保護的硫醇基的胺基酸，為在 β 位有硫醇基的狀態下的天然型胺基酸。「在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物」意指不含這種天然型的半胱胺酸。即，「在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物」不是排除「在天然型胺基酸的 β 位經導入經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸」或其衍生物的意思。又，本說明書中，在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物，也稱為「 β -硫基胺基酸衍生物」。

【0051】 本發明的一態樣中，由可以得到用以合成由天然型胺基酸構成的蛋白質而可用於 NCL 結合部位的胺基酸之觀點而言，在本發明中的目的化合物的 β -硫基胺基酸衍生物，較佳為代替在天然型胺基酸的 β 碳原子結合的 1 個氫原子，有經保護或未經保護的硫醇基結合的胺基酸或其衍生物。

【0052】 這種 β -硫基胺基酸衍生物的一例，相應於各分別天然型胺基酸，可由以下的化學式所述的化合物表示。



【0053】 在該化學式中，沒有區別 D-體及 L-體的立體異構物而記述，但如以 D-體及 L-體的立體異構物記述時，該化學式所述的化合物，例如，以天然型胺基酸是苯丙胺酸的情況為例，則可由如以下的 2 個化學式來表示。以下的 2 個化學式中，左側為 L-體，右側為 D-體。在上述化學式所述的其他化合物也是同樣，可做為 D-體，L-體而記述。



【0054】 又，上述的，相應於各分別的天然型胺基酸， β -硫基胺基酸衍生物的一例的上述化學式中，最單純

化，而記述胺基，羧基，及，其他的側鏈取代基沒有保護也沒有取代的例，但「在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之非天然型胺基酸衍生物」而言，也包括該等的胺基，羧基，及，其他的側鏈取代基是藉由保護基或其他的取代基取代的化合物。

【0055】 本發明的一態樣中，做為本發明中的目的化合物的 β -硫基胺基酸衍生物也可指稱為在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基，並且，在 β 位也有取代基 R^1 的胺基酸衍生物。在這裡， R^1 是構成胺基酸的側鏈的取代基中， β 碳原子結合的取代基部分，而不是氫原子者。以上述的苯丙胺酸的例而言，苯丙胺酸是在 β 位結合氫原子2個及苯基的胺基酸，所以 R^1 是苯基。同樣，對天然型的胺基酸，各分別可理解取代基 R^1 。例如，天然型的胺基酸是Asn，Gln時，取代基 R^1 各分別為 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ ， $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 。天然型的胺基酸是Trp，Tyr，His時，取代基 R^1 各分別為，吲哚-3-基，-對羥苯基，1H-咪唑-4-基。天然型的胺基酸是Asp，Glu時，取代基 R^1 各分別為， $-\text{COOH}$ ， $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 。天然型的胺基酸是Arg，Lys時，取代基 R^1 各分別為， $-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$ ， $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 。天然型的胺基酸是Met，Leu時，取代基 R^1 各分別為， $-\text{CH}_2-\text{SCH}_3$ ， $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。在該等的取代基 R^1 所含的羧基或胺基等，可為遊離的酸或鹼，也可為鹽。又，本技術領域中具通常知識者，在不是天然型的胺基酸時，同樣地，由該胺基酸的構造式，可理解結合 β 碳原子的取代基部分，不是氫原子，取代基部分為個

別的取代基 R^1 。又，取代基 R^1 是含有官能基等反應性高的基時，較佳為將該等基先藉由保護基保護，或以其他的取代基取代，或，變換為其他的取代基。

【0056】 本說明書中，在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物有時稱為 β -硫基胺基酸衍生物。又，天然型胺基酸之有側鏈取代基的胺基酸，代替其在 β 碳原子結合的氫原子而導入經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物，有時將其稱為天然型胺基酸之 β -硫基胺基酸衍生物。例如，以苯丙胺酸為例，以上述構造式代表的胺基酸衍生物，可稱為苯丙胺酸的 β -硫基胺基酸衍生物。又，作為 D-體及 L-體的等量混合物的胺基酸衍生物，有時稱為 D,L- β -硫基胺基酸衍生物。

【0057】 做為本發明的一態樣，本發明的製造方法是關於在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基之 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法。該製造方法中，在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物做為含有 D-體及 L-體的中間體組成物而製造後，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶反應，分離 D-或 L-胺基酸衍生物。因上述中間體組成物，做為 D-或 L-體選擇性水解酶的基質的部位之胺基酸衍生物而製造，所以也可說是有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位之包含 β -硫基胺基酸衍生物的 D-體及 L-體的組成物。

【0058】 有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的 β -硫基胺基酸衍生物，亦可對有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的胺基酸衍生物，藉由在 β 位導入硫醇

基製造。或者，亦可對 β -硫基胺基酸衍生物，以具有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的方式藉由變換取代基而製造。又， β -硫基胺基酸衍生物，也可對胺基酸衍生物，藉由在 β 位導入硫醇基而製造，或者，也可藉由將胺基酸衍生物與含有硫醇基的化合物縮合的方法等而製造。以成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的方式而變換取代基的方法而言，可以胺基酸的 α 碳原子結合的胺基或羧基變換成為 D-或 L-體選擇性水解酶的基質的方式進行。該反應中，進行變換反應前的胺基或羧基，可為沒有受保護的胺基或羧基，也可為藉由其他的保護基而受保護的胺基或羧基。

【0059】 做為上述的中間體之有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的 β -硫基胺基酸衍生物，可由對 α 碳原子的立體異構性不加控制的製造方法而製造。由對 α 碳原子的立體異構性不加控制，上述之有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的 β -硫基胺基酸衍生物，可以成為含有 D-體及 L-體的組成物而得到。

【0060】 對於包含 D-體及 L-體之上述有 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質部位的 β -硫基胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶反應，則 D-或 L-胺基酸衍生物被選擇性水解。由水解產生的胺基或羧基，直接以未保護的狀態或以經保護基保護的狀態，利用其疏水性等的差異，可分離經水解之 D-或 L-胺基酸衍生物以及未經水解之其他的胺基酸衍生物。

【0061】 本發明，做為其一態樣，可表示為含有以下的步驟(I)及(II)的製造方法。

(I)製造包含 D-體或 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟，及，

(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的任一種酶反應，繼而，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0062】 本說明書中，「包含 D-體及 L-體」的情況，意指作為 α 碳原子的光學異構物包含 D-體及 L-體，沒有特定時，並不特定其量的比率。本發明的理想的一態樣中，意指實質上包含有 D-體及 L-體二者之意。又，本發明的一態樣中，可為 D-體及 L-體的等量混合物。

【0063】 本發明的一態樣中，可表現為步驟(I)是對於胺基酸衍生物，實施以下的反應(A)及(B)，製造包含 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟：

(A)在胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的反應，及，

(B)將在胺基酸衍生物的 α 碳原子結合的胺基或羧基，變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應。

【0064】 在這裡，上述反應(A)及(B)的順序，可以(A)、(B)的順序實施，或者，也可以(B)、(A)的順序實施。或者，在(A)及(B)以外，對胺基酸衍生物的官能基或取代

基亦可適宜進行保護，脫保護等其他的反應。又，本說明書中，記述為反應(A)，(B)等，該等也可以稱呼為步驟(A)，(B)等。

【0065】 步驟(I)的「對胺基酸衍生物，實施以下的反應，製造包含 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟」，在實施步驟(I)所含的反應之後，實現包含 D-體及 L-體的狀態即可，成為原料的胺基酸，可為實質上由 D-體或 L-體的一方所構成的胺基酸或其衍生物，或者，亦可為如甘胺酸方式之 α 碳原子不是不對稱碳原子的胺基酸或其衍生物。又，本發明的一態樣中，要將在步驟(I)所得的胺基酸衍生物有效率的再結晶化之觀點而言，含有等量的 D-體及 L-體為理想。含有等量的 D-體及 L-體，意指實質上的等量即可。換言之，在本發明的一態樣中，在步驟(I)所得的胺基酸衍生物的中間體組成物是消旋體為理想。

【0066】 在胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的反應，只要在胺基酸衍生物的 β 碳原子，導入經保護或未經保護的硫醇基的反應即可，沒有特別的限制。也可在胺基酸衍生物的 β 碳原子導入脫離基之後，與脫離基做交換反應而導入。

【0067】 例如，該反應可對於胺基酸衍生物，使硫醇化合物反應而可實施。由導入經保護的硫醇基的觀點而言，使用在硫原子結合有保護基及氫原子的硫醇化合物為理想。做為硫醇化合物而言，在苯環上的任意的位置上，

有任意數的氟、氯、溴、碘等鹵原子，甲基、乙基等碳數 1 至 4 的低級烷基，甲氧基、乙氧基等碳數 1 至 4 的烷氧基，可以有硝基等取代基的苄硫醇類或三苯甲硫醇類，甲烷硫醇、乙烷硫醇、三級丁烷硫醇等烷硫醇類，乙醯胺基甲基、三苯甲基、可容易變換為二硫基的醯硫醇類等。本發明的一態樣，苄基硫醇類為理想，又，對甲氧基苄基硫醇更理想。

【0068】 硫醇化合物的使用量而言，對成為原料的胺基酸衍生物 1 當量為 1 至 100 當量，理想是 2 至 20 當量，更理想是 3 至 10 當量即可。所使用的溶媒而言，例如可舉 THF、DCM、DMSO、DMF 等，但該等中也以 DMF 為理想。反應條件而言，例如，可在 1 至 100℃，理想是 10 至 80℃，更理想是 15 至 35℃，實施反應 30 分鐘至 24 小時，理想是 1 至 12 小時，更理想是 2 至 6 小時。

【0069】 該反應的原料化合物是，可在 β 位導入硫醇基的胺基酸或胺基酸衍生物即可。亦即，原料化合物可為胺基酸，也可為胺基酸的胺基、羧基、側鏈取代基等受保護或被取代基所取代的胺基酸衍生物。本發明的一態樣中，由有效率實施反應之觀點而言，理想是在 β 位有脫離基的胺基酸衍生物，更理想是在 β 位有鹵原子的胺基酸衍生物。又，本發明的一態樣中，防止副反應而提高收率之觀點而言，胺基酸的胺基及羧基經保護的胺基酸衍生物為理想。

【0070】 將在胺基酸衍生物的 α 碳原子結合的胺基

或羧基，變換成爲 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，只要在反應後，可得在 α 碳原子經結合成爲 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的胺基酸衍生物的反應則沒有特別的限制。反應的起始原料的「經結合在胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基或羧基」，可爲經保護或未經保護的胺基或羧基都可以。亦即，可爲沒有受保護的遊離的胺基或羧基，或者，可爲經保護基保護的胺基或羧基。在本發明的一態樣中，在胺基酸衍生物的 β 位經導入硫醇基之後，實施本反應時，在 β 位經導入硫醇基的胺基酸衍生物做爲原料，或者，爲了硫醇化的目的而將胺基及羧基經保護時，可將該等經保護的胺基酸衍生物做爲原料而實施。

【0071】 胺基的保護基而言，可使用一般可用於胺基的保護基的基團，例如，可用後述的脂溶性保護基等。本發明的一態樣，例如，可舉 9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)或三級丁氧基羰基(Boc)、烯丙基氧基碳酸酯基(Alloc)等含有碳酸酯基的基、乙醯基(Ac)等醯基、芳基、苄基等保護基等。要導入保護基時，例如，要導入 Boc 基時，可在反應系添加 Boc_2O 的 THF 溶液的方法等而實施。胺基的保護基的導入，根據保護基，在上述的方法之外，可用公知的方法而實施。又，胺基的保護基的脫保護，可用酸或鹼處理而實施。例如，保護基是 Boc 基時，可使用三氟乙酸(TFA)等酸。這時，在溶媒的存在下實施爲理想，例如可舉 DCM 及 THF，乙腈等。胺基的保護基的脫保護，上述的方法之

外，可使用通常的方法實施。

【0072】 羧基的保護基而言，可使用一般可用於羧基的保護基的基團，例如，可使用後述的脂溶性保護基等。本發明的一態樣中，例如，可舉藉由甲基、乙基、三級丁基等烷基，苄基等芳烷基的酯而保護。羧基的保護基是甲基時，可以添加亞磺醯氯及甲醇的方法等而甲酯化。羧基的保護基的導入，根據保護基，上述的方法之外，可使用公知的方法而實施。又，羧基的保護基的脫保護，以酸或鹼處理而實施。例如，保護基是甲基時，可使用氫氧化鈉等鹼。這時，在溶媒的存在下實施為理想，例如可舉 THF、二噁烷、乙腈等。羧基的保護基的脫保護，上述的方法之外，可使用通常的方法而實施。

【0073】 「D-或 L-胺基酸選擇性水解酶」而言，只要進行 D-體胺基酸選擇性水解的酶，或，進行 L-體胺基酸選擇性水解的酶則沒有特別的限制。例如，水解酶可舉醯胺酶、蛋白酶、酯解酶、脂解酶等。該等酶的來源沒有特別的限制，可為源自細菌等微生物，亦可為源自哺乳動物。該等 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶，使用市販的分解酶之外，也可依照公知的方法調製。市販的分解酶而言，例如，可舉醯酶「Amano」(L-醯體選擇性胺基醯酶)(Amano Enzyme(天野酵素)公司製)、D-胺基醯酶「Amano」(D-醯體選擇性胺基醯酶)(Amano Enzyme(天野酵素)公司製)等。

【0074】 本發明的一態樣中，由使酶反應後的分離容易，並且，以高收率可得 D-體或 L-體的觀點而言，做為

「D-或 L-胺基酸選擇性水解酶」，使用 D-胺基醯酶或 L-胺基醯酶為理想。本發明的製造方法中，以水解酶經水解的 D-體及 L-體的分離方法，只要可以分離則沒有特別的限制，但在本發明的一態樣中，對於經水解的胺基或羧基導入脂溶性保護基，可將經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物與未經水解的其他胺基酸衍生物以高效率分離。在這樣的分離中，醯基胺基，與由 1 個或 2 個脂溶性胺基保護基所保護的胺基，以疏水性的差異的程度成為比較大，可高收率分離之點，做為水解酶而選用胺基醯酶為理想。又，有關使用這種保護基的分離步驟則將在後面說明。

【0075】 「D-或 L-胺基酸選擇性」，只要對 D-體或 L-體有選擇性就可以，並不限定於 100%或可比照 100%選擇性。本發明中，由製造 D-體或 L-體的純度高的光學活性胺基酸之觀點而言，對 D-體或 L-體的選擇性高者為理想，實質上，只與 D-體或 L-體的任一方反應者更理想。

【0076】 「變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應」而言，根據上述酶的選擇，以成為所選擇酶的基質的方式，可將與 α 碳原子結合的經保護或未經保護的胺基或羧基變換。亦即，根據做為目的之取代基的種類及構造，使用通常的方法，可將經保護或未經保護的胺基或羧基變換。例如，做為酶而使用胺基醯酶時，藉由將經保護或未經保護的胺基醯化，可變換成為酶的基質的胺基醯基。

【0077】 例如，將胺基加以醯化的方法而言，可藉

由將有經保護或未經保護的胺基的胺基酸衍生物，與羧酸鹵化物或羧酸酐反應的方法等而可實施。又，例如，將胺基乙醯化時，在含有經保護或未經保護的胺基的胺基酸衍生物的反應系中，藉由添加乙酸酐(Ac_2O)而反應的方法等而實施。溶媒而言，只要為胺基醯基化會進行的溶媒則沒有特別的限制，例如，可使用水或甲醇、乙醇，THF、DCM等，或該等的混合溶媒等。反應溫度只要為胺基醯基化能進行的溫度則沒有特別的限制，例如，可設定為 0 至 40℃等，可在通常的室溫中實施。反應時間，只要為進行胺基醯基化足夠的時間即可，例如可設定為 1 分鐘至 10 小時，理想是 5 分鐘至 1 小時等。

【0078】 做為酶而使用胺基醯酶時之外，使用醯胺酶，蛋白酶，酯解酶，脂解酶等時，也可依照公知的方法而實施。使用醯胺酶時，可藉由將經保護或未經保護的胺基醯胺化的反應，將經保護或未經保護的羧基醯胺化的反應而實施。又，使用酯解酶時，可藉由將經保護或未經保護的羧基酯化的反應而可實施。如是本行業者，應可參照本說明書的記述，在使用其他的水解酶時也可比照該等而同樣實施。

【0079】 胺基或羧基藉由保護基保護時，藉由保護基經保護的胺基或羧基也有可能直接成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質。這種情況時，也可將胺基或羧基藉由保護基保護的步驟，稱為變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應。本發明的一態樣中，由減

少在本發明的製造方法的步驟數之觀點而言，較佳為先進行變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，在胺基及羧基經保護之後，在 β 位導入硫醇基。

【0080】 本發明的一態樣中，成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基，而使用若干程度反應性高的取代基時，變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，在使用酶的水解反應之前先實施為理想。又，這種情況時，在 β 位導入硫醇基的反應時，胺基及羧基由另外的保護基保護為理想。

【0081】 這時，上述步驟(I)也可以表現如下。亦即，也可表現為步驟(I)是準備成為原料的胺基酸所含的胺基及羧基藉由保護基經保護的胺基酸衍生物，對該胺基酸衍生物，實施以下的反應，而製造含有 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟

(A)在該胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基反應，及，

(B)將在該胺基酸衍生物的 α 碳原子結合的經保護胺基或經保護羧基，變換成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應。

又，成為原料的胺基酸中，有其他的官能基存在時，也可為準備將成為原料的胺基酸所含的胺基，羧基，及其他的官能基藉由保護基經保護的胺基酸衍生物的步驟。

【0082】 本發明的一態樣中，D-或 L-胺基酸選擇性水解酶，可根據立體選擇性的高低，入手容易性，變換成

為胺基酸衍生物的胺基或羧基的基質的容易性等種種考量要素而選擇。將胺基酸衍生物的胺基或羧基保護的步驟，及變換為酶的基質的步驟為分開的，即使是在成為酶的基質的取代基的反應性高的情況下，也由於可以選擇這種取代基做為基質的水解酶之點而為理想。

【0083】 本發明的一態樣中，由上述反應，在 β 位導入硫醇基，並且，胺基或羧基經變換成為水解酶的基質的胺基酸衍生物，可藉由再結晶等方法分離精製後再用於其次的步驟。精製的方法而言，可藉由再結晶，矽凝膠管柱，使用有機溶媒的萃取等通常方法而實施。

【0084】 本發明者等發現，在本發明的製造方法的一態樣中，在 β 位導入硫醇基，並且，胺基或羧基被變換成為水解酶的基質的胺基酸衍生物，在 D-體及 L-體的等量混合物的情況下，特別可將該中間體組成物有效率再結晶化。D-體及 L-體的等量混合物的情況就是 α 碳原子的消旋體的情況，或，也可以簡單地說是消旋體的情況。

【0085】 將這種中間體組成物再結晶時，在其之前，可使用以有機溶媒的萃取等而得粗精製物。以有機溶媒的萃取，可用通常的方法實施。進行再結晶的情況時，溶媒可使用乙酸乙酯，甲醇，乙醇，醚等有機溶媒或其混合溶媒等，較佳可使用甲醇，醚等。

【0086】 本發明的製造方法中，步驟(II)對於上述的步驟(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的任一方反應，繼而，實施分離經水解的 D-或 L-胺基酸

衍生物的步驟。

【0087】 對於由上述步驟(I)所得的含有 D-體及 L-體的胺基酸衍生物，藉由使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的任一方反應，根據該酶的立體選擇性，含有 D-體及 L-體的胺基酸衍生物中其中之任一方由上述水解酶被選擇性的水解。例如，使 D-胺基酸選擇性水解酶反應，則 D-體的胺基酸衍生物選擇性的經水解。又，使 L-胺基酸選擇性水解酶反應，則 L-胺基酸選擇性的經水解。

【0088】 有關 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶如前述。水解反應，可與一般性的酶反應同樣實施。D-或 L-胺基酸選擇性水解酶，可藉由溶解於在酶反應通常使用的種種的緩衝液，而調製酶溶液。緩衝液而言，只要能進行酶反應的緩衝液則無特別的限定，可使用磷酸鹽緩衝液，Tris 鹽酸鹽等。pH 可在 6.0 至 10.0 中進行，理想是 7.0 至 9.0，更理想可為 8.0。又，用於水解反應的酶的量，只要是水解反應能有效率地進行的量則無特別的限定，例如，可使用對基質為觸媒量或過多量。由有效率地進行水解反應之觀點而言，例如對基質 100mg 可設定為 0.1 至 10000 單位，理想是 1 至 1000 單位。又，反應溫度是在 10℃ 至 60℃ 中進行，理想是 20℃ 至 55℃，更理想是可設定為 30℃ 至 50℃。反應時間是 1 小時至 30 日，理想是 12 小時至 20 日，更理想是可設定在 2 至 14 日。

【0089】 在本發明的製造方法中，步驟(II)包含上述藉由酶的水解反應之後，將分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍

生物的步驟。在步驟(II)中，如實施水解反應，「繼而」，實施分離的步驟的情況時，在水解反應之後，進行分離步驟即可，該水解反應與分離反應並不限定於直接進行或連續性的進行。例如，由水解所產生的遊離的胺基或羧基可以不受保護的狀態，直接進行分離步驟，或者，可在實施將遊離的胺基或羧基以保護基保護的步驟等之後，實施分離步驟。本發明的一態樣中，爲了要將之後的分離步驟以高收率實施起見，以適當的保護基保護爲理想。

【0090】 在步驟(II)中，將分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟，能將經水解的一方的鏡像異構物與未經水解的他方的鏡像異構物互相分離的方法的話，沒有任何限定。例如，可使用由反應系只取出一方的方法，由反應系除去一方的方法，在有機相及水相各分別溶存一方的方法，由反應系取出雙方使用層析法等的分離精製手段將一方乃至雙方各分別取出的方法等。

【0091】 例如，在 β 位有硫醇基的 D-非天然型胺基酸衍生物的製造方法而言，可實施對於在 β 位有硫醇基之包含 D-體及 L-體的中間體組成物，使 D-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 D-胺基酸衍生物。

【0092】 相反地，在 β 位有硫醇基的 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法而言，可實施對於在 β 位有硫醇基之包含 D-體及 L-體的中間體組成物，使 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 L-胺基酸衍生物。

【0093】 在這裡，例如，分離經水解的 D-體時，不

限定於將 D-體由反應系取出的方法，也可為將未經水解的未反應物由反應系除去而將 D-體加以分離的方法等。該等的方法可依照例如，萃取，結晶化，矽凝膠管柱層析法，高速液體層析法(HPLC)等公知的方法實施。

【0094】 在本發明的理想的一態樣中，由將一方的鏡像異構物分離之後，他方的鏡像異構物也可利用的觀點而言，將一方先分取後也分取他方的方法，或，使用矽凝膠管柱層析法等將雙方各分別精製分取的方法為理想。又，也可在萃取，結晶化等而得粗精製物後，再將 D-體及 L-體分取。

【0095】 在本發明的一態樣中，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟，包含對經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物導入脂溶性保護基的步驟，利用根據脂溶性保護基的有無及/或個數而產生的疏水性的差異，可以分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

【0096】 在這裡所用的脂溶性保護基而言，可用於胺基或羧基的保護基而有脂溶性，則沒有特別限定。例如，胺基的脂溶性保護基而言，可舉由胺基甲酸酯系、醯系、亞醯胺系、烷系、磺醯胺系選出的脂溶性保護基。胺基甲酸酯系保護基言，可舉 Boc 基、Fmoc 基、2,2,2-三氯乙氧基羰基(Troc)、苄氧基羰基(Cbz)、Alloc 基等。醯系保護基而言，可舉乙醯基(Ac)等，亞醯胺系保護基而言，酞醯(Pht)等，烷系保護基而言，可舉三苯甲基(Trt)、苄基、芳基等，磺醯胺系保護基言，對甲苯磺醯基(Ts 或 Tos)、2-硝基磺醯

基(Ns)等。又，羧基的脂溶性保護基而言，可舉由酯系、醯胺系等選出的脂溶性保護基。例如，酯系保護基而言，可舉甲酯、乙酯、三級丁酯等烷酯、苄酯等芳基烷酯等。

【0097】 本發明的一態樣中，利用由脂溶性保護基所產生的疏水性的差異，分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物之觀點而言，較佳為以與經變換為酶基質部位的胺基或羧基的疏水性變大的方式，選擇作為酶基質部位的取代基及脂溶性保護基。做為本發明的一態樣，使用胺基醯酶做為水解酶時，水解後的胺基藉由胺基甲酸酯系的脂溶性保護基保護為理想，特別是 Boc 基、Fmoc 基、Cbz 基、Alloc 基等為理想。

【0098】 本發明的一態樣中，使用脂溶性保護基時，利用由脂溶性的保護基的有無及/或個數所產生的疏水性的差異，可分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物。例如，做為脂溶性保護基而使用 Boc 基時，對 1 個胺基導入 1 個保護基，則胺基成為-NHBoc 基。又，對 1 個胺基導入 2 個保護基，則胺基成為-N(Boc)₂ 基，也可稱為-N,N-diBoc 基。在本發明的製造方法中分離的步驟而言，可在該等的任一狀態下分離。又，藉由水解所產生的基是羧基時也是同樣，將遊離的羧基直接分離的方法之外，也可將對構成羧基的 1 個氧原子，導入 1 個保護基而分離。又，利用疏水性的差異，也可說是利用親水性的差異。又，本發明的一態樣中，藉由導入脂溶性保護基，利用對萃取溶媒等溶媒的溶解度的差異，或者，使用管柱層析法等時，

也可以稱之為利用對管柱等固相的親和性的差異。再者，根據分離方法，也可利用保護基的容積大小而分離。又，也可利用主要根據保護基的有無所產生的化合物的電荷的差而分離。

【0099】 本發明的一態樣中，利用脂溶性保護基的有無及/或個數所產生的疏水性的差異，分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物的方法而言，例如，可使用藉由萃取的方法，藉由矽凝膠管柱層析法的方法等。本發明的一態樣中，由有效率地分離精製本發明的胺基酸的觀點而言，使用矽凝膠管柱層析法為理想。藉由矽凝膠管柱層析法分離精製時，做為管柱而言，可使用將市販的矽凝膠裝填於玻璃管而調製的管柱。用於管柱的矽凝膠，只要能根據脂溶性保護基的有無等而分離本發明的胺基酸衍生物則沒有特別的限制，例如，可使用矽凝膠 60(40 至 63 μ m)(默克(Merck)公司製)等。用於管柱的玻璃管，只要裝填矽凝膠能分離胺基酸衍生物則沒有特別的限制，例如，也可使用層析管(無濾嘴・付旋塞)(AS ONE 公司製)等。做為展開溶媒而言，在矽凝膠管柱層析法中通常使用的溶媒即可，例如，可使用己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷(DCM)、甲醇、乙腈等，或該等的混合溶媒等。本發明的一態樣中，使用乙酸乙酯：己烷 = 1：1 至 10 的展開溶媒，含有 1% 甲酸的乙酸乙酯等為理想。此項技術領域中具有通常知識者，依照本發明的記述，根據做為目的之胺基酸衍生物的構造等，可選擇使用的展開溶媒。

【0100】 本發明的一態樣中，亦可取得在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物的 D-體及 L-體雙方做為光學活性胺基酸衍生物。特別地，要得到在消旋蛋白質的合成等所用的 D-體及 L-體的胺基酸衍生物的觀點而言，以取得 D-體及 L-體的雙方做為光學活性胺基酸衍生物為理想。這時，各分別得到實質上同量的 D-體及 L-體的觀點而言，做為原料化合物而使用消旋體胺基酸或甘胺酸為理想。

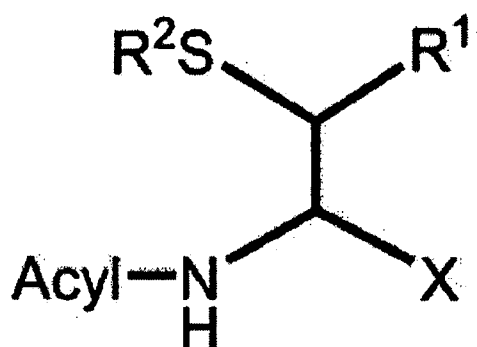
【0101】 這時，例如，對包含 D-體及 L-體的中間體組成物，例如，可藉由使 D-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，實施將分離經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟同時，或者，在其前後，實施取得未經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟而可得。

【0102】 相反地，對包含 D-體及 L-體的中間體組成物，例如，可藉由使 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，實施分離經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟同時，或者，在其前後，實施取得未經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟而可得。

【0103】 在這裡，實施分離經水解的一方的胺基酸衍生物的步驟的同時要取得他方胺基酸衍生物的情況而言，可在矽凝膠管柱層析法中，實施取得各分開的部分。又，分離經水解的一方胺基酸衍生物的步驟的前後要取得他方胺基酸衍生物時，可在萃取，再結晶等的方法中，分離一方的胺基酸衍生物之後，實施分離另一方的胺基酸衍生物。

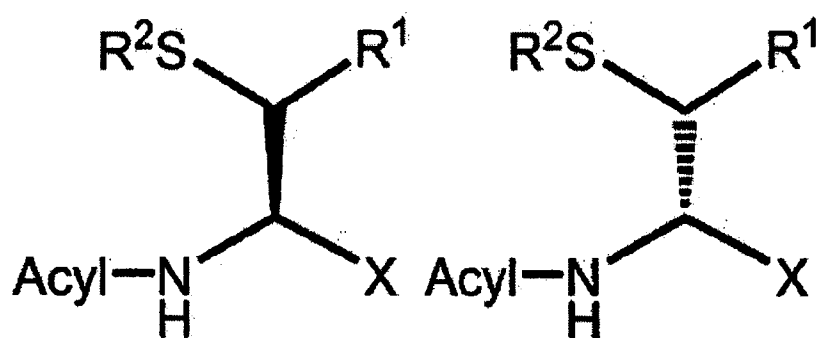
【0104】 本發明的一態樣中，取得在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物的 D-體及 L-體雙方要做為光學活性胺基酸衍生物的情況時，對於藉由 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶而未經水解的一方的胺基酸衍生物，亦可根據目的而水解。該水解是，亦可藉由對於包含有 D-體或 L-體的胺基酸衍生物組成物使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶反應而實施。又，經分離 D-體及 L-體的胺基酸衍生物之後，亦可藉由沒有立體選擇性的水解酶實施，又，亦可不使用酶等，做為通常的化學反應而實施水解反應。

【0105】 本發明的一態樣中，做為 D-體或 L-體選擇的酶，而使用胺基醯酶的情況時，藉由步驟(I)所得的中間體，可以下述構造式表示。



【0106】 又，上述的化學式是沒有區別 α 不對稱碳原子及 β 不對稱碳原子的立體異構物的存在而記述者。本發明的一態樣中，以不區別該等的不對稱碳原子的立體異構物而可製造中間體的意思，而可將中間體如此表示。實際上，由於存在 α 碳原子的光學異構及 β 碳原子的光學異構，亦可為由該等的組合而產生的 4 種的非鏡像異構物以任意的比例含有者。

【0107】 本發明的一態樣中，作為包含 D-體及 L-體之有胺基醯酶的基質部位的 β -硫基胺基酸衍生物中間體組成物而言，可表示為以下的 2 化學式代表的包含 D-體及 L-體的組成物。以下的化學式中，左側為 L-體，右側為 D-體。



【0108】 在這裡， R^2-S 表示在 β 碳原子經導入的硫醇基。硫醇基可為未經保護的硫醇基，亦可為藉由保護基經保護的硫醇基。硫醇基的保護基是如前述。硫醇基的保護基的有無，以及，應該用的保護基，在本發明的製造法中，根據做為目的之化合物，可適宜決定。例如，由防止本發明的製造方法間硫醇基進行反應的觀點而言，硫醇基受保護為理想。又，做為目的化合物，要得到具有經保護的硫醇基的 D-或 L-選擇性胺基酸衍生物的情況時，硫醇基受保護為理想。

【0109】 在這裡，X 表示經保護或未經保護的羧基。羧基可為沒有受保護的羧基，亦可為遊離的酸構成鹽。羧基的保護基是如上述。羧基的保護及脫保護，以有機化學的通常的方法，根據目的而可適宜實施。例如，本發明的一態樣中，在實施本發明的製造方法間防止羧基的反應的

觀點而言，羧基是受保護為理想。另一方面，本發明的一態樣中，由要求做為胺基醯酶的基質而需要迅速的反應的觀點而言，由於考慮藉由羧基結合保護基而降低酶反應速度，在藉由酶的水解反應之前，亦期望經保護的羧基進行脫保護。

【0110】 Acyl 表示醯基。醯基也可以表示為 $R-CO-$ 。R 是氫原子，直鏈或分枝的烷基等，亦可藉由 1 或多數個的取代基取代。做為 R 的烷基，例如，可為碳數 1 至 3，理想是可為碳數 1 至 2 的烷基。又，R 的取代基而言，不阻礙在本發明的製造方法的反應的話，可成為烷基的取代基的甚麼樣的取代基都可以，例如，亦可為氯原子及氟原子等鹵原子，羥基，經取代或未經取代的苯基等。 $R-CO-$ 代表的醯基而言，例如，可舉乙醯基、羥乙醯基、氯乙醯基、三氟乙醯基、甲醯基、丙醯基、苄醯基等。例如，本發明的一態樣中，由胺基醯酶的基質而有需要迅速的反應的觀點而言，乙醯基、苄醯基等為理想。

【0111】 R^1 是構成胺基酸的側鏈的取代基中，表示在 β 碳原子結合的取代基部分(但，除氫原子的情況)。 R^1 可以有官能基，官能基亦可受保護。官能基的保護及脫保護，也在本發明的製造方法中，可適宜實施。例如，胺基及羧基的保護及脫保護的同時， R^1 所含的官能基也可保護・脫保護，或，在其他的取代基的保護及脫保護之外，獨立地， R^1 所含的官能基也可設有保護・脫保護的步驟。 R^1 而言，例如是直鏈或分枝狀的烷基、芳族取代基等，該

等亦可取代。取代基而言，可為已知在胺基酸的側鏈存在的取代基等，亦可為羥基、 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 基、羧基、胺基、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)_2$ 基、硫醇基、烷硫基等，該等的取代基可為遊離的酸或鹼，或該等的鹽。又，烷基，例如，可為碳數 1 至 6，理想是可為碳數 1 至 5 的烷基，芳族取代基，苯基等芳基之外，可為吡啶基、咪唑基等雜芳基。

【0112】 本發明的一態樣中，由提供用於合成天然型蛋白質之可用於 NCL 結合部位的 β -硫基胺基酸衍生物之觀點而言，上述式中，前述取代基 R^1 是由 Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、及 Tyr 所成組群選出的胺基酸的 β 碳原子結合取代基部分(但，不是氫原子)為理想。又，由同樣的觀點而言，前述取代基 R^2 是硫醇基的保護基為理想，例如，可列舉 PMB(對甲氧基苄基)、Acm(乙醯胺基甲基)、苄基、Trt(三苯甲基)、二硫基、三級丁基等。又，做為藉由水解酶的反應的基質的觀點而言，在上述式中，Acyl 是乙醯基，X 是羧基為理想，羧基可為遊離的酸也可為鹽。

【0113】 本發明的一態樣中，本發明的 β -硫基胺基酸衍生物，可藉由製造經由在 β 位有脫離基的胺基酸衍生物的方法有效率地製造。

【0114】 本發明者等，又，做為本發明的一態樣，為了能製造在 β 碳原子有取代基 R^1 的 β -硫基胺基酸衍生物，精心檢討的結果，發現做為一態樣，而對在 β 位有做為取代基 R^1 的芳族取代基的胺基酸的 β -硫基胺基酸衍生

物，利用光反應而在 β 位導入鹵原子的方法，可有效率地製造在 β 位有脫離基 L 的胺基酸衍生物。

【0115】 在 β 位有做爲取代基 R^1 的芳族取代基的胺基酸而言，以天然型而言，可列舉苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸、組胺酸。又，如是做爲在 β 位有做爲取代基 R^1 的芳族取代基的胺基酸，亦可爲非天然型。芳族取代基而言，可爲芳基亦可爲雜芳基，例如，可爲苯基、萘基等芳基，咪唑基、吡咯基、噻唑基等雜芳基。

【0116】 該方法的情況時，原料而言，在 β 位有做爲取代基 R^1 的芳族取代基的胺基酸可做爲原料而實施。例如，天然型的例而言，可以苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸、組胺酸爲原料而實施。做爲原料的該等的芳族胺基酸，可使用市販品，或者，可以公知的方法調製。該等的胺基酸是，根據入手的容易性及其他的事情，可使用成爲 α 碳原子的 D-體及 L-體的混合物的胺基酸，或者，可使用實質上只有 α 碳原子的 D-體或 L-體的任一方所成的光學活性體。本發明的一態樣中，做爲原料，可使用 α 碳原子的 D-體及 L-體的等量混合物的胺基酸，在這個情況時，可做爲原料而使用消旋體胺基酸。做爲原料而使用該等的消旋體胺基酸時，反應直接以消旋體的狀態進行，中間組成物也是成爲消旋體而得，所以中間組成物的結晶化效率高，精製容易。又，做爲原料而使用光學活性體時，不實施控制 α 不對稱碳原子的立體配置而不在意於產生消旋化而可進行反應。本發明的一態樣中，由有效率進行中間組成物的

精製的觀點而言，原料化合物是使用結晶化效率高的消旋體胺基酸為理想。

【0117】 藉由光反應導入鹵原子的方法，可依照公知的方法而實施。一般而言，光的照射下，藉由使溶媒中的鹵化劑反應而可實施。例如，在四氯化碳中，N-溴琥珀醯亞胺(NBS)做為溴化劑而使用 200W 燈的照射下反應一小時而實施。鹵化劑而言，可使用 N-溴琥珀醯亞胺等，在本發明的一態樣中，以 N-溴琥珀醯亞胺為理想。又，反應時間，鹵化反應能充分進行則沒有特別的限制，可為 30 分鐘至 2 小時，理想是 1 小時等。又，由有效率進行光反應的觀點而言，亦可將實驗系以鋁箔等覆蓋。

【0118】 亦即，該方法是於本發明的製造方法中，在前述步驟(I)中，做為反應(A)的導入硫醇基的反應之前，做為步驟(P)，實施「製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟」的情況中的一態樣。又，特別地，取代基 R^1 是芳族取代基時，可做為「對 β 碳原子有取代基 R^1 的胺基酸衍生物，在 β 碳原子導入脫離基 L 的步驟」而實施，在本說明書中，為了方便可將此步驟稱呼為(P-1)。這時，經導入的脫離基 L，在做為反應(A)的硫醇基導入反應時，與脫離基 L 的脫離同時，進行硫醇基的導入。

【0119】 又，在步驟(I)中，(B)將羧基或胺基變換成為酶的基質的反應，根據該基質的反應性的程度等，做為上述步驟(P)，可在製造 β 位有脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟之前實施，或者，亦可在其步驟之後實施。成為酶反

應的基質的構造，在其他的步驟中也有反應性高的構造的情況時，製造在 β 位有脫離基 L 的胺基酸衍生物，在 β 位導入硫醇基的反應間，藉由保護基保護，在之後，實施變換成為酶反應的基質的反應為理想。

【0120】 本發明者等，再進一步，做為本發明的一態樣，為了要能製造不限定於芳族取代基的種種取代基 R^1 的 β -硫基胺基酸衍生物起見，精心檢討的結果，發現做為一態樣，以甘胺酸做為原料，使用與以 R^1CHO 代表的醛化合物反應的方法，可有效率地製造在 β 位有種種的構造的 R^1 基，並且，在 β 位有做為脫離基 L 的羥基的胺基酸衍生物。依照這個方法，則使用相應於目的化合物的構造的醛，也能不限定於芳族胺基酸，可製造具有其他各種構造的各種胺基酸。

【0121】 藉由甘胺酸與以 R^1CHO 代表的醛化合物反應，甘胺酸的 α 碳原子，及構成 R^1CHO 代表的醛化合物的醛基的碳原子之間產生共價鍵。因此，由此反應所產生的化合物中，構成醛基的碳原子就成為相當於胺基酸的 β 碳原子，生成在 β 碳原子有取代基 R^1 、羥基、及氫原子的胺基酸衍生物。

【0122】 因而，使用該方法，相對於 β 碳原子有 2 個氫原子的天然型或非天然型的胺基酸，可以製造、代替在 β 碳原子結合的氫原子 1 個而有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物。

【0123】 例如，對天然型胺基酸在 β 位經導入經保

護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的製造而言，做為在 β 碳原子有 2 個氫原子的胺基酸，而對由 Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、及 Tyr 所成組群選出的胺基酸，可製造在 β 位經導入經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物。

【0124】 又，以上以天然型胺基酸為例而記述，但即使是非天然型的胺基酸，只要在 β 碳原子有 2 個氫原子的胺基酸，都可以同樣製造。

【0125】 將甘胺酸與醛反應的方法，例如，由該方法製造苯丙胺酸時，可實施藉由甘胺酸及苯甲醛在強鹼條件下縮合的方法。做為溶媒而言，例如，可使用強鹼水溶液，理想是可使用 5N NaOH 等。溫度可自低溫至室溫程度下實施，理想是 0 至 40℃，更理想是可為 10 至 20℃ 程度。反應時間可為 30 分鐘至 3 小時，理想是 1 小時。有關該方法，可參照例如，Nakagawa H 等人, Chem.Pharm.Bull.2003, 51,1363-1367 的方法而實施。

【0126】 在該方法中所用的以 R^1CHO 代表的醛化合物，可依照做為目的之胺基酸衍生物的構造而決定。

【0127】 如依照甘胺酸做為原料而製造在 β 位有羥基的胺基酸衍生物的方法，則做為原料的甘胺酸，由於 α 碳原子有 2 個氫原子結合的構造而不是不對稱碳原子。以此甘胺酸做為原料，而實施上述反應，在 β 位有羥基的胺基酸衍生物，通常可成為消旋體而得到。

【0128】 亦即，此方法可說是在本發明的製造方法

中，在前述步驟(I)中，做為反應(A)的硫醇基的導入反應之前，做為步驟(P)，實施「製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基L的胺基酸衍生物的步驟」的情況中的一態樣。又，特別地，將甘胺酸與以 R^1CHO 代表的醛化合物反應的步驟，本說明書中，為了方便可稱為步驟(P-2)。

【0129】 由該方法，可得在 β 位有羥基的胺基酸衍生物。在此 β 位有羥基的胺基酸衍生物，與已在前述的(P-1)的方法所得的化合物同樣，藉由使 β 位的脫離基脫離而在 β 位導入硫醇基的反應，可變換為在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物。此時，做為 β 位的脫離基而言，可將羥基直接做為脫離基，也可將羥基變換為更容易脫離的取代基之後脫離。亦即，亦可再含有將羥基變換為脫離基的步驟。例如，藉由羥基甲醯化，變成 MsO 基，可更容易脫離。這時， MsO 成為脫離基。依此方式，將羥基變換為脫離基的步驟，可將羥基與甲醯氯、對甲基苯基磺醯氯(tosyl chloride)、三氟甲烷磺酸酐等反應的方法而實施。由該等的反應， MsO 、 TsO 、 TfO 基各分別成為脫離基。

【0130】 如此，即使以甘胺酸做為原料的方法，也可製造在 β 位有脫離基的胺基酸衍生物。

【0131】 本發明的製造方法中，做為消旋體的芳族胺基酸或甘胺酸做為原料而實施時，在此導入硫醇基的步驟的原料化合物，可為 α 碳原子的D-體及L-體的等量混合物，也可說是消旋體胺基酸。又，做為原料，而使用光學活性芳族胺基酸時，在 β 位導入硫醇基的步驟中，可以不

控制立體異構而實施反應，考慮消旋化進行到某種程度，咸信在導入硫醇基的步驟的原料化合物為 D 體及 L-體的混合物。

【0132】 本發明的製造方法的一態樣中，經由在 β 位有脫離基的胺基酸衍生物而實施時，在上述的反應之後，可實施在 β 位導入硫醇基的步驟。關於在 β 位導入硫醇基的步驟，如已在前面所述。

【0133】 再者，以甘胺酸做為原料的方法的 1 例，如上述，將甘胺酸與醛化合物反應的方法之外，可使用將甘胺酸與酮化合物反應的方法。該方法是，對在 β 碳原子有 1 個氫原子結合，2 個經取代或未經取代的烷基結合的胺基酸，有用於做為製造在胺基酸的 β 位經導入經保護或未經保護的硫醇基的方法。

【0134】 例如，對天然型胺基酸在胺基酸的 β 位經導入經保護或未經保護的硫醇基衍生物的製造而言，做為在 β 碳原子有 1 個氫原子的胺基酸，而對由 Val 及 Ile 所成組群選出的胺基酸，可製造在 β 位經導入經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物。

【0135】 又，以天然型胺基酸做為例而記述，但即使是非天然型的胺基酸，如在 β 碳原子有 1 個氫原子的胺基酸，則可同樣地製造。

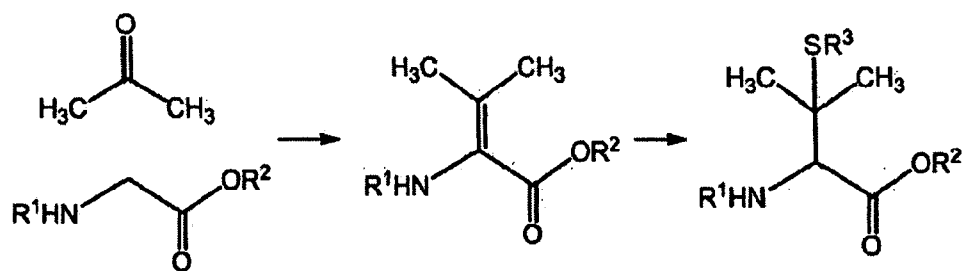
【0136】 該甘胺酸與酮反應的方法，可比照例如，如已述的，甘胺酸與醛縮合的反應而實施。例如，將甘胺酸及丙酮在強鹼條件下，在低溫縮合等方法而可實施。

【0137】 該方法中所用的酮化合物，可隨做為目的之胺基酸衍生物的構造而決定。做為目的之胺基酸衍生物為在 β 碳原子有取代基 R^1 之外之取代基 R^3 的化合物時，使用 $R^1-(C=O)-R^3$ 代表的酮化合物而實施。在這裡， R^1 及 R^3 是，表示經取代或未經取代的烷基。烷基而言，例如，可為甲基、乙基、丙基等碳數 1 至 6 的烷基等。取代基而言，可為在胺基酸側鏈存在的各種取代基，該等亦可有保護。

【0138】 藉由甘胺酸與 $R^1-(C=O)-R^3$ 代表的酮化合物反應，而在甘胺酸的 α 碳原子，與構成 $R^1-(C=O)-R^3$ 代表的酮化合物的酮基的碳原子之間產生雙鍵，構成酮基的羰基氧則脫離。因此，由此反應所產生的化合物中，構成酮基的碳原子變成相當於胺基酸的 β 碳原子，而生成在 β 碳原子有取代基 R^1 及取代基 R^3 的胺基酸衍生物。對該反應中產生的 α 碳原子與 β 碳原子之間的雙鍵，藉由在 β 碳原子加成經保護或未經保護的硫醇基，在 α 碳原子加成氫原子，而可在 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基。

這時在 β 碳原子加成硫醇基的反應，可依照公知的方法而實施。例如，將硫醇化合物在 DMF 等的有機溶媒中，可使用二氮雜雙環十一烯 (DBU) 等鹼實施求核反應的方法而實施。

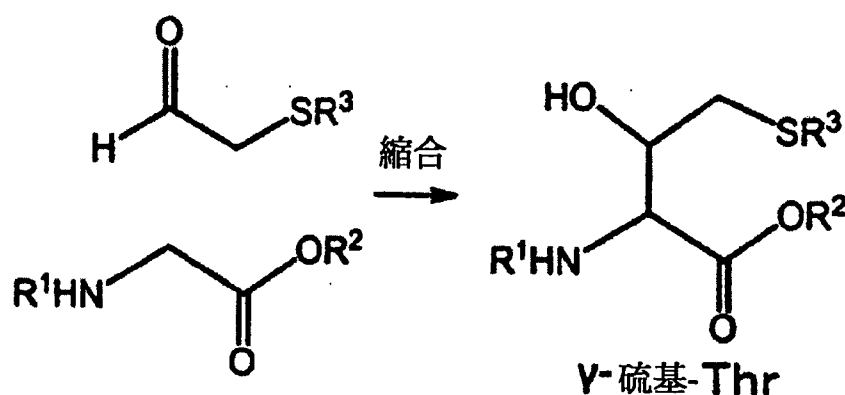
【0139】 將該方法，以製造天然型纈草胺酸的 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物的做為例，可做為以下的化學反應式表示。



【0140】 再者，也可製造在 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物作為在側鏈有硫醇基的胺基酸。

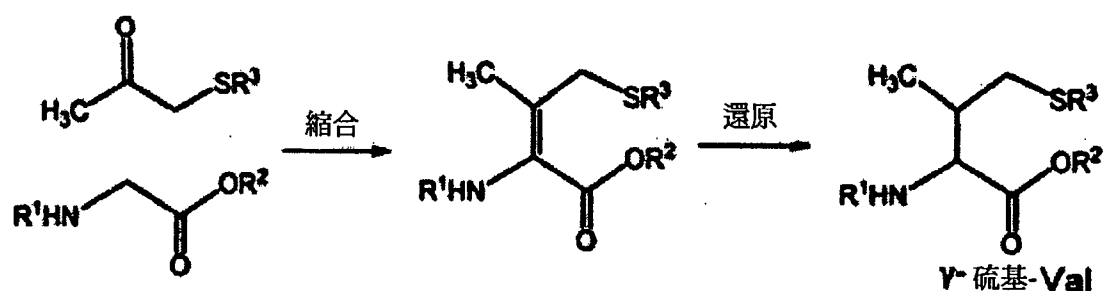
【0141】 做為以甘胺酸做為原料的方法的 1 例，對於甘胺酸，藉由使在 α 位有硫醇基的醛反應的方法，可製造在 β 位有羥基，在 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物。

【0142】 該方法，以製造在天然型的蘇胺酸(threonine)的 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物做為例，可表示為以下的化學反應式。



【0143】 做為以甘胺酸做為原料的方法的 1 例，對於甘胺酸，藉由使在 α 位有硫醇基的酮反應的方法，可製造在 β 位有烷基，在 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物。

【0144】 該方法，以製造在天然型的纈草胺酸的 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物做為例，可表示為以下的化學反應式。



【0145】 如上述，應用使甘胺酸與醛化合物反應的方法，使甘胺酸與酮化合物反應的方法，可製造如上述的在 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物。

該等的方法，有用於做為製造對在 β 碳原子有 1 個羥基結合的胺基酸，在胺基酸的 γ 位導入經保護或未經保護的硫醇基的方法。

【0146】 本發明的方法所得的側鏈有硫醇基的光學活性 D-或 L-胺基酸衍生物，根據目的，可直接做為胺基酸衍生物而用於種種的用途之外，可用於 D-蛋白質或 L-蛋白質的合成。特別地，可做為用於製造該等蛋白質之目的而在 NCL 作為結合部位而使用。特別地，可合適使用在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物，但在 γ 位有硫醇基的胺基酸衍生物也同樣可合適使用。本發明的方法所得的胺基酸衍生物是，根據其目的、用途，也可對羧基，胺基，硫醇基，其他的側鏈取代基等加以保護或脫保護而使用。例如，只將羧基或胺基的一方加以脫保護，而可用於胜肽的固相合成等。又，本發明的方法所得之側鏈有保護的硫醇基的胺基酸衍生物，以硫醇基藉由保護基經保護的狀態直接實施胜肽合成，可實施 NCL 結合反應之點而有用。又，在其

NCL 結合反應後，使用除去硫醇基部分的方法，則如依照以往方法時無法做為 NCL 結合部位的胺基酸，也可做為 NCL 結合部位，對 D-或 L-蛋白質合成中 useful。

【0147】 又，在本說明書中所用的用語，用於說明特定的實施形態，而沒有限定發明的意圖。

【0148】 又，本說明書中所用的「包含」的用語，除開在文脈上明顯應做不同的理解的情況，表示有所記述的事項(部材，步驟，要素，數字等)的存在的意圖，並不排除其以外的事項(部材，步驟，要素，數字等)的存在。

【0149】 如無不同的定義，這裡所用的所有的用語(包括技術用語及科學用語。)，與本發明所屬技術領域中具通常知識者所廣受理解的意思相同。這裡所用的用語，如無明示不同的定義以外，應解釋為與本說明書及關連技術領域的意思有整合性的意思，不應被理想化，或，不應被過度解釋成為形式上的意思。

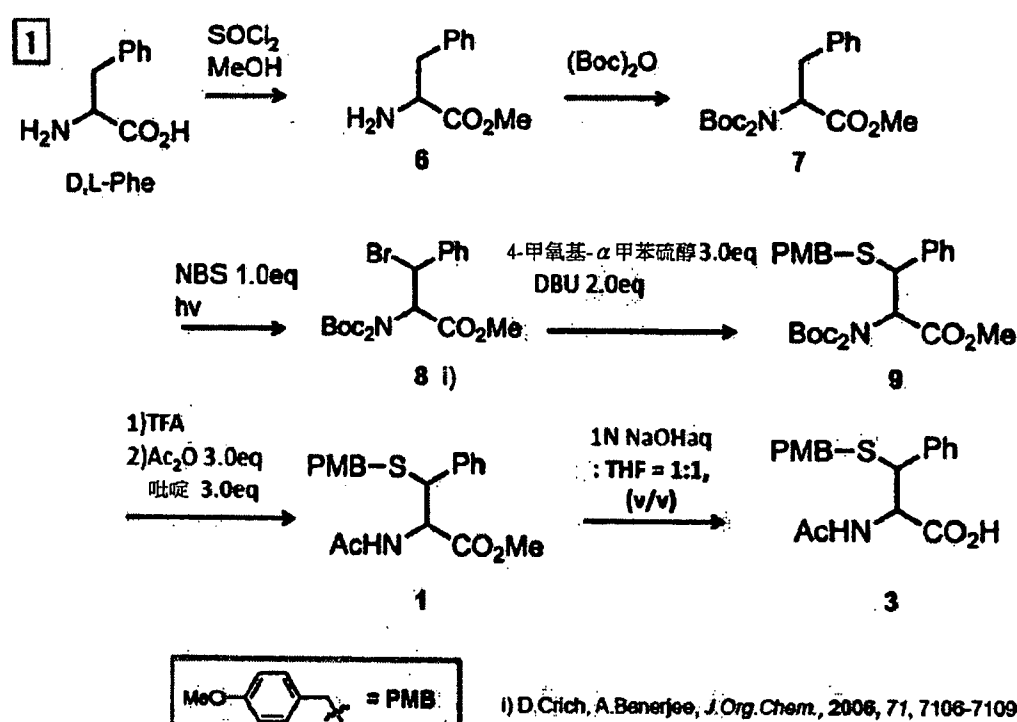
【0150】 第一的，第二等用語有被用於表現種種的要素的情況，該等的要素可理解為不應被該等的用語所限定。該等的用語只是要將一個要素與其他的要素加以區別之目的而使用，例如，將第一要素做為第二要素而敘述，同樣的，將第二要素做為第一要素而敘述，不脫離本發明的範圍。

【0151】 以下，以實施例將本發明更具體的說明，但是，本發明可以使用種種的形態而實現化，不應被解釋為限定於這裡所記述的實施例。

[實施例]

【0152】 以芳族胺基酸做為起始原料，在 β 位有硫醇基的光學活性的芳族胺基酸衍生物的合成

如在以下的反應式所表示，以芳族胺基酸做為起始原料，實施在 β 位有硫醇基的 D,L-苯丙胺酸的合成反應。在合成例中的化合物的名稱之後所記述的化合物編號，表示下述的反應式所述的化合物編號。



【0153】 (合成例 1) D,L-苯丙胺酸甲酯鹽酸鹽(化合物 6)

在氫氣下，將 D,L-苯丙胺酸(10.0g，60.5mmol)添加於甲醇(48.4mL)，將溶液冷卻至 0℃ 後，滴下亞磺醯氯(4.8ml，66.6mmol)。之後，在回流中攪拌 1 小時。將反應溶液減壓濃縮後，使用甲醇 5ml 及二乙醚 80mL 的混合溶媒實施再結晶，得 D,L-苯丙胺酸甲酯鹽酸鹽(化合物 6)(11.8g)。

【0154】 (合成例 2) N,N-DiBoc-D,L-苯丙胺酸-甲酯(化合物 7)

將化合物 6(11.8g)懸浮於 THF(292mL)後，冷卻至 0℃，添加溶解於水(164mL)的 Na_2CO_3 (7.0g, 1.0eq.)。之後，滴下 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (28.7g, 2.0eq.)，在常溫下攪拌 2 小時。由反應產生的化合物以乙酸乙酯萃取後，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮而得，N-Boc-D,L-苯丙胺酸-甲酯的粗生成物。

再將此粗生成物溶解於乙腈(202mL)，做為觸媒而添加 4-二甲基胺基吡啶(DMAP)(7.4g, 1.0eq.)，繼而，添加 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (39.6g, 3.0eq.)，在室溫下攪拌 12 小時。之後，減壓濃縮，以乙酸乙酯萃取，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。之後，以矽凝膠管柱層析法，使用乙酸乙酯：己烷 = 1：3 的展開溶媒，精製化合物 7(19.8g)。

【0155】 (合成例 3) N,N-DiBoc- β -溴-D,L-苯丙胺酸-甲酯(化合物 8)

在氬氣下，將化合物 7(5.0g, 13.2mmol) 溶解於四氯化碳(264mL)，添加 N-溴琥珀基亞醯胺(2.3g, 1.0eq.)之後，回流下，在 200W 的白熱電泡的光照射下，反應 1 小時。又，由於強光，將實驗系以鋁箔覆蓋。其次，反應後，放冷至室溫，將琥珀基亞醯胺以過濾除去。再減壓濃縮，而得化合物 8(5.7g)。

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{BrNO}_6[\text{M}+\text{Na}]^+$ ：計算 480.00 實測 480.16

^1H NMR(400 MHz) δ : 7.55-7.24(m, 5H), 5.76(d, 1H), 5.74(d, 1H), 5.68(d, 1H), 5.61(d, 1H), 3.80(s, 3H), 3.59(s, 3H), 1.58(s, 9H), 1.38(s, 9H)

【0156】 (合成例 4) N,N-DiBoc- β -甲氧基苄巰基-D,L-苯丙胺酸-甲酯(化合物 9)

在化合物 8(1.27g, 2.78mmol)的 DMF(7.9mL)溶液，在氬氣，室溫下滴下 4-甲氧基- α -甲苯硫醇(1.5mL, 12.5mmol)的 DBU(1.9mL, 9.7mmol)鹽的 DMF 溶液(4mL)，反應 3 小時。之後，將反應生成的化合物以乙酸乙酯萃取，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用乙酸乙酯：己烷 = 1：7 的展開溶媒，精製化合物 9(1.0g)。

【0157】 (合成例 5) N-乙醯基- β -甲氧基苄巰基-D,L-苯丙胺酸-甲酯(化合物 1)

將化合物 9(2.4g, 4.6mmol) 溶解於 DCM(46mL)，添加等量的 TFA，在室溫下反應 5 分鐘後，減壓濃縮，與甲苯共沸。之後，溶解於 DCM(46mL)，添加吡啶(1.1ml, 13.8mmol)， Ac_2O (1.2ml, 13.8mmol)，在室溫下反應 30 分鐘。反應後，添加少量的甲醇停止反應，減壓濃縮，而得化合物 1(1.1g)。

$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ ：計算 332.12 實測 331.13

【0158】 (合成例 6) N-乙醯基- β -甲氧基苄巰基-D,L-苯丙胺酸(化合物 3)

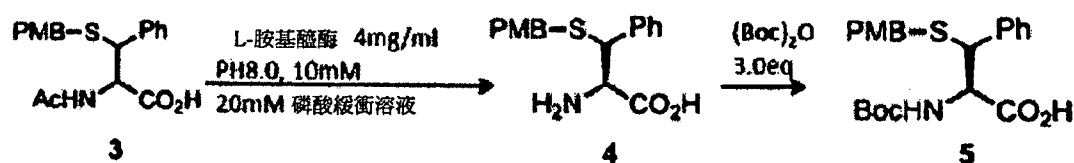
將化合物 1(1.0g) 溶解於 THF(5.5mL)，在室溫添加 1N

NaOH(5.5mL)，反應 30 分鐘。繼而，將反應系以 1N HCl 成爲 pH2 至 3 的酸性之後，以乙酸乙酯萃取 3 次。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。再將所得的粗成生物以乙酸乙酯再結晶，得化合物 3(0.65g)。

¹HNMR(400MHz) δ : 7.40-7.22(m, 5H), 7.40-7.22(m, 5H), 7.12(d, 2H), 7.07(d, 2H), 6.82(d, 2H), 6.80(d, 2H), 4.96(d, 1H), 4.85(d, 1H), 4.23(d, 1H), 4.10(d, 1H), 3.77(s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.54(q, 2H), 3.47(q, 2H), 1.96(s, 3H), 1.80(s, 3H)

【0159】 由在 β 位有硫醇基的 D,L-胺基酸衍生物，製造光學活性胺基酸衍生物

如以下的反應式所表示，對於在 β 位有硫醇基的 D,L-胺基酸衍生物使酶作用，實施在 β 位有硫醇基的光學活性胺基酸衍生物的合成反應。在合成例中的化合物的名稱後所記述的化合物編號，表示下述的反應式所述的化合物編號。



【0160】 (合成例 7-1)N-Boc- β -甲氧基苄巰基-L-苯丙胺酸(化合物 5)

將化合物 3(100mg, 0.28mmol) 溶解於磷酸緩衝溶液(pH8.0, 14mL)後，添加 L-胺基醯酶(源自 Aspergillus 種)(111mg, 30U/mg; 商品名醯酶「Amano」, 天野酵素公司製)的磷酸鹽緩衝溶液(pH8.0, 14mL)，在 37℃ 反應 2 日。之後，

在室溫下，在反應系添加 Boc_2O (3.0eq.) 的 THF (28mL) 溶液，反應 1 小時，實施 Boc 化。繼而，將反應系以 1N HCl 成爲 pH2 至 3 的酸性之後，以乙酸乙酯萃取 3 次。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用含有 1% 甲酸的乙酸乙酯的展開溶媒精製化合物 5，以 39% 的單離收率得化合物 5。

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 計算 440.15 實測 440.18

【0161】 又，在合成例 7 中，將沒有被 L-胺基醯酶分解的 N-乙醯基- β -甲氧基苄巰基-D,L-苯丙胺酸，在合成例 7 中以矽凝膠管柱層析法精製時同樣方式精製，以 50% 的收率得到 (50mg)。這是成爲使用 D-胺基醯酶的，N-Boc- β -甲氧基苄巰基-D-苯丙胺酸合成的原料。

【0162】 (合成例 7-2) N-Boc- β -甲氧基苄巰基-D-苯丙胺酸

又，在上述合成例 7 中，除了 L-胺基醯酶改變爲 D-胺基醯酶以外是以同樣的方法實施合成，也合成 N-Boc- β -甲氧基苄巰基-D-苯丙胺酸。

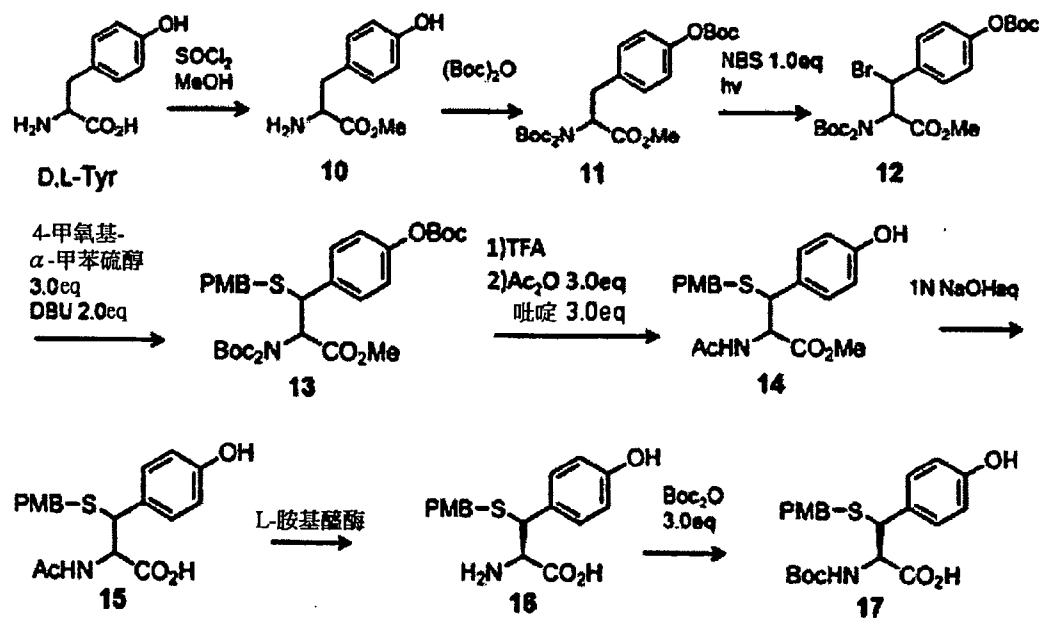
$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 計算 440.15 實測 440.18

【0163】 由以上的合成例，以芳族胺基酸做爲原料，在 β 位導入經保護的硫醇基，各分別使用 L-體選擇性的胺基醯酶，及，D-選擇性的胺基醯酶，各分別簡易且以高收率得到在 β 位有受保護的硫醇基的 L-胺基酸，及，在 β 位有受保護的硫醇基的 D-胺基酸。如依照以往的方法則以 L-胺基酸做爲原料在抑制 α 位的立體的異構化下，或每

次都分離異構化的 D-體，因此不只是提高收率很難，工業生產也不容易。與此相比，如依照本發明則將 D,L 混合胺基酸做為原料或中間體而不需要前述的注意。又，D,L 混合胺基酸是結晶化效率高，精製也簡便，所以可實現步驟的大幅的縮短。本發明技術是可利用於 NCL 的在 β 位有硫醇基的非天然型胺基酸的可工業生產的實用化的方法。

【0164】 如以下的反應式所表示，實施以芳族胺基酸做為起始原料，在 β 位有硫醇基的 D,L-酪胺酸的合成反應。在合成例中的化合物的名稱的後所記述的化合物編號，表示下述的反應式所述的化合物編號。

在 β 位有硫醇的酪胺酸衍生物合成路徑



【0165】 (合成例 8) D,L-酪胺酸甲酯鹽酸鹽 (化合物 10)

在氫氣下，將 D,L-酪胺酸 (10.0g, 55.1mmol) 添加於甲醇 (88mL)，將溶液冷卻至 0℃ 後，滴下亞磺鹽氯 (3.97ml, 60.6mmol)。之後，在回流下攪拌一小時。將反應溶液減壓

濃縮之後，使用甲醇 5mL 及二乙醚 80mL 的混合溶媒進行再結晶，得化合物 10(10.8g)。

【0166】 (合成例 9) N,N-DiBoc-O-Boc-D,L-酪胺酸-甲酯(化合物 11)

將化合物 10(10.8g) 懸浮於 THF(184mL)之後，冷卻至 0℃，添加溶解於水(92mL)的 Na_2CO_3 (5.9g, 1.0eq)。之後，滴下 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (24g, 2.0eq.)，在常溫下攪拌 2 小時。以乙酸乙酯萃取後，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮而得 N-Boc-D,L-酪胺酸-甲酯的粗生成物。再將此生成物溶解於乙腈(184mL)，添加 DMAP(6.7g, 1.0eq.)，繼而，添加 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (36.2g, 3.0eq.)，攪拌 12 小時。之後，減壓濃縮，以乙酸乙酯萃取，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用乙酸乙酯：己烷 = 1：3 的展開溶媒，精製化合物 11(22.9g)。

^1H NMR(400MHz) δ : 7.28-7.04(m, 5H), 5.15(dd, 1H), 3.43(dd, 1H), 3.20(dd, 1H), 1.55(s, 9H), 1.40(s, 18H)

【0167】 (合成例 10) N,N-DiBoc- β -溴-O-Boc-D,L-酪胺酸-甲酯(化合物 12)

在氬氣下，將化合物 11(6.0g, 12mmol) 溶解於四氯化碳(120mL)，添加 N-溴琥珀基亞醯胺(2.1g, 1.0eq.)之後，在回流下，在 200W 的白熱電泡光照射下，反應一小時。這時，由於強光，將實驗系以鋁箔覆蓋。反應後，放冷至室溫，將琥珀基亞醯胺以過濾除去。再減壓濃縮而得化合

物 12(6.6g)。

【0168】 (合成例 11)N,N-DiBoc- β -甲氧基苄巯基-O-Boc-D,L-酪胺酸-甲酯(13)

在化合物 12(2.9g, 5.1mmol)的 DMF(23mL)溶液在氬氣下、室溫下滴下 4-甲氧基- α -甲苄硫醇(1.4mL, 10.2mmol)的 DBU(1.5mL, 10.2mmol)鹽的 DMF 溶液(11.5mL)反應 3 小時。之後，以乙酸乙酯萃取，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用乙酸乙酯：己烷 = 1：7 的展開溶媒，精製化合物 13(1.2g)。

【0169】 (合成例 12)N-乙醯基- β -甲氧基苄巯基-D,L-酪胺酸-甲酯(化合物 14)

將化合物 13(1.3g, 2.1mmol)溶解於 DCM(21mL)，添加等量的 TFA，在室溫下反應 5 分鐘後，減壓濃縮，與甲苯共沸。之後，溶解於 DCM(21mL)，添加吡啶(0.8ml, 10.5mmol)，Ac₂O(0.9ml, 10.5mmol)，在室溫下反應 30 分鐘。反應後，添加少量的甲醇而停止反應，以減壓濃縮，做為粗成生物得到化合物 14(441mg)。

C₁₈H₂₂NO₄S [M+H]⁺：計算 348.12 實測 348.17

【0170】 (合成例 13)N-乙醯基- β -甲氧基苄巯基-D,L-酪胺酸(化合物 15)

將粗成生物 14(441mg)溶解於 THF(10.5mL)，在室溫下添加 1N NaOH(10.5mL)，反應 30 分鐘。繼而，將反應系以 1N HCl 成為 pH2 至 3 的酸性之後，以乙酸乙酯萃取

3 次。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用含有 1%甲酸的乙酸乙酯：己烷 = 1：2 的展開溶媒，精製化合物 15(301mg)。

【0171】 (合成例 14-1)N-Boc- β -甲氧基苄巰基-L-酪胺酸 (化合物 17)

將化合物 15(72mg, 0.19mmol) 溶解於磷酸緩衝溶液 (pH8.0, 9mL)後，添加 L-胺基醯酶(源自 *Aspergillus* 種) (111mg, 30U/mg; 商品名醯酶「Amano」, 天野酵素公司製) 的磷酸緩衝溶液 (pH8.0, 10mL), 在 37°C 反應 2 日間。之後，在室溫下，在反應系添加 Boc_2O (124mg, 3.0eq.) 的 THF (19mL) 溶液，反應一小時實施 Boc 化。繼而，將反應系以 1N HCl 成爲 pH2 至 3 的酸性之後，以乙酸乙酯萃取 3 次。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮。以矽凝膠管柱層析法，使用含有 1%甲酸乙酸乙酯：己烷 = 4：1 的展開溶媒，得 29mg 的化合物 17。

【0172】 (合成例 14-2)N-Boc- β -甲氧基苄巰基-D-酪胺酸

又，在上述合成例 14-1 中，除了 L-胺基醯酶改換爲 D-胺基醯酶以外以同樣的方法實施合成，也合成 N-Boc- β -甲氧基苄巰基-D-酪胺酸。

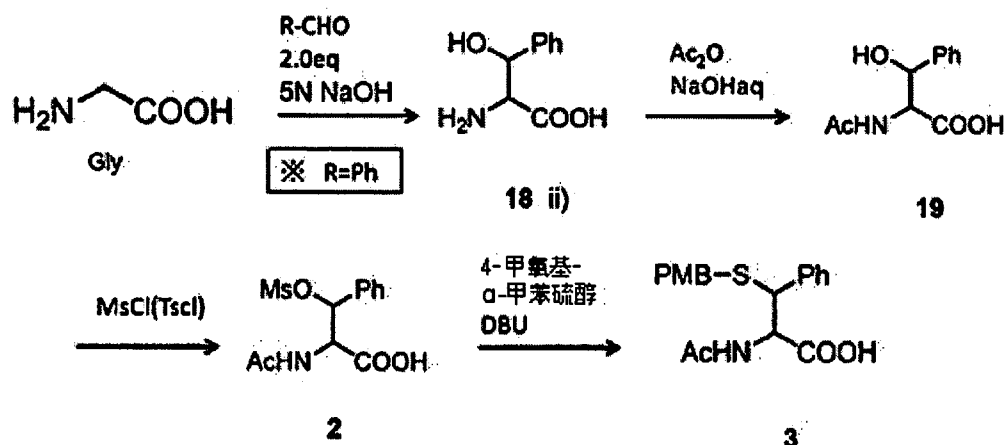
$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 計算 440.15 實測 440.18

【0173】 由以上的合成例，以芳族胺基酸做爲原料，在 β 位導入經保護的硫醇基，使用 L-體選擇性胺基醯酶，在 β 位有經保護的硫醇基的 L-酪胺酸衍生物，及，在 β 位有經保護的硫醇基的 D-胺基酸，各分別簡易且以高收率得

到。

【0174】 以甘胺酸做為起始原料的，在 β 位有硫醇基的各種光學活性胺基酸衍生物的製造

如在以下的反應式所表示，以甘胺酸做為起始原料而實施合成反應。在合成例中的化合物的名稱後所記述的化合物編號，表示下述的反應式所述的化合物編號。



【0175】 (合成例 15) β -羥基-D,L-苯丙胺酸(化合物 18)

將甘胺酸(7.0g) 溶解於 5N NaOH(63.7mL)，在 0℃ 冷卻下，將苯甲醛(9.24mL)每隔 10 分鐘分 3 次加入。之後，在室溫下反應 1 小時。繼而，使用 5N HCl(93.2mL)成為 pH2 至 3 的酸性之後，在 60℃ 減壓濃縮。在所得的粗生成物，在室溫下，添加甲醇(120mL)。將不溶於甲醇的鹽(氯化鈉)過濾，將溶液減壓濃縮。之後，再度溶解於甲醇(100mL)，以三乙胺將 pH 成為 6 至 7 而再結晶，得化合物 18(7.0g)。

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 計算 182.07 實測 182.20

【0176】 (合成例 16) N-乙醯基- β 羥基-D,L-苯丙胺酸(化合物 19)

將 β -羥基-D,L-苯丙胺酸(3.0g) 溶解於 5N 氫氧化鈉水溶液(10ml)，將乙酸酐(1.0eq)及，5N 氫氧化鈉水溶液(2mL) 每隔 15 分鐘分 3 次添加。然後最後以 5N 的 HCl 成爲 pH2 至 3 的酸性之後，以乙酸乙酯萃取 3 次。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮，得化合物 19(1.0g)。

$C_{11}H_{13}NO_4$ $[M+H]^+$: 計算 224.08 實測 224.20

【0177】 (合成例 17)N-乙醯基- β -O-甲醯基-D,L-苯丙胺酸(化合物 2)

將以合成例 16 的方法所得的化合物 19(15.0mg)在氫氣下，溶解於乙腈(350 μ L)，添加三乙胺(14.6 μ L)及甲基磺醯氯(mecyl chloride)(6.5 μ L)，在常溫下反應 2 小時。將反應所生成的化合物以乙酸乙酯萃取後，以飽和氯化銨水溶液、水、飽和食鹽水清洗。將有機層以硫酸鎂乾燥，過濾，減壓濃縮，得化合物 2。這裡，以質量分析確認所得的化合物是在 β 位的羥基有甲磺醯化(mesylated)的化合物 2。

$C_{12}H_{15}NO_6S$ $[M+Na]^+$: 計算 324.05 實測 324.1

【0178】 (合成例 18)N-乙醯基- β -甲氧基苄巰基-D,L-苯丙胺酸(化合物 3)

以與合成例 11 同樣的方法，在化合物 2 的 DMF 溶液，在氫氣，室溫下滴下 4-甲氧基- α -甲苯硫醇的 DBU 鹽的 DMF 溶液，反應 3 小時，以同樣方法實施萃取，清洗等，得化合物 3。

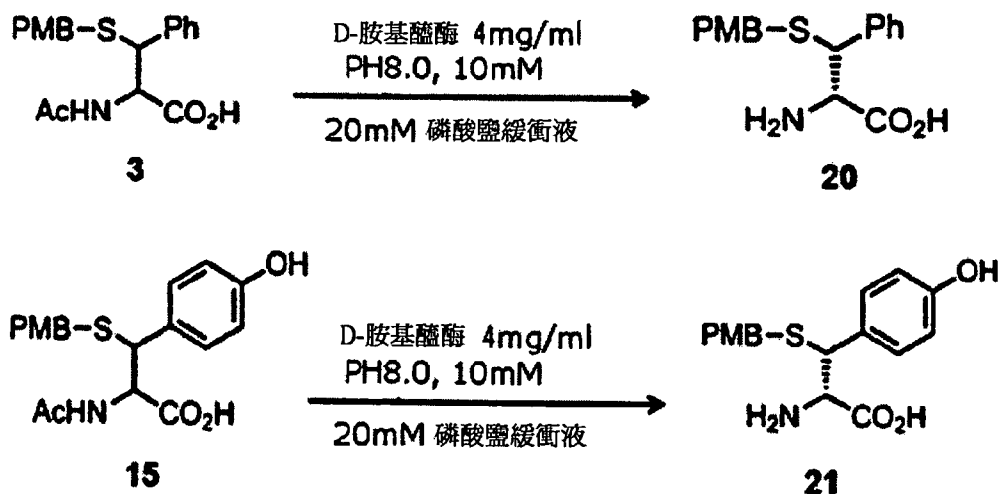
【0179】 由以上的合成例，以甘胺酸爲原料，合成 β -羥基-胺基酸衍生物，代替在 β 位的羥基，藉由在 β 位

導入經保護的硫醇基，而可得在 β 位經保護的硫醇基的 D,L-胺基酸衍生物。所屬技術領域者，參照本說明書所述的方法，由此方法，不限於芳族胺基酸，應可合成在 β 位有經保護的硫醇基的各種構造的 D,L-胺基酸衍生物。然後，對所得的 D,L-胺基酸衍生物，以與合成例 7 同樣的方法，可以簡易的方法以更高收率獲得在 β 位有經保護的硫醇基的各種構造的光學活性胺基酸衍生物。

【0180】 β 位有硫醇基的 D-胺基酸衍生物的製造

如在以下的反應式所表示，使用 D-胺基醯酶實施在 β 位有硫醇基的 D-胺基酸衍生物的合成反應。在合成例中的化合物的名稱後所記述的化合物編號，表示下述的反應式所述的化合物編號。

在 β 位有硫醇基的 D-胺基酸衍生物合成路徑



【0181】 (合成例 19) β -甲氧基苄巯基-D-苯丙胺酸(20)

將化合物 3(1mg, 28 μ mol) 溶解於磷酸緩衝溶液 (pH8.0, 140 μ L)後，添加另外調製的 D-胺基醯酶(源自大

腸菌)(1mg, 250U/mg; 商品名 D-胺基醯酶「Amano」, 天野酵素公司製)磷酸緩衝溶液(pH8.0, 140 μ L), 在 37°C 反應 2 週。以 HPLC 實施分析, 確認有 α 位胺基沒有受保護的化合物 20 的生成。這裡, HPLC 是使用 Cadenza C-18(75 $\times$ 4.6mm)管柱, 以溶出條件 0.1%TFA 水溶液: 90%乙腈水溶液(含有 0.1%TFA)=80:20 $\rightarrow$ 30:70(15 分), 流速 1mL/min 實施。

C₁₇H₁₉NO₃S [M+H]⁺: 計算 318.11 實測 318.73

【0182】 此合成例 19 中, 在酶反應終了後, 也可與(合成例 7-1)同樣實施 N-Boc 化之後精製。

【0183】 (合成例 20) β -甲氧基苄巰基-D-酪胺酸(21)

將化合物 15(1mg, 27 μ mol) 溶解於磷酸緩衝溶液(pH8.0, 170 μ L)後, 添加另外調製的 D-胺基醯酶(源自大腸菌)(1mg, 250U/mg; 商品名 D-胺基醯酶「Amano」, 天野酵素公司製)的磷酸緩衝溶液(pH8.0, 100 μ L), 在 37°C 反應 3 日。實施以 HPLC 的分析, 確認有 α 位胺基未受保護的化合物 21 的生成。這裡, HPLC 是使用 Cadenza C-18(75 $\times$ 4.6mm)管柱, 以溶出條件 0.1%TFA 水溶液: 90%乙腈水溶液(含有 0.1%TFA)=80:20 $\rightarrow$ 0:100(15 分), 流速 1mL/min 實施。

C₁₇H₁₉NO₄S [M+H]⁺: 計算 334.10 實測 334.66

【0184】 在此合成例 20 中, 也可在酶反應終了後與(合成例 7-1)同樣實施 N-Boc 化之後精製。

【0185】 由以上的合成例, 由在 β 位有經保護的硫

醇基的 D,L-胺基酸衍生物，可以高收率簡易的方法得到 D-體。即，依照以往的 D-體或 L-體的胺基酸做為原料的製造方法，則為避免發生 α 不對稱碳原子的立體異構化，而不能使用加熱條件，及強鹼性或強酸性條件的反應，依照本發明的製造方法，則可以使用該等的激烈的條件，反應效率優異，更簡便的製造步驟。所屬技術領域者，參照本說明書所述的方法，依照本發明的製造方法，不僅是 L-胺基酸，D-胺基酸也可以有效率的合成。又，做為起始化合物，如在合成例 7 所述，回收沒有被 L-體選擇性水解酶水解的 D,L-胺基酸衍生物而同樣做為起始化合物，與 D-體選擇性水解酶反應，則將 D-胺基酸及 L-胺基酸做為 D,L-胺基酸衍生物而同時合成之後，可有效率的得 D-體及 L-體的雙方。又，相反地，先與 D-體選擇性水解酶反應時也同樣。在生體內存在的 L-蛋白質之外，此點就近年需要在增高之 D-蛋白質及消旋蛋白質的原料可以安定的供給，可使該等的蛋白質的工業的生產之點上有用。

【0186】 又，在本實施例中做為 β 硫基消旋胺基酸的原料而顯示使用芳族胺基酸或甘胺酸的例，但並不是否定本發明的製造方法中其他的胺基酸衍生物做為起始原料的意圖。所屬技術領域者，則根據本案所述的方法，可以各種胺基酸衍生物做為起始原料而實施本發明。

【符號說明】

無

I685480

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

具有硫醇基之 D-體或 L-體胺基酸衍生物的製造方法

A PRODUCING METHOD OF D-FORM OR L-FORM
AMINO ACID DERIVATIVES HAVING A THIOL GROUP

【中文】

本發明是提供將在側鏈有硫醇基之光學活性 D-體及 / 或 L-體胺基酸，以簡易的方法，以高收率製造的方法做為課題。

本發明是提供在側鏈有硫醇基的胺基酸衍生物的製造方法，及其中間體，該製造方法係製造包含在 β 位有硫醇基的胺基酸衍生物的 D-體及 L-體的中間體組成物，使 D-或 L-胺基酸選擇性的水解酶反應，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物。

【英文】

This invention provides a producing method of an optical active D-form and/or L-form amino acid having a thiol group on its side chain by a simple method with good yield.

This invention provides a producing method of an amino acid derivative having a thiol group on its side chain, and an intermediate thereof, wherein the producing method is characterized by producing an intermediate composition comprising a D-form and L-form of amino acid derivate having a thiol group at β -position, reacting D- or L-amino acid selective hydrolytic enzyme, and isolating the hydrolyzed D- or L-amino acid derivative.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式。

申請專利範圍

1. 一種 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，該 D-或 L-非天然型胺基酸衍生物係在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基及取代基 R^1 ，其中 R^1 是指構成胺基酸的側鏈的取代基中，結合在 β 碳原子的取代基部分，惟排除氫原子的情況，

該製造方法係包含下列步驟，

(I) 對胺基酸衍生物實施下述反應，製造包含 D-體及 L-體之在 β 位有經保護或未經保護的硫醇基的胺基酸衍生物的步驟：

(P)製造在 β 碳原子有取代基 R^1 及脫離基 L 的胺基酸衍生物的步驟，其中，前述步驟(P)包含(P-2)使甘胺酸與以 $R^1\text{CHO}$ 代表的醛化合物反應的步驟，

(A)在該胺基酸衍生物的 β 碳原子導入經保護或未經保護的硫醇基的反應，其中，前述反應(A)是與使前述脫離基 L 脫離胺基酸衍生物的 β 碳原子的反應同時進行者，及

(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基或羧基，變換為會成為 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的基質的取代基的反應，

及，

(II)對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶的任一方反應，繼而，分離經水解的 D-

或 L-胺基酸衍生物的步驟。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中

前述步驟(B)是：(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基，變換為醯基胺基的反應，

在前述步驟(II)中的 D-或 L-胺基酸選擇性水解酶是 D-或 L-胺基醯酶。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中

在前述步驟(II)中，分離經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟包含：

對經水解的 D-或 L-胺基酸衍生物導入脂溶性保護基的步驟，

利用由於脂溶性保護基的有無所產生的疏水性的差異，而分離經導入脂溶性保護基的 D-或 L-胺基酸衍生物的步驟。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其係 D-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，其中，

前述步驟(II)中，使用 D-胺基酸選擇性水解酶，繼而，分離經水解的 D-胺基酸衍生物。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其係 L-非天然型胺基酸衍生物的製造方法，其中，

前述步驟(II)中，使用 L-胺基酸選擇性水解酶，繼而，分離經水解的 L-胺基酸衍生物。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中

前述步驟(A)中導入的硫醇基是藉由從 PMB(對甲

氧基苄基)、Acm(乙醯胺基甲基)、苄基、Trt(三苯甲基)、二硫基、三級丁基選出的保護基所保護的硫醇基。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中，

步驟(II)是對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 D-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟，

並且，該製造方法更包含下列步驟：

(III)水解在(II)未經水解的 L-胺基酸衍生物，繼而，取得經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中，

步驟(II)是對於(I)所得的胺基酸衍生物，使 L-胺基酸選擇性水解酶反應，繼而，分離經水解的 L-胺基酸衍生物的步驟，

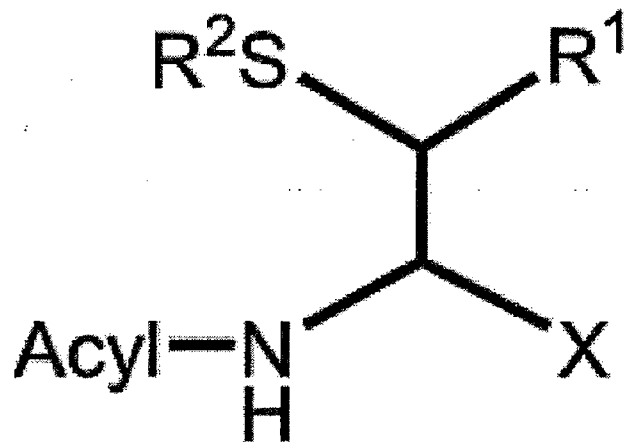
並且，該製造方法更包含下列步驟：

(III)水解在(II)未經水解的 D-胺基酸衍生物，繼而，取得經水解的 D-胺基酸衍生物的步驟。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述的製造方法，其中

前述步驟(B)是：(B)將結合在該胺基酸衍生物的 α 碳原子的胺基變換為醯胺基的反應，

步驟(II)中所述的「(I)所得的胺基酸衍生物」是包含以下述式所代表之與 α 碳原子相關的 D-體及 L-體的組成物



[在這裡， R^2 代表氫原子或硫醇基的保護基， X 代表經保護或未經保護的羧基， $Acyl$ 表示醯基， R^1 表示構成胺基酸的側鏈的取代基中，結合在 β 碳原子的取代基部分，惟排除氫原子的情況]，

在前述步驟(II)中，D-或 L-胺基酸選擇性水解酶是 D-或 L-胺基醯酶。

10. 如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中任一項所述的製造方法，其中，係使用含有與 α 碳原子有關的 D-體及 L-體的胺基酸衍生物，或 α 碳原子不是不對稱碳原子的胺基酸衍生物做為原料。