

明 細 書

発明の名称：

α －置換システインもしくはその塩又は α －置換システイン合成中間体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医薬品等の中間体として有用な、 α －置換システインもしくはその塩又は α －置換システイン合成中間体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] α －置換システインのうち、特に光学活性 α －置換システインは医薬品の中間体として有用であり、 α －置換システイン又はその塩の製造方法としては、従来から様々な方法が知られている（例えば、特許文献1）。

しかしながら、従来の方法は、ブチルリチウム等の高価な塩基を用いた低温反応が必要であったり、工程数が長くて煩雑で、さらに高価な試薬を多く使う必要があったりする等、工業的規模での安定生産が困難であり、実用的とは言い難いものであった。

[0003] 特許文献1のように高価な試薬や低温反応を必要としない方法として、特許文献2に、ラセミ体のN－カルバモイル－ α －メチルシステイン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とし、次いでD－5－メチル－5－チオメチルヒダントインの加水分解、脱カルバモイル化及び硫黄原子の脱保護（*tert*－ブチル基の脱離）を行う α －メチル－D－システインの製造方法が記載されている。なお、この α －メチル－D－システインは、光学活性 α －置換システインの一つであり、鉄過剰症治療薬の中間体として有用である。

[0004] 特許文献3に、ベンジル基で保護されたチオールを有するジエステルにバチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）プロテアーゼを作用させることで（S）－モノエステルとした後、クルチウス転位によって生成するイソシアネート基をアミノ基に変換してベンジ

ル基保護 α -メチル-D-システインを得る方法が記載されている。

[0005] また、非特許文献1に、ベンジル基ではなくtert-ブチル基で保護されたジエステルをブタ肝臓エステラーゼで(R)-モノエステル化し、カルボキシル基のtert-ブチルエステル化、メチルエステルの加水分解を経て(S)-モノエステルを得て、その後、クルチウス転位によって生成するイソシアネート基をカーバメート保護されたアミノ基へと変換し、カーバメート保護を脱保護することによってtert-ブチル保護 α -メチル-D-システインを得る方法が開示されている。

[0006] 非特許文献2には、非特許文献1に記載のtert-ブチル保護ジエステルとtert-ブチルチオクロロメタンとメチルジアルキルマロネートとを、塩基の存在下、反応させて製造する方法が記載されている。また、tert-ブチルチオクロロメタンの製法として、ジクロロメタン中で、tert-ブチルメルカプタン、パラホルムアルデヒド及び塩化水素を反応させる方法が記載されている。ここで、ホルムアルデヒドと塩化水素が接触するとビスクロロメチルエーテルが発生することが知られている（例えば、非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2001/072702号

特許文献2：国際公開第2003/106689号

特許文献3：国際公開第2007/106022号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Journal of Organic Chemistry (2003), 68(13), p.5403-5406

非特許文献2：Synlett (2010), (19), p.2941-2943

非特許文献3：Chemische Berichte, 88, 1737(1955)

発明の概要

[0009] 特許文献2に記載の方法においては、ヒダントインの加水分解、脱カルバモイル化、硫黄原子の脱保護の各工程において非常に長い反応時間を必要とするため生産効率が低い。また、D体を得るための手法として光学分割を用いているため、光学分割を行なう対象となるN-カルバモイル- α -メチルシステインを、目的とする量に対して少なくとも2モル当量製造することが必要とされる。さらに、不要なL体の廃棄処理が必要となる。

また、特許文献3に記載の方法では、ジエステルから理論収率100%で(S)-モノエステルが得られる(即ち、ベンジル基保護 α -メチル-D-システインもジエステルから理論収率100%で得られる)ため、上述の特許文献2のような問題は生じないが、 α -メチル-D-システインを得るためには、保護基である硫黄原子上のベンジル基を脱離する必要がある。ベンジル基の脱離には、一般的に、液体アンモニアと金属ナトリウムを使用したバーチ還元法が採用されている。この方法では、極低温条件が必要とされ、また発火性の非常に高い金属ナトリウムを使用しなければならないため、工業的生産には適していない。また、脱保護体の α -メチル-D-システインは有機溶媒での抽出が困難な化合物であるため、反応で生成する金属塩を除去することが難しい。

非特許文献1に記載の方法では、tert-ブチル基の脱離は塩酸で加熱することにより達成されるため、特許文献3のような問題は生じないが、しかし、(R)-モノエステルを(S)-モノエステルへと変換する操作が煩雑であるため、工業的生産には適していない。また、この方法で得られる(S)-モノエステルの光学純度は(R)-モノエステルによって決まるが、(R)-モノエステルの光学純度は91% e. e. であり、医薬品を製造するための中間体としては光学純度が不十分である。

また、tert-ブチル保護ジエステルを非特許文献2に記載の方法で製造すると、発がん性が極めて高いため、特に日本では安全衛生法第五十五条において製造禁止物質として定められているビスクロロメチルエーテルが発生してしまう可能性がある。

本発明は、上述の課題に鑑みてなされたものであり、医薬品等の中間体として有用な、 α -置換システイン又はその塩を、入手が容易であり、かつ安価な原料によって、より簡便に短時間で安全に製造でき、工業的規模において安定生産可能な実用的な方法を提供することを目的とする。

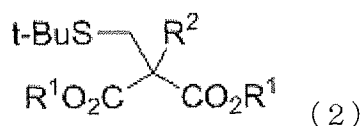
[0010] 本発明者らは、 α -置換システイン又はその合成中間体を製造する方法について鋭意検討した結果、2-オキソ-1, 3-チアゾリジン-4-カルボン酸を経ることにより、従来、非常に長い反応時間を必要としたtert-ブチル保護基を短時間で除去できることを見出した。さらに、2-(tert-ブチルチオ)メチル-2-置換マロン酸ジアルキルの製造について、tert-ブチルチオメタノール、又は2-[(tert-ブチルチオ)メチル]マロン酸ジアルキルから合成する工程を採用することにより、発がん性のあるビスクロロメチルエーテルを発生させることなく安全に製造することが可能であることを見出した。

また、本発明者らは、鉄過剰症治療薬の中間体として特に有用な α -置換-D-システインの製造において、煩雑な2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-置換マロン酸ジアルキルを(S)-2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-置換マロン酸アルキルに変換する工程を、酵素反応等により1段階で行うことが可能であることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、以下に関するものである。

[1] 工程(i)一般式(2)

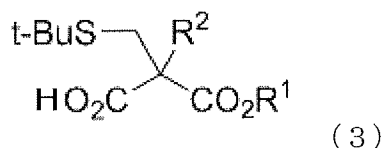
[化1]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、塩基、酸、又はエステル基を加水分

解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／若しくは該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させて、一般式（３）

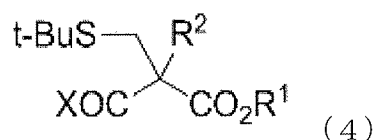
[化2]



（式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式（２）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物を得る工程；

工程（i i）前記一般式（３）で表される化合物に、縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させて、一般式（４）

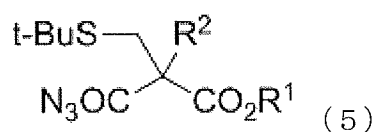
[化3]



（式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式（２）の R^1 及び R^2 と同義であり、 X は $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ 又はハロゲン原子を表し、 R^3 は置換されていてもよい炭素数１～１０のアルキル基、置換されていてもよい炭素数７～２０のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数６～１２のアリール基を表す。）で表される化合物を得る工程；

工程（i i i）前記一般式（４）で表される化合物に、アジド化剤を作用させて、一般式（５）

[化4]

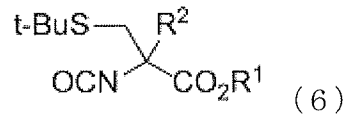


（式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式（２）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表

される化合物を得る工程；

工程（i v）前記一般式（5）で表される化合物を、クルチウス転位反応によって変換し、一般式（6）

[化5]



（6）

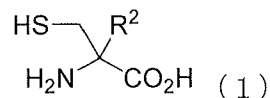
（式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式（2）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物を得る工程；及び

工程（v）前記一般式（6）

で表される化合物のイソシアネート基をアミノ基へと変換する工程、エステル基を加水分解する工程、及び酸を作用させてtert-ブチル基を除去する工程；

を含むことを特徴とする、一般式（1）

[化6]



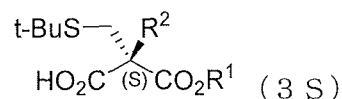
（式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[2] 前記工程（i）において、

前記酵素が、（A）配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18のアミノ酸配列を有するタンパク質、

（B）配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18のアミノ酸配列と35%以上の同一性を有し、かつ、前記一般式（2）で表される化合物を加水分解し、前記一般式（3）で表される化合物のうち立体配置がS体である一般式（3S）

[化7]

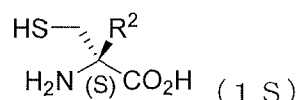


(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(3)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質、

又は、(C)配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式(2)で表される化合物を加水分解し、前記一般式(3)で表される化合物のうち立体配置がS体である一般式(3S)で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質であり、

前記一般式(1)で表される α -置換システインが、以下の立体配置がSである一般式(1S)

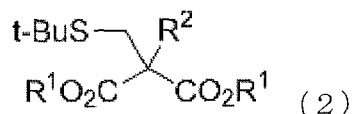
[化8]



(式中、 R^2 は前記一般式(1)の R^2 と同義である。)で表される α -置換システインである、[1]に記載の α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[3] 工程(i) 一般式(2)

[化9]

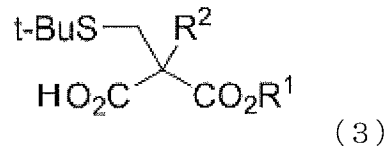


(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物にエステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵

素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／又は該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させる工程；

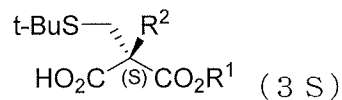
を含むことを特徴とする、前記一般式（３）

[化10]



（式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式（２）における R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物のうち、立体配置がS体である一般式（３S）

[化11]



（式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式（２）における R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物の製造方法。

[４] 前記酵素が、

（Ａ）配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６若しくは１８のアミノ酸配列を有するタンパク質、

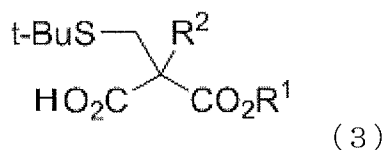
（Ｂ）配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６若しくは１８のアミノ酸配列と３５％以上の同一性を有し、かつ、前記一般式（２）で表される化合物を加水分解し、立体配置がS体である前記一般式（３S）で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質、又は、

（Ｃ）配列番号４、６、８、１０、１２、１４、１６若しくは１８で表されるアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式（２）で表される化合物を加水分解し、立体配置がS体である前記一般式（３S）で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質である、

[３] に記載の前記一般式（３S）で表される化合物の製造方法。

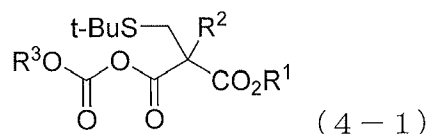
[５] 工程（i i）一般式（３）

[化12]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、クロロギ酸エステルを作用させる工程；を含むことを特徴とする、一般式(4-1)

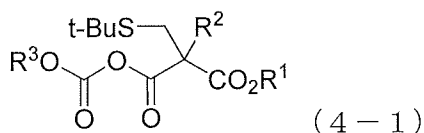
[化13]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(3)の R^1 及び R^2 と同義である。 R^3 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物の製造方法。

[6] 工程(iii) 一般式(4-1)

[化14]

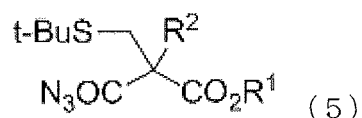


(式中、 R^1 と R^3 はそれぞれ独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、アジド化金属類を作用させる工程；

を含む

ことを特徴とする、一般式(5)

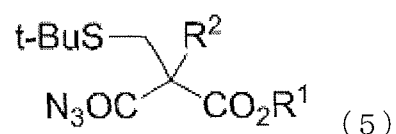
[化15]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(4-1)の R^1 及び R^2 と同義である。)
で表される化合物の製造方法。

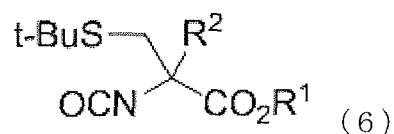
[7] 工程(iv) 一般式(5)

[化16]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6~12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1~4のアルキル基を表す。)
で表される化合物を、クルチウス転位反応により変換する工程；
を含むことを特徴とする、
一般式(6)

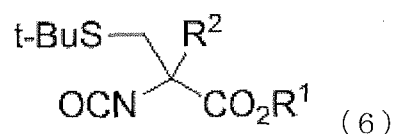
[化17]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(5)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[8] 工程(v) 一般式(6)

[化18]

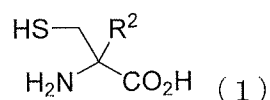


(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキル基、置換され

ていてもよい炭素数 7 ～ 20 のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数 6 ～ 12 のアリール基を表し、 R^2 は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。) で表される化合物のイソシアネート基をアミノ基へと変換する工程、エステル基を加水分解する工程、及び酸を作用させて *tert*-ブチル基を除去する工程；

を含むことを特徴とする一般式 (1)

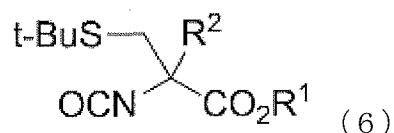
[化19]



(式中、 R^2 は前記一般式 (6) の R^2 と同義である。) で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

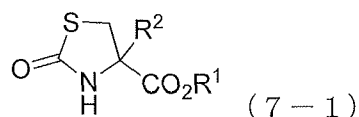
[9] 前記工程 (v) が、工程 (vi-1) 一般式 (6)

[化20]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式 (6) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物に酸を作用させチアゾリジノン環を構築することにより一般式 (7-1)

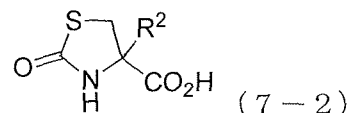
[化21]



(式中、 R^1 、及び R^2 は前記一般式 (6) の R^1 、及び R^2 と同義である。) で表される化合物へと変換する工程；

工程 (vi-2) 前記一般式 (7-1) で表される化合物に酸、又は塩基を作用させてエステル基を加水分解することにより、一般式 (7-2)

[化22]

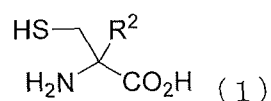


(式中、 R^2 は前記一般式(7-1)の R^2 と同義である。)で表される化合物を得る工程；及び

工程(vii) 前記一般式(7-2)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させてチアゾリジノン環を開環し、前記一般式(1)で表される α -置換システイン又はその塩を製造する工程；

を含むことを特徴とする[8]に記載の一般式(1)

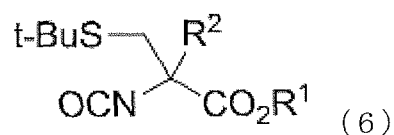
[化23]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[10] 工程(vi-1) 一般式(6)

[化24]

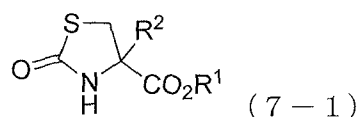


(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸を作用させてチアゾリジノン環を構築する工程

；

を含むことを特徴とする、一般式(7-1)

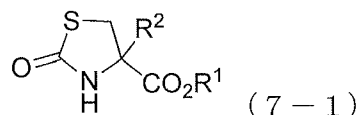
[化25]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(6)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[11] 工程(vi-2) 一般式(7-1)

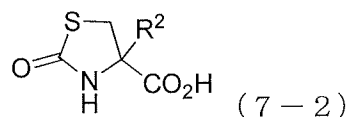
[化26]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6~12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させてエステル基を加水分解する工程；

を含むことを特徴とする、一般式(7-2)

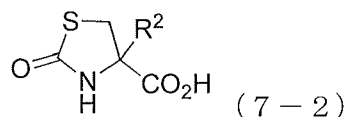
[化27]



(式中、 R^2 は前記一般式(7-1)の R^2 と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[12] 工程(vii) 一般式(7-2)

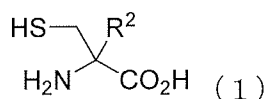
[化28]



(式中、 R^2 は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させチアゾリジノン環を開環する工程；

を含むことを特徴とする、一般式(1)

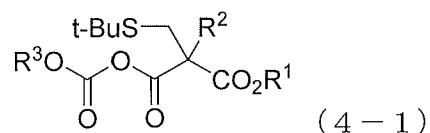
[化29]



(式中、 R^2 は前記一般式(7-2)の R^2 と同義である。)で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[13] 一般式(4-1)

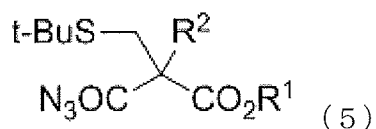
[化30]



(式中、 R^1 及び R^3 はそれぞれ独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

[14] 一般式(5)

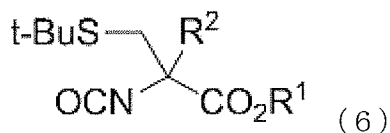
[化31]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

[15] 一般式(6)

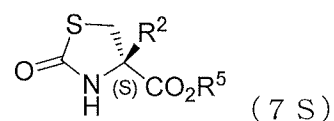
[化32]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

[16] 一般式 (7S)

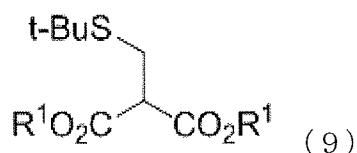
[化33]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表し、 R^5 は、水素原子、又は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物。

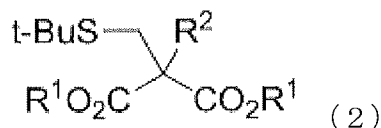
[17] 工程 (xi) 一般式 (9)

[化34]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物を、塩基の存在下、アルキル化剤と作用させる工程；を含むことを特徴とする、一般式 (2)

[化35]

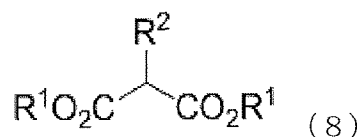


(式中、 R^1 は前記一般式 (9) の R^1 と同義であり、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物の製造方法。

[18] 工程 (viii) tert-ブチルメルカプタンとホルムアルデヒドとを反応させ、tert-ブチルチオメタノールを得る工程；

工程 (ix) tert-ブチルチオメタノールを塩基の存在下、クロル化剤と反応させ、tert-ブチルチオクロロメタンを得る工程；及び

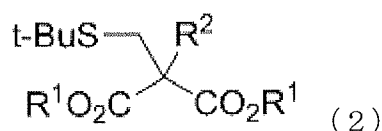
工程 (x) *t e r t*-ブチルチオクロロメタンを塩基の存在下、一般式 (8)
[化36]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物と作用させ、前記一般式(2)で表される化合物を得る工程；

を含むことを特徴とする一般式(2)

[化37]



(式中、 R^1 は前記一般式(8)の R^1 と同義であり、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物の製造方法。

発明の効果

[0012] 本発明の製造方法によれば、 α -置換システイン又はその塩を、入手容易であり安価な原料によって、簡便かつ短時間で安全に製造でき、工業的規模において安定して生産することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明の製造方法の一実施態様を示す図である。

[図2] 2-(*t e r t*-ブチルチオ)メチル-2-メチルマロン酸ジエチルに、バチルス・サチルス (*B a c i l l u s s u b t i l i s*) I F O 3 1 0 8 株由来の酵素を作用させて、得られた反応生成物の光学純度を H P L C により分析した結果である (実施例 1 2)。上段がバチルス・サチルス (*B a c i l l u s s u b t i l i s*) I F O 3 1 0 8 株由来の酵素を作用さ

せた結果であり、下段は、対照実験として、ラセミ体標品の光学純度を分析した結果である。

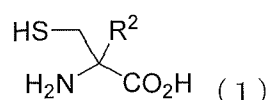
発明を実施するための形態

[0014] [一般式 (1) で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法]

本発明の下記一般式 (1) で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法は、(i) の工程の後に、(ii)、(iii)、及び(iv) の工程を有することを特徴とする。本発明の製造方法は、(i) の工程の前に、(xi) の工程、又は(viii)、(xi)、及び(x) の工程を有するものであることが好ましい。また、本発明の製造方法は、(iv) の工程の後に(v) の工程、特に好ましくは(vi-1)、(vi-2)、及び(vii) の工程を有することが好ましい。

一般式 (1)

[化38]



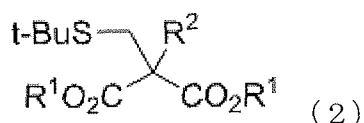
(式中、 R^2 は炭素数 1 ~ 4 のアルキル基を表す。)

[0015] <工程 (i)>

まず、(i) の工程について説明する。

(i) の工程は、一般式 (2)

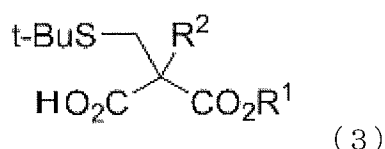
[化39]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数 1 ~ 10 のアルキル基、置換されていてもよい炭素数 7 ~ 20 のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数 6 ~ 12 のアリール基を表し、 R^2 は炭素数 1 ~ 4 のアルキル基を表す。) で表される化合物に塩基、酸、又は、エステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処

理物、及び／若しくは該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液（以下、「エステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／若しくは該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液」のことを「本発明の酵素等」と称する場合がある。）を作用させて、一般式（３）

[化40]



（式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式（２）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物を得る工程である。

[0016] 一般式（２）で表される化合物は、非特許文献２の通り、*tert*-ブチルチオクロロメタンとメチルマロン酸ジアルキルを塩基存在下に反応させて製造することができる。*tert*-ブチルチオクロロメタンの製造方法についても、ジクロロメタン中、*tert*-ブチルメルカプタン、パラホルムアルデヒド及び塩化水素を反応させる方法が同文献に記載されている。しかし、非特許文献３によれば、ホルムアルデヒドと塩化水素とが接触すると発がん性が極めて高いビスクロロメチルエーテルが発生する可能性があるため、この製造方法は、作業者の健康上好ましくない。

[0017] よって、一般式（２）で表される化合物の製法としては、ホルムアルデヒドと塩化水素を接触させずに*tert*-ブチルチオクロロメタンを製造する工程（viii）～（x）、もしくは*tert*-ブチルチオクロロメタンを使用しない工程（xi）を有する製造方法が好ましい。工程（viii）～（xi）については後述する。

[0018] 一般式（２）で表される化合物において、 R^1 のうち「置換されていてもよい炭素数１～１０のアルキル基」のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基、ノルマルプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ノルマルペンチル基

、イソペンチル基、tert-ペンチル基、ネオペンチル基、ノルマルヘキシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等の炭素数1～10の直鎖状若しくは分岐状若しくは環状のアルキル基等が挙げられる。当該アルキル基が有していてもよい置換基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数1～6のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アルキル基に置換基が2個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0019] 一般式(2)で表される化合物において、R¹のうち「置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基」のアラルキル基としては、例えば、ベンジル基、2-フェニルエチル基、1-フェニルエチル基、1-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、3-フェニルプロピル基等が挙げられる。当該アラルキル基が有していてもよい置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基等の炭素数1～6のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数1～6のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アラルキル基に置換基が2個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0020] 一般式(2)で表される化合物において、R¹のうち「置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基」のアリール基としては、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等が挙げられる。当該アリール基が有していてもよい置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基等の炭素数1～6のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数1～6のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アリール基に置換基が2個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0021] 上述した中でも、R¹としては、メチル基、エチル基、イソプロピル基、ノ

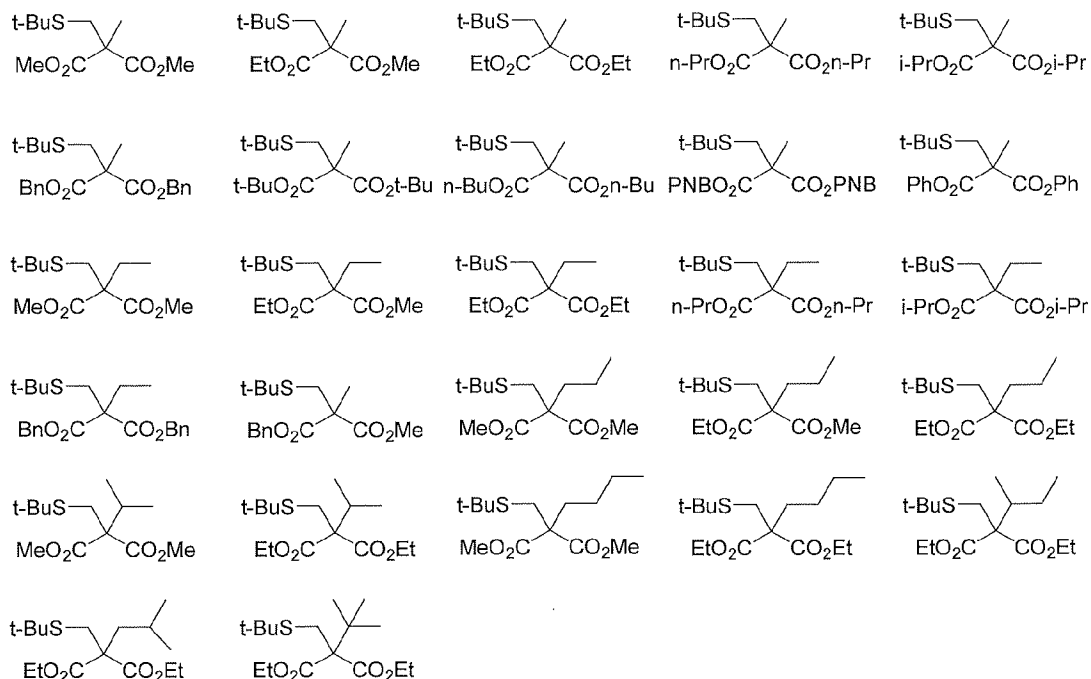
ルマルプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ノルマルペンチル基、イソペンチル基、*tert*-ペンチル基、ネオペンチル基、ノルマルヘキシル基等の炭素数1～10の無置換の直鎖状若しくは分岐状のアルキル基が入手の容易さから好ましく、メチル基、エチル基、イソプロピル基、ノルマルプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等の炭素数1～4の無置換の直鎖状若しくは分岐状のアルキル基が安価であることからより好ましく、メチル基、エチル基、ノルマルプロピル基、ノルマルブチル基等の炭素数1～4の無置換の直鎖状のアルキル基が酸や塩基、酵素との反応性が高いことからさらに好ましい。特に(i)の工程において酵素を用いる場合は、 R^1 が小さい構造の方が酵素の反応サイトに取り込まれやすく、反応速度がさらに上がることから、メチル基、又はエチル基が最も好ましい。

[0022] また、一般式(2)で表される化合物において、二つの R^1 は必ずしも同一である必要は無く、それぞれ異なってもよい。 R^1 が異なる場合、前記一般式(2)で表される化合物にはR体、S体の二つのエナンチオマーが存在するが、その混合比についても特に制限はない。

[0023] 一般式(2)で表される化合物において、 R^2 、即ち、炭素数1～4のアルキル基は、目的とする前記一般式(1)で表される化合物の R^2 と同一である必要がある。 R^2 としては、例えばメチル基、エチル基、ノルマルプロピル基、イソプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等が挙げられる。製造し易さの点ではメチル基、エチル基、ノルマルプロピル基、ノルマルブチル基等の炭素数1～4の無置換かつ直鎖状のアルキル基がより好ましい。特に、本発明の酵素等を用いる場合は、 R^2 が小さい構造の方が酵素の反応サイトに取り込まれやすく、反応速度がさらに上がることから、メチル基、又はエチル基がさらに好ましい。また、後述する一般式(1)で表される α -置換システイン又はその塩のうち、鉄過剰症治療薬の中間体として有用な α -メチルーD-システインを製造する場合は、 R^2 はメチル基でなければならない。

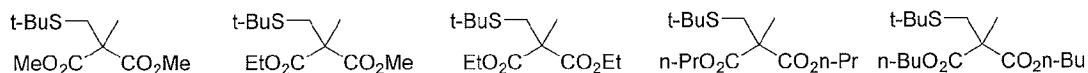
[0024] 一般式（２）で表される化合物としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化41]



上述した化合物の中でも、一般式（２）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化42]

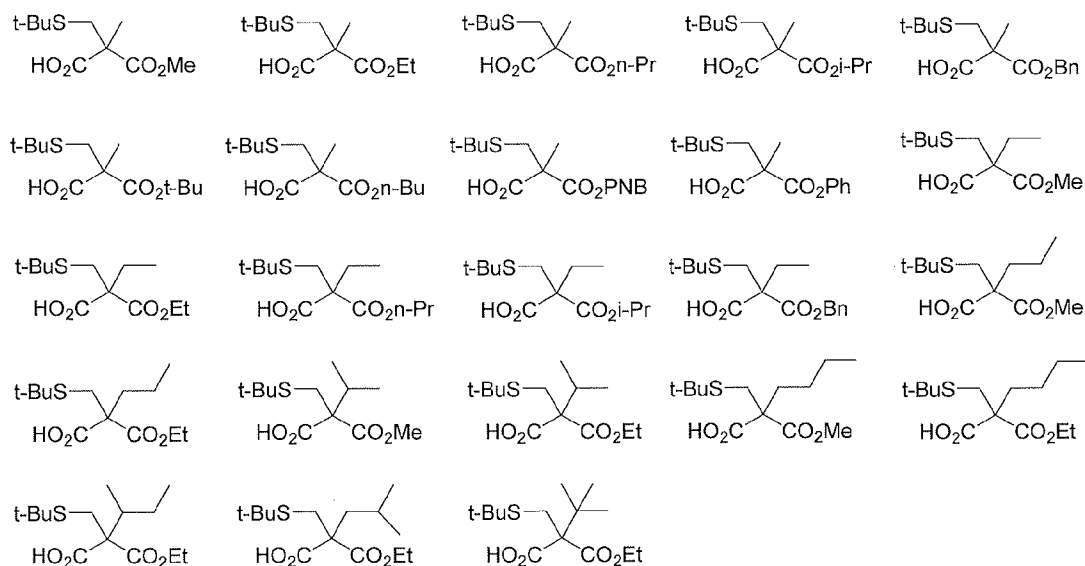


[0025] 一般式（２）で表される化合物に、塩基、酸、又は、エステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／若しくは該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させて加水分解することにより、一般式（３）で表される化合物を得ることができる。

[0026] 一般式（３）で表される化合物において、 R^1 及び R^2 は上述の一般式（２）の R^1 及び R^2 と同義である。

[0027]

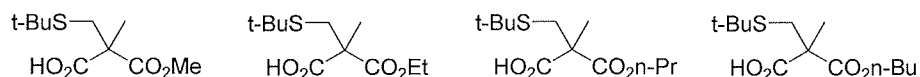
[化43]



一般式（３）で表される化合物としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

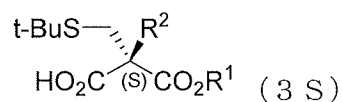
上述した化合物の中でも、一般式（３）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化44]



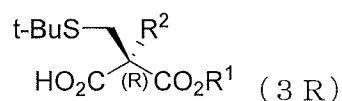
[0028] また、一般式 (3) で表される化合物は、一般式 (3 S)

[化45]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(3)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表されるS体化合物、もしくは一般式(3R)

[化46]

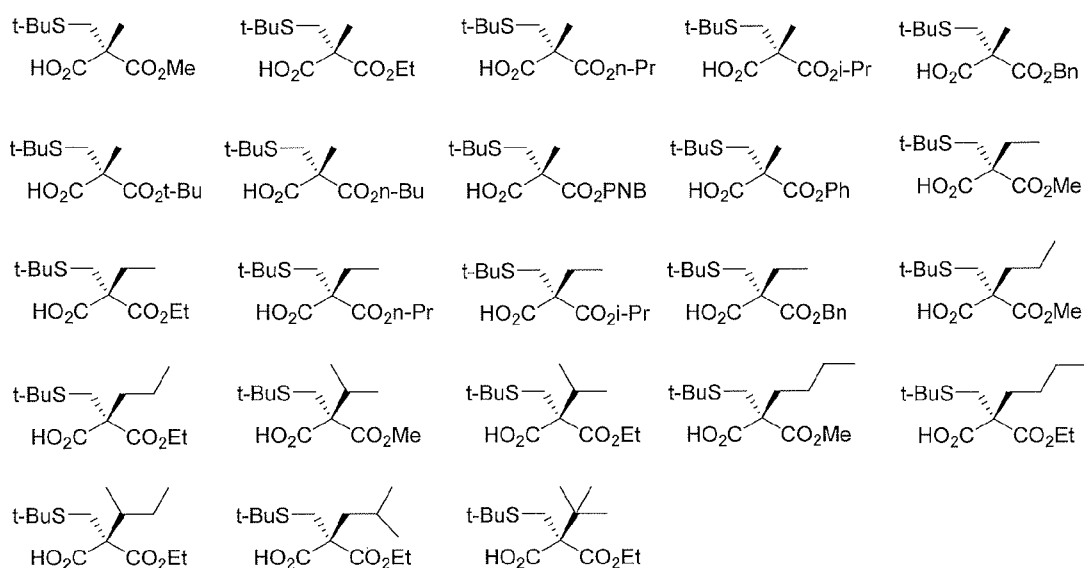


(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(3)の R^1 及び R^2 と同義である。)で

表される R 体化合物のうちどちらか一方が選択的に含まれるキラル化合物であってもよく、重量比が 1 : 1 のラセミ化合物であっても構わない。このうち S 体は、後述の工程 (i i)、(i i i)、及び (i v) によって、一般式 (1) で表される α -置換システイン又はその塩のうち、医薬品等の中間体として特に有用な α -置換-D-システイン又はその塩へと変換できることから、S 体化合物であることが好ましい。

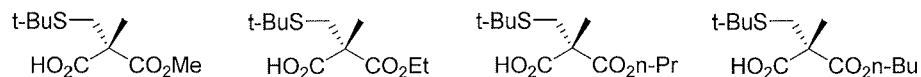
[0029] 前記一般式 (3 S) で表される化合物としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化47]



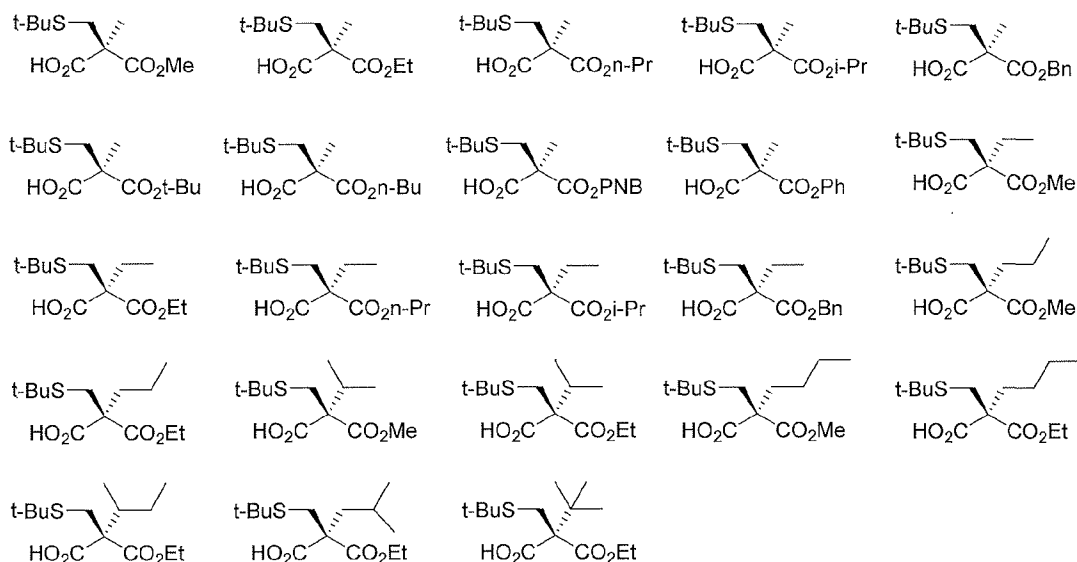
上述した化合物の中でも、一般式 (3 S) で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化48]



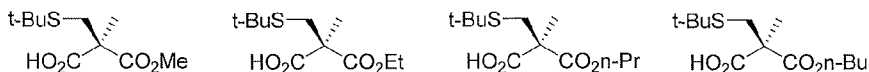
[0030] 前記一般式 (3 R) で表される化合物としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化49]



上述した化合物の中でも、一般式（3 R）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化50]



[0031] (i) の工程では、前記一般式（2）で表される化合物に、塩基、酸、又は、本発明の酵素等を作用させる。以下、それぞれの場合について詳細を説明する。

（塩基を作用させる場合）

塩基を作用させて加水分解する場合、当該塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物や、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属炭酸塩が挙げられる。これらの塩基はそれぞれ単独で用いてもよいし、2種以上混合して用いてもよい。

[0032] 前記塩基の使用量は、例えば、一般式（2）で表される化合物に対して0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜設定可能である。収率及びコストの点で、0.9モル当量～2モル当量が好ましく、一般式（3）で表される化合物のエステル基がさらに加水分解を受けるのを防ぐため0.9モル当量

～1. 2モル当量がさらに好ましい。

[0033] 塩基を作用させる場合、反応温度は、例えば、 -50°C ～ 80°C の範囲から適宜選択可能である。容易に温度制御を行い、副反応を抑制するためには 0°C ～ 40°C の範囲とすることが好ましい。

[0034] 塩基を作用させる場合、反応時間としては、例えば、0.5時間～50時間の範囲で適宜選択可能であり、2時間～10時間の範囲とすることが好ましい。

[0035] 塩基を作用させる場合、反応溶媒としては、通常、水のみ、もしくは水と有機溶媒との混合溶媒が用いられる。ここで、有機溶媒としては、グリセロール、エチレングリコール、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、*t*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルー*t*-ブチルエーテル、エチルー*t*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタン等の脂肪族炭化水素、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。

中でも、反応速度を上げるためには、アルカリ金属水酸化物やアルカリ金属炭酸塩に対して溶解度の高い水と、一般式(2)で表される化合物に対して溶解度が高く、さらに水とも良く混和する水溶性溶媒を用いて反応混合物を均一にするのが好ましい。水溶性溶媒としてはグリセロール、エチレングリコール、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、*t*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン等のケトン類、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、

アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。中でも、溶媒留去のし易さの観点から、沸点の低いメタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフランがより好ましい。

なお、本発明の（i）の工程においては、酸よりも塩基を作用させた方が、一般式（2）に含まれるエステル基が、一方だけでなく両方とも加水分解される副反応を抑制することができ、一般式（3）で表される化合物が高収率で得られるため好ましい。

[0036] （酸を作用させる場合）

一般式（2）で表される化合物に酸を作用させて加水分解する場合、当該酸としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸（p-トルエンスルホン酸は、一水和物であることが好ましい。以下、同様である。）等の有機酸等が挙げられる。これらの酸はそれぞれ単独で用いてもよいし、2種以上混合して用いてもよい。

[0037] 酸の使用量は、例えば、一般式（2）で表される化合物に対して0.1モル当量～20モル当量の範囲で適宜設定可能である。収率及びコストの点で、1.0モル当量～10モル当量が好ましい。

[0038] 酸を作用させる場合、反応温度は、例えば、0℃～200℃の範囲から適宜選択可能である。反応時間を短縮し、かつ温度制御を容易にするには30℃～100℃の範囲とすることが好ましい。

[0039] 酸を作用させる場合、反応時間としては、例えば、0.5時間～50時間の範囲で適宜選択可能であり、2時間～20時間の範囲とすることが好ましい。

[0040] 酸を作用させる場合、反応溶媒としては、通常、水のみ、もしくは水と有機溶媒との混合溶媒が用いられる。ここで、有機溶媒としては、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ジエチルエーテル、

ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルー t -ブチルエーテル、エチルー t -ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、 n -ヘキサン、 n -ヘプタン等の脂肪族炭化水素、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。

中でも、酸に対する安定性の観点から、 n -ヘキサン、 n -ヘプタン等の脂肪族炭化水素、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。

[0041] (本発明の酵素等を作用させる場合)

また、一般式(2)で表される化合物に、本発明の酵素等、即ち、エステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／又は該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させることによって、一般式(3)で表される化合物を得ることができる。

特に、一般式(3)のうち、一般式(3S)もしくは(3R)のどちらか一方を選択的に含むキラル化合物を得ることを目的とする場合には、立体選択性が高いことから、上述の酸や塩基を作用させるよりも本発明の酵素等を作用させることが好ましい。

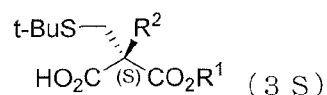
[0042] 本発明の製造方法において用いることのできる、エステル基を加水分解する活性を有する酵素は、当該活性を有する限り特に制限されないが、例えば

、(A) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18 に記載のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。これらはバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来のカルボキシエステラーゼ NP である。

[0043] また、本発明においては、これらのホモログであって、かつ、前記の酵素活性を有するものを用いてもよい。ホモログとしては、例えば、以下の (B)、(C) が挙げられる。

(B) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16 若しくは 18 のアミノ酸配列と 35% 以上の同一性を有し、かつ、前記一般式 (2) で表される化合物を加水分解し、前記一般式 (3) で表される化合物のうち立体配置が S 体である一般式 (3 S)

[化51]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式 (3) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16 若しくは 18 で表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式 (2) で表される化合物を加水分解し、前記一般式 (3) で表される化合物のうち立体配置が S 体である一般式 (3 S) で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質。

[0044] ここで、前記 (B) のタンパク質は、エステル基を加水分解する活性を有していれば、配列番号 4、6、8、10、12、14、16 又は 18 に示されるアミノ酸配列と 35% 以上、好ましくは 50% 以上、より好ましくは 80% 以上、特に好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% 以上の同一性を有すればよい。なお、前記タンパク質の同一性検索は、例えば、GenBank や DNA Databank of JAPAN (DDBJ) を対象

に、FASTAやBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 等のプログラムを用いて行うことができる。

また、前記 (C) のタンパク質は、前記エステル基を加水分解する活性を害さない範囲内において、配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18に記載のアミノ酸配列に一個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものを挙げることができる。ここで数個とは、具体的には20個以下、好ましくは10個以下、より好ましくは5個以下である。

[0045] 本発明で用いるエステル基を加水分解する活性を有する酵素は、該酵素の一部又は全部をコードする遺伝子の塩基配列を元にして作製したプローブを用いて、該酵素活性を有する任意の微生物から該酵素をコードするDNAを単離した後、該DNAで大腸菌等の宿主生物の形質転換を行ない、該酵素を宿主生物で発現させることによって得ることができる。

また、本発明で用いるエステル基を加水分解する活性を有する酵素は、該酵素活性を有する微生物、例えば、バチルス (Bacillus) 属細菌の菌体から精製することによって得ることもできる。

[0046] バチルス属細菌としては、例えば、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・サチルス (Bacillus subtilis)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) 等が挙げられる。これらの菌株は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構から入手可能である。あるいはATCC (American Type Culture Collection) のオンラインカタログ (<http://www.atcc.org/>) に記載されている菌株については、該ATCCから入手できる。

[0047] 本発明の製造方法においては、一般式 (2) で表される化合物に、前記酵素を作用させてもよいが、該酵素に代えて、あるいは、該酵素に加えて、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／又は該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させてもよい。該酵素を生産する

能力を有する細胞としては、該酵素をコードするDNAで形質転換された細胞が好ましい。細胞としては、微生物（宿主生物）や培養細胞等を用いることができるが、その生死は問わず、例えば、休止菌体等も好適に用いることができる。

また、該細胞の処理物としては、例えば、該細胞をアセトン、ジメチルスルホキシド（DMSO）、トルエン等の有機溶媒や界面活性剤により処理したもの、凍結乾燥処理したもの、物理的又は酵素的に破碎したもの等の細胞調製物、細胞中の酵素画分を粗精製物あるいは精製物として取り出したもの、さらには、これらをポリアクリルアミドゲル、カラギーナンゲル等に代表される担体に固定化したもの等を用いることができる。

また、該細胞を培養して得られた培養液としては、前記細胞を培養して得られた培養液、すなわち、該酵素を含む培養液を、直接用いてもよく、例えば、該細胞と液体培地の懸濁液や、該細胞が分泌発現型細胞である場合は該細胞を遠心分離等で除去した上清やその濃縮物も用いることができる。

[0048] ここで、形質転換等に用いる該酵素をコードするDNAとしては、例えば、配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。あるいは、配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18のアミノ酸配列と35%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式（2）で表される化合物を前記一般式（3）で表される化合物に変換する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18に示されるアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAとしては、それぞれ、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列を有するDNAが挙げられる。エステル基を加水分解する活性を有するタンパク質をコードしていれば、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列のホモ

ログであってもよい。すなわち、該酵素をコードするDNAとしては、以下に示すものが挙げられる。

(D) 配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列を有するDNA。

(E) 配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列において1又は数個の塩基が置換、欠失もしくは付加された塩基配列を含み、かつ、前記一般式(2)で表される化合物を前記一般式(3)で表される化合物に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(F) 配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17に記載の塩基配列を有するDNA、又はその相補鎖とストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列を含み、かつ、前記一般式(2)で表される化合物を前記一般式(3)で表される化合物に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

なお、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列は、cDNAの配列である。

[0049] 前記(E)のDNAにおいて、数個とは、具体的には60個以下、好ましくは30個以下、より好ましくは10個以下、最も好ましくは5個以下である。

[0050] 前記(F)のDNAにおいて、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、プローブDNAを用いて、ストリンジентな条件下で、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を行うことにより得られるDNAを意味する。「ストリンジентな条件」としては、例えば、コロニーハイブリダイゼーション法及びプラークハイブリダイゼーション法においては、コロニーあるいはプラーク由来のDNA又は該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、 $0.7\text{ mol/L} \sim 1.0\text{ mol/L}$ の塩化ナトリウム存在下 65°C でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ 溶液($1 \times \text{SSC}$ の組成は、 150 mmol/L 塩化ナトリ

ウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウム) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄する条件を挙げることができる。

[0051] エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAは、例えば、以下のような方法によって単離することができる。まず、エステル基を加水分解する活性を有する酵素を前記の方法等により微生物菌体等から精製した後、N末端アミノ酸配列を解析する。N末端アミノ酸配列解析は、リジルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ等の酵素により精製タンパク質を切断し、逆相液体クロマトグラフィーなどによりペプチド断片を精製した後、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を解析して複数のアミノ酸配列を決めることにより行う。決定したアミノ酸配列を元に設計したプライマーを用い、該酵素を生産する微生物株の染色体DNAもしくはcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことにより、該酵素をコードするDNAの一部(DNA断片)を得ることができる。さらに、該酵素を生産する微生物株の染色体DNAの制限酵素消化物をファージ、プラスミドなどに導入し、大腸菌を形質転換して得られたライブラリーやcDNAライブラリーから、前記のDNA断片をプローブに用いてコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションなどを行うことにより、エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAを得ることができる。

[0052] また、前記のPCRにより得られたDNA断片の塩基配列を解析し、得られた配列から、配列が決定された領域の外側に伸長させるためのPCRプライマーを設計し、該酵素を生産する微生物株の染色体DNAを適当な制限酵素で消化後、自己環化反応により環化させたDNAを鋳型として*inverse PCR* (Genetics vol. 120, p621-623 (1988)) を行うことにより、該酵素をコードするDNAを得ることも可能である。ここで、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列を有するDNAは、それぞれ、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いたPCRによって得ることができる。

[0053] なお、該酵素をコードするDNAは、配列番号3、5、7、9、11、1

3、15又は17の塩基配列を有するDNAを化学合成することによって得ることもできる。

[0054] 当業者であれば、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17に記載のDNAに部位特異的変異導入法 (Adv. Biochem. Eng. vol. 43, p75-102 (1990)、Yeast vol. , Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、PCR: A Practical Approach, IRL Press, p200 (1991)) 等を用いて適宜置換、欠失、挿入及び／又は付加変異を導入することにより、本発明の製造法に用いることのできるエステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAを得ることが可能である。

[0055] また、配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18のアミノ酸配列の全部又はその一部や、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列の全部又は一部を元に、例えばGenBankやDDBJ等のデータベースに対してホモロジー検索を行って、エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAホモログの塩基配列情報を手に入れることも可能である。当業者であれば、この塩基配列情報を元に菌株からのPCR等により該酵素をコードするDNAを手に入れることが可能である。

[0056] さらに、エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAは、配列番号3、5、7、9、11、13、15又は17の塩基配列の全部又は一部を有するDNAをプローブに用いて、該酵素活性を有する任意の微生物から調製したDNAに対し、コロニーハイブリダイゼーション法、プレークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等によりストリンジেন্টな条件下でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするDNAを得ることによっても取得できる。ここで、「一部」とは、プローブとして用いるのに十分な長さのDNAのことであり、具体的には15bp以上、好ましくは50bp以上、より好ましくは100bp以上のものである。

[0057] 各ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 3rd

d E d t. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)) 中のC h a p t e r 1 等に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0058] 前記のようにして単離された、エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAを公知の発現ベクターに発現可能に挿入することにより、エステル基を加水分解する活性を有する酵素の発現ベクターが提供される。この発現ベクターで形質転換した細胞を培養することにより、該酵素を該細胞から得ることができる。形質転換細胞は、公知の宿主細胞の染色体DNAにエステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAを発現可能な状態で組み込むことによっても得ることができる。

[0059] 形質転換細胞の作製方法としては、具体的には、微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中に、エステル基を加水分解する活性を有する酵素をコードするDNAを組み込み、構築された発現ベクターを該微生物中に導入するか、もしくは、直接、宿主生物のゲノム中に該酵素をコードするDNAを導入し、その遺伝情報を転写及び翻訳させる必要がある。

[0060] このとき、該酵素をコードするDNAが宿主微生物中で発現可能なプロモーターを含んでいない場合には、適当なプロモーターを該酵素がコードされるDNA鎖の5'側上流に組み込む必要がある。さらに、ターミネーターを3'側下流に組み込むことが好ましい。このプロモーター及びターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター及びターミネーターであれば特に限定されず、これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター及びターミネーターに関しては、例えば「微生物学基礎講座8・遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては、Adv. Biochem. Eng. vol. 43, p75-102 (1990)、Yeast vol. 8, p423-488 (1992) などに詳細に記述されている。

[0061] 本発明のエステル基を加水分解する活性を有する酵素を発現させるための形質転換の対象となる宿主生物としては、宿主生物自体が本反応に悪影響を与えない限り特に限定されることはなく、具体的には、例えば、以下に示す

ような微生物を挙げることができる。

- [0062] エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されている細菌。
- [0063] ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されている放線菌。
- [0064] サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されている酵母。
- [0065] ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されているカビ。
- [0066] 中でも、好ましい宿主微生物としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属であり、特に好ましくは、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属である。

- [0067] 形質転換細胞作製のための手順、宿主生物に適合した組換えベクターの構築及び宿主の培養方法は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる（例えば、Molecular Cloning 3rd Edt. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)、参照）。
- [0068] また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が確立されており、特に昆虫（蚕など）等の動物細胞中（Nature vol. 315, p592-594 (1985)）や菜種、トウモロコシ、ジャガイモ等の植物細胞中に大量に異種タンパク質を発現させる系、及び大腸菌無細胞抽出液や小麦胚芽等の無細胞タンパク質合成系を用いた系が確立されており、好適に利用できる。
- [0069] また、エステル基を加水分解する活性を有する酵素としては、具体的には、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）由来プロテアーゼ（シグマアルドリッチ社製）、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）由来カルボキシエステラーゼNP（配列番号4、6、8、10、12、14、16又は18）、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）由来エステラーゼBS1（ユーリッヒファインケミカルズ社製）、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）由来エステラーゼBS3（ユーリッヒファインケミカルズ社製）、ブタ肝臓由来エステラーゼ（シグマアルドリッチ社製）等を使用することができ、目的により適宜選択可能である。
- [0070] 中でも、一般式（3S）で表されるS体化合物を選択的に含むキラル化合物を得ることを目的とする場合の酵素としては、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）由来プロテアーゼ（シグマアルドリッチ社製）や、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）由来カルボキシエステラーゼNPが好ましい。
- [0071] この時、得られる一般式（3S）で表される化合物の光学純度は一般的に90.0%e.e.以上であるが、医薬品又はその中間体として製造する場

合、一般的に高い光学純度が求められることから、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく、99.5% e. e. 以上が特に好ましく、99.8% e. e. 以上が最も好ましい。

[0072] また、一般式(3R)で表されるR体化合物を選択的に含むキラル化合物を得ることを目的とする場合の酵素としては、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来エステラーゼBS1(ユーリッヒファインケミカルズ社製)、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来エステラーゼBS3(ユーリッヒファインケミカルズ社製)、ブタ肝臓由来エステラーゼ(シグマアルドリッチ社製)を使用することが好ましく、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来エステラーゼBS1(ユーリッヒファインケミカルズ社製)、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来エステラーゼBS3(ユーリッヒファインケミカルズ社製)等が好ましい。

[0073] この時、得られる一般式(3R)で表される化合物の光学純度は一般的に90.0% e. e. 以上であるが、医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく、99.5% e. e. 以上が特に好ましく、99.8% e. e. 以上が最も好ましい。

[0074] 酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／又は該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させて加水分解を実施する場合、通常、水系溶媒中で実施されるが、少なくとも1種の有機溶媒の存在下で実施することも可能である。

有機溶媒を使用する場合、例えば、グリセロール、エチレングリコール、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル

、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、エチルtert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン等の脂肪族炭化水素、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等を使用することができる。酵素の有機溶媒耐性の観点から、有機溶媒を使用せず、水のみを用いることが好ましい。

[0075] 反応温度は、例えば、0℃～80℃の範囲から選択でき、酵素の熱安定性の観点から、20℃～50℃が好ましい。

[0076] 反応時間としては、例えば、1時間～120時間の範囲で適宜選択可能であるが、反応時間を長くすることにより一般式(3)で表される化合物のエステル基が加水分解を受けて収率が低下する傾向にあることから2時間～40時間が好ましい。

[0077] 反応に適したpHは、使用する酵素等により適宜選択でき、例えば、pH2.0～pH12.0が挙げられ、中でも、pH6.0～pH11.0が好ましく、pH7.0～pH9.0がより好ましい。これは、酵素が関与しない加水分解を防ぐためであるが、酵素が関与しない加水分解においては、目的の反応の後に一般式(3)で表される化合物のエステル基が加水分解を受けて収率が低下したり、一般式(3S)で表される化合物を得る反応において意図せず一般式(3R)で表される化合物が生成したり、又は一般式(3R)で表される化合物を得る反応において意図せず一般式(3S)で表される化合物が生成したりして純度が低下する原因となるため、これらの現象を抑制することができるpHで実施するのが好ましい。

本発明の酵素等を作用させる場合においても、pHを好ましい範囲に調整

するために、酸又は塩基を添加することことができる。

[0078] (後処理)

反応後の後処理としては、必要に応じて、例えば、微生物の不活化、遠心分離、凝集剤処理、ろ過、抽出、濃縮、カラム等の精製等を行ってもよい。抽出を行う場合は、反応液に酸を加えて一般式(3)をカルボン酸として遊離させた後、非水溶性の有機溶媒を用いて抽出すればよい。精製しなくても一般式(3)で表される化合物の純度が十分に高い場合は、精製は行わずに、ろ過、抽出、濃縮のみを行なうことが簡便であるため好ましい。抽出を行なう場合、次の工程で使用する反応溶媒で抽出し、ろ過と、抽出のみ行なうことがさらに好ましい。

[0079] 前記抽出に使用する非水溶性の有機溶媒としては、例えば、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類等が挙げられ、これらの混合溶媒を用いてもよい。

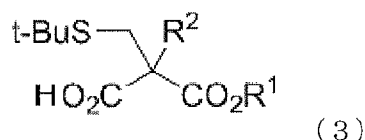
中でも、抽出効率の観点から、芳香族炭化水素類、エステル類が好ましく、ベンゼン、トルエン、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル又はこれらの混合溶媒を用いることがより好ましく、酸性での耐性が高く再利用可能であることから、トルエンを用いることがさらに好ましい。

[0080] <工程(i i)>

次に、(i i)の工程について説明する。

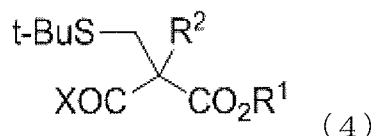
(i i)の工程は、一般式(3)

[化52]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させて、一般式(4)

[化53]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(3)の R^1 及び R^2 と同義である。 X は、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ 、又はハロゲン原子を表す。 R^3 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物を得る工程である。

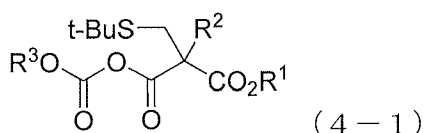
[0081] 前記一般式(3)及び(4)で表される化合物における、前記 R^1 及び R^2 については上述の工程(i)の記載と同様である。

[0082] 前記一般式(4)で表される化合物はラセミ化合物でもよく、キラル化合物でもよい。医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく、99.5% e. e. 以上が特に好ましく、99.8% e. e. 以上が最も好ましい。

[0083] 一般式(4)における X としては、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 基、 $-\text{OP}(\text{O})$

) (OEt)₂基、-OC(O)OR³基(R³は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)又はハロゲン原子を挙げることができる。中でも、Xが-OC(O)OR³である一般式(4-1)

[化54]



(式中、R¹、R²、及びR³は前記一般式(4)のR¹、R²、及びR³と同義である。)で表される化合物は、水に対する安定性が高く、後述の工程(i i)における取り扱いが容易になることから好ましい。

[0084] R³のうち、「置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基」のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基、ノルマルプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ノルマルペンチル基、イソペンチル基、tert-ペンチル基、ネオペンチル基、ノルマルヘキシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等の炭素数1～10の直鎖状若しくは分岐状若しくは環状のアルキル基等が挙げられる。当該アルキル基が有していてもよい置換基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数1～6のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アルキル基の置換基が2個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0085] R³のうち、「置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基」のアラルキル基としては、例えば、ベンジル基、2-フェニルエチル基、1-フェニルエチル基、1-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、3-フェニルプロピル基等が挙げられる。当該アラルキル基が有していてもよい

置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基等の炭素数 1～6 のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数 1～6 のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アラルキル基の置換基が 2 個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0086] R^3 のうち、「置換されていてもよい炭素数 6～12 のアリール基」のアリール基としては、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等が挙げられる。当該アリール基が有していてもよい置換基としては、例えば、メチル基、エチル基、イソプロピル基等の炭素数 1～6 のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数 1～6 のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、当該アリール基の置換基が 2 個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

[0087] 以下、一般式 (4) における X の種類ごとに、好ましい縮合剤又は酸ハロゲン化剤と、好ましい X の構造について説明する。

[0088] X が $-OP(O)(OPh)_2$ である前記一般式 (4) で表される化合物、すなわち、前記一般式 (4-1) で表される化合物を得たい場合は、縮合剤としてジフェニルリン酸アジドを使用すればよい。

X が $-OP(O)(OEt)_2$ である前記一般式 (4) で表される化合物を得たい場合は、縮合剤としてジエチルリン酸アジドを使用すればよい。

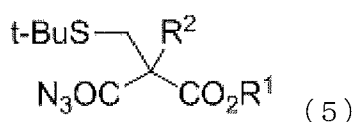
[0089] また、X が $-OC(O)OR^3$ である前記一般式 (4) で表される化合物を得たい場合は、縮合剤又は酸ハロゲン化剤としては $ClC(O)OR^3$ と表記されるクロロギ酸エステル類を使用すればよい。入手しやすいクロロギ酸エステルとしては、クロロギ酸メチル、クロロギ酸エチル、クロロギ酸ノルマルプロピル、クロロギ酸イソプロピル、クロロギ酸ノルマルブチル、クロロギ酸イソブチル、クロロギ酸 *tert*-ブチル等の炭素数が 1～6 の直鎖状もしくは分岐状のクロロギ酸エステル類、クロロギ酸フェニル、クロロギ酸

ベンジル等が好ましい。

Xが $-OC(O)OR^3$ である場合の R^3 としては、クロロギ酸エステルとして入手しやすいものであることが好ましいため、メチル基、エチル基、ノルマルプロピル基、イソプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基等の炭素数が1～6の直鎖状もしくは分岐状のアルキル基、フェニル基、又はベンジル基が好ましい。

[0090] また、 R^3 の構造は後述の工程(iii)にも影響を及ぼす。前記一般式(4-1)で表される化合物は混合酸無水物として、基質のマロン酸誘導体由来のカルボニル基と、縮合剤に由来するカルボニル基の2つを持っている。工程(iii)における反応では、まずアジドアニオンが求核攻撃することから始まるが、目的とするマロン酸誘導体由来のカルボニル基に選択的に求核攻撃が起こらない場合、一般式(5)

[化55]



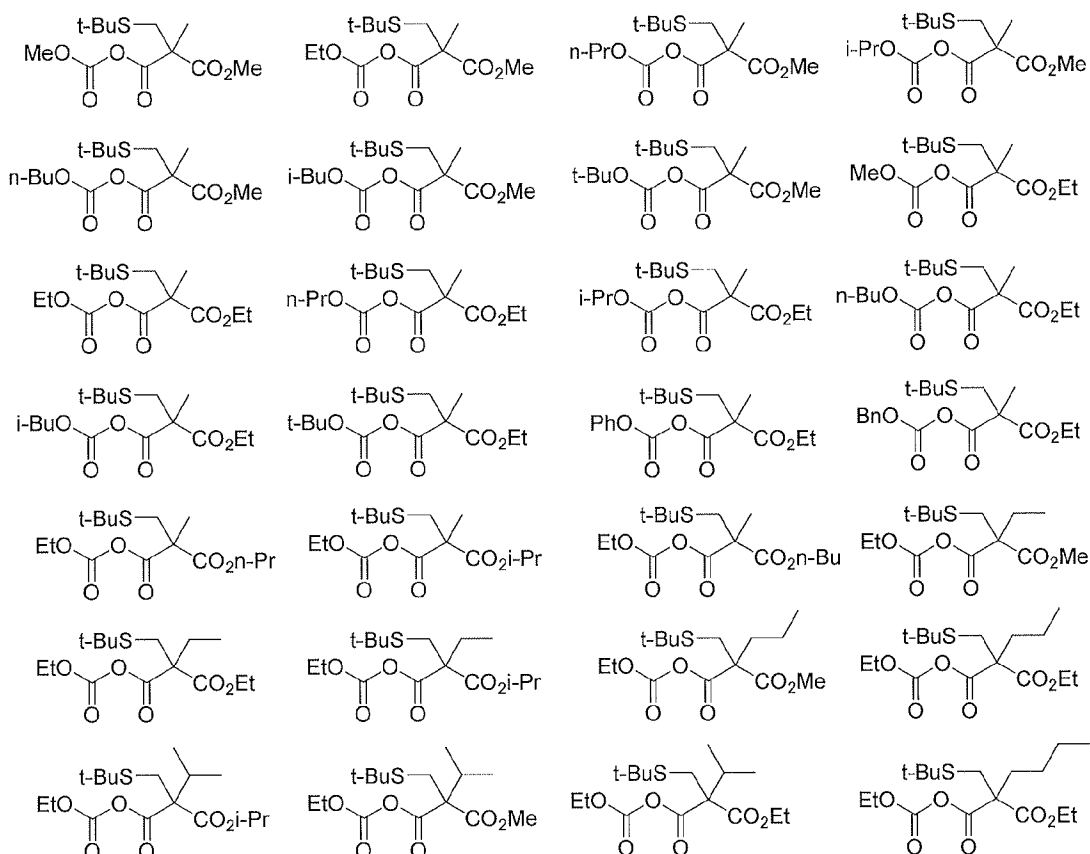
(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(4)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物の収率が低下する傾向にある。通常の場合、2つのカルボニル基の電子密度を考慮すれば、目的通りに求核攻撃が起こる。しかし、一般式(4-1)で表される化合物については2置換のマロン酸誘導体であるため、マロン酸誘導体由来のカルボニル基周辺の立体障害が大きく、一般式(4-1)で表される化合物における R^3 の構造が特に小さい場合に目的とする求核攻撃が選択的に起こりにくくなることがある。

よって、 R^3 としては、エチル基、ノルマルプロピル基、イソプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、フェニル基、又は、ベンジル基であることがより好ましい。これに対応するクロロギ酸エステルとしては、クロロギ酸エチル、クロロギ酸ノルマルプロピル、クロロギ酸イソプロピル、クロロギ酸ノルマルブチル、クロロギ酸イソブチル、クロロギ

酸 *tert*-ブチル、クロロギ酸フェニル、又はクロロギ酸ベンジルが好ましい。また、後述の工程 (iii) においては R^3OH で表記されるアルコールが副生するため、副生したアルコールを水洗もしくは濃縮により除去する必要があるが、このアルコールの除去し易さを考慮して、 R^3 としてはエチル基、又はイソプロピル基がさらに好ましい。これらに対応するクロロギ酸エステルとしてはクロロギ酸エチル、又はクロロギ酸イソプロピルが挙げられる。

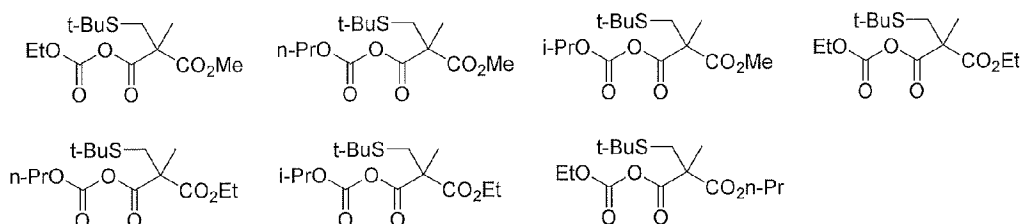
[0091] よって、前記一般式 (4-1) で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化56]



上述した化合物の中でも、一般式 (4-1) で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化57]



[0092] また、Xがハロゲン原子である前記一般式（4）で表される化合物を得たい場合は、（i i）の工程において酸ハロゲン化剤を使用すればよい。

ここで、ハロゲン原子としては、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、化合物の安定性の観点からは塩素原子が好ましい。

[0093] 酸ハロゲン化剤としては、例えば、塩化チオニル、塩化スルフリル、臭化チオニル、三塩化リン、五塩化リン、オキシ三塩化リン、三臭化リン、五臭化リン、オキシ三臭化リン、塩化オキサリル、臭化オキサリル、ホスゲン、トリホスゲン、シアヌル酸クロリド等が挙げられる。中でも、上述の通りXとしては塩素原子が好ましいことから、塩化チオニル、塩化スルフリル、三塩化リン、五塩化リン、オキシ三塩化リン、塩化オキサリル、ホスゲン、トリホスゲン、シアヌル酸クロリドが好ましく、毒性が低いことから塩化チオニル、塩化スルフリル、塩化オキサリルがさらに好ましい。

[0094] 以下、縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させる反応の条件は、一般式（4）におけるXの種類や、R³の構造等によって変わってくるので、適宜設定すればよいが、例えば、以下の反応条件で反応させることができる。

縮合剤又は酸ハロゲン化剤の使用量は、通常、一般式（3）で表される化合物に対して0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜設定できる。原料を完全に消失させて収率を向上させるためには1.0モル当量～5.0モル当量とすることが好ましく、また、精製負荷を減らす観点から1.0モル当量～1.5モル当量とすることがさらに好ましい。

[0095] 縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させる反応には、塩基を使用することができる。当該塩基としては、求核性を持たない塩基であれば特段の制限はないが、3級アミン類やピリジン類が好ましい。

3級アミン類としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリスプロピルアミン、トリプロピルアミン、トリスブチルアミン、N，N-ジメチルエチルアミン、N，N-ジメチルイソプロピルアミン、N-ブチルジメチルアミン、N，N-ジイソプロピルエチルアミン、N，N-ジメチルシクロヘキシルアミン、N-メチルモルホリン等が挙げられる。

ピリジン類としては、例えば、ピリジン、2-クロロピリジン、3-クロロピリジン、2-メチルピリジン、3-メチルピリジン、2，3-ルチジン、2，4-ルチジン、2，5-ルチジン、2，6-ルチジン、3，4-ルチジン、3，5-ルチジン等が挙げられる。

上述した中でも、3級アミン類が好ましい。前記一般式（4）で表される化合物が前記塩基で中和されて生成する塩が有機溶媒に溶解しやすく、反応を円滑に進行させる効果があるからである。3級アミン類の中でも、安価であることからトリエチルアミンがより好ましい。

[0096] 塩基の使用量としては、例えば、一般式（3）で表される化合物に対して0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜設定できる。原料を完全に消失させて収率を向上させるためには1.0モル当量～5.0モル当量とすることが好ましく、また、精製負荷を減らす観点から1.0モル当量～1.5モル当量がより好ましく、副生成物を抑制するためには縮合剤又は酸ハロゲン化剤と同じモル当量を用いることがさらに好ましい。

[0097] また、縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させる反応に使用する反応溶媒としては、例えば、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロ

ペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

中でも、アセトン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、プロピオニトリルは、前記一般式(4)で表される化合物が前記塩基で中和されて生成する塩の溶解度が高く反応効率が良いため好ましい。また、アセトン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、テトラヒドロフランは、安価で入手が容易な上、後処理をすることなく続く工程(iii)を実施しても悪影響を及ぼさないことからプロセス簡略化の観点でさらに好ましい。水やアルコール類の極性溶媒を用いると、縮合剤又は酸ハロゲン化剤や前記一般式(4)で表される化合物と反応し、収率が低下する傾向にある。

[0098] 反応溶媒の使用量は、例えば、前記一般式(3)で表される化合物に対して0倍体積量~100倍体積量の範囲で適宜設定可能であるが、発熱制御又は容積効率の観点から1倍体積量~20倍体積量が好ましく、攪拌効率の観点から、4倍体積量~10倍量がさらに好ましい。

[0099] 本工程では、前記一般式(3)で表される化合物と前記塩基と縮合剤又は酸ハロゲン化剤とを適宜混合して実施することができるが、収率の観点から、前記一般式(3)で表される化合物と塩基を先に混合することが好ましい。

[0100] 反応温度は、適宜設定可能であるが、例えば、-100℃~100℃の範囲で適宜を設定できる。温度制御を容易にするためには極低温条件は避けることが好ましく、また前記一般式(4)で表される化合物は高温での安定性が低いことから、-50℃~50℃が好ましく、-10℃~30℃がさらに

好ましい。

[0101] 反応時間は、例えば、5分間～10時間の範囲で適宜設定可能であるが、一般的には混合後すぐに反応が終了するため、5分間～5時間が好ましく、15分間～2時間がさらに好ましい。

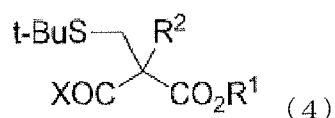
[0102] この反応の後処理としては、必要に応じて、析出した塩をろ過により除去したり、水と非水溶性有機溶媒を加えて溶媒抽出したり、溶媒抽出後に濃縮して溶媒を除去してもよい。また、純度が不十分である場合はカラム精製してもよいが、後処理や精製を実施しなくても後述の工程（iii）への悪影響は小さいため、プロセス簡略化の観点から、工程（ii）の反応液をそのまま工程（iii）に用いることが好ましい。

[0103] <工程（iii）>

次に、（iii）の工程について説明する。

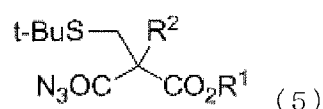
（iii）の工程は、一般式（4）

[化58]



（式中、R¹は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。Xは、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ 又はハロゲン原子を表す。R³は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。）で表される化合物にアジド化剤を作用させ、一般式（5）

[化59]



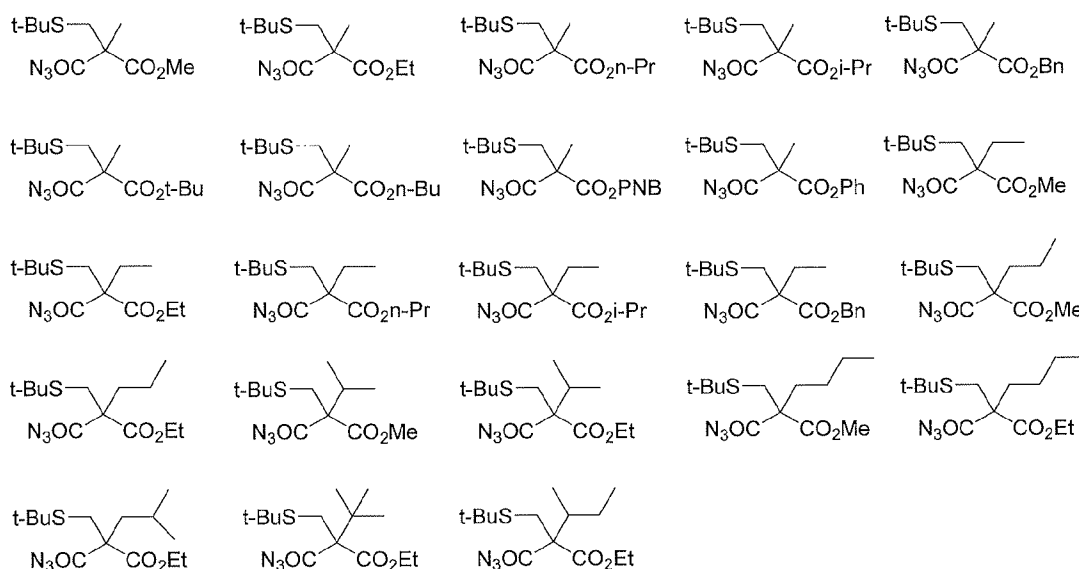
(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(4)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物を得る工程である。

[0104] 前記一般式(4)で表される化合物における前記 R^1 及び R^2 については、上述の工程(i i)の記載と同様である。

前記一般式(5)で表される化合物における前記 R^1 及び R^2 については上述の工程(i)および工程(i i)の記載と同様である。

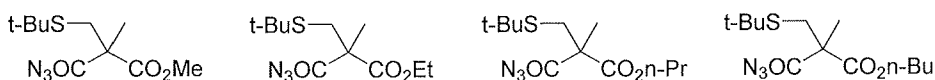
[0105] よって、一般式(5)で表される化合物の具体例としては、例えば、以下の化合物が挙げられる。

[化60]



上述した化合物の中でも、前記一般式(5)で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化61]



[0106] また、前記一般式(5)はラセミ化合物でもよく、キラル化合物でもよい。医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく

、99.5%e. e. 以上が特に好ましく、99.8%e. e. 以上が最も好ましい。

[0107] 前記アジド化剤としては、例えば、アジ化ナトリウム、アジ化カリウム、アジ化リチウム等のアジ化金属類や、アジ化トリメチルシリル等のアジ化トリアルキルシリル等が挙げられる。アジ化トリアルキルシリルは副生成物としてトリアルキルシラノールが発生し、一般式(5)で表される化合物との分離操作が必要となることがあるから、アジ化金属類が好ましい。中でも、入手が容易であることからアジ化ナトリウムがより好ましい。

[0108] アジド化剤の使用量は、例えば、一般式(4)で表される化合物に対して0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、収率及びコストの観点で、1.0モル当量～5.0モル当量が好ましく、1.0モル当量～2.0モル当量がさらに好ましい。

[0109] 反応溶媒としては、例えば、水、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

反応溶媒としてアルコール類を用いると、一般式(4)で表される化合物と反応し、収率が低下してしまうことがある。上述した中でも、アセトン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、テトラヒドロフラン

が、コスト及び入手容易性の観点から、また、前記 (i i) の工程と連続で実施できるためプロセス簡略化の観点から好ましい。

特に、アジド化剤としてアジド化金属類を用いる場合、これらの溶媒に水を加えると、アジド化金属類が水に溶解し、反応が効率的に進行するのでより好ましい。中でも、トルエンもしくはキシレンと、水の組み合わせでは、新たに溶媒を追加することなく後述する水洗及び抽出といった後処理操作ができるため、さらに好ましい。

[0110] アジド化剤としてアジド化金属類を用いる場合において、溶媒として水を使用するときは、反応の原料となる前記一般式 (4) で表される化合物は水による分解を起こしにくい化合物であることが好ましく、上述の X が $-O-C(=O)-OR^3$ である一般式 (4-1) で表される化合物を用いることがさらに好ましい。

[0111] 反応溶媒の使用量としては、例えば、一般式 (4) で表される化合物に対して 0 倍体積量～100 倍体積量の範囲で適宜設定可能であるが、発熱制御又は容積効率の観点から、1 倍体積量～20 倍体積量が好ましく、攪拌の容易性の観点から 5 倍体積量～10 倍体積量がさらに好ましい。

[0112] 反応温度は、例えば、 $-100^{\circ}C \sim 100^{\circ}C$ の範囲で適宜設定可能であるが、 $-30^{\circ}C \sim 50^{\circ}C$ が温度制御を容易にするために極低温条件は避けた方がよく、また、高温になるにつれて一般式 (5) で表される化合物が副反応を起こして収率が低下することがあるため、 $-10^{\circ}C \sim 20^{\circ}C$ がさらに好ましい。

[0113] 反応時間は、例えば、5 分間～100 時間の範囲で適宜設定可能であるが、低温においても一般式 (5) で表される化合物の保存安定性が高くないことから 1 時間～40 時間が好ましく、1 時間～10 時間がさらに好ましい。

[0114] この反応の後処理としては、必要に応じて、析出した塩をろ過や水洗により除去したり、水と非水溶性の有機溶媒を加えて抽出したりすることができる。特にアジド化剤を過剰に使用した場合、爆発性のあるアジド化剤を除去せずに次工程に進むと危険なことがあるため、充分にアジド化剤を反応系外

に除く操作として、水と非水溶性の溶媒を用いて水洗を実施することが好ましい。この時、トルエンやキシレンといった非水溶性の溶媒中で実施した工程 (i i) から溶媒を追加、又は置換することなく連続して工程 (i i i) を行くと、新たに非水溶性の溶媒を追加することなく、水洗することができるため、経済的でありさらに好ましい。一般式 (5) で表される化合物のような酸アジド化合物は一般的に爆発性があることから、溶媒を留去することは避けるべきである。

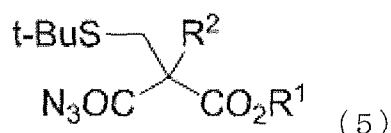
[0115] なお、非特許文献 1 では、前記工程 (i i) として、1, 2-ジクロロエタン中、塩基としてトリエチルアミンを用い、縮合剤としてジフェニルリン酸アジドを作用させている。つまり、非特許文献 1 では、一般式 (4) で表される化合物のうち X が $-OP(O)(OPh)_2$ である化合物を経由して、一般式 (5) で表される化合物が得られており、工程 (i i) と工程 (i i i) の工程を 1 段階で行なっている。これはジフェニルリン酸アジドの代わりにジエチルリン酸アジドを用いた場合も同様である。しかし、このような方法では、溶媒として毒性や環境負荷の面で問題のある 1, 2-ジクロロエタンを使用しており、工業的規模での実施には不向きである。よって、工業的規模で実施する場合は、本発明のように段階的に、ハロゲンを含まない溶媒を用いて、工程 (i i) でクロロギ酸エステル類を作用させることにより一般式 (4) で表される化合物を得て、続いて工程 (i i i) でアジド化金属類を作用させることが好ましい。また、ジフェニルリン酸アジド、ジエチルリン酸アジドと比べて、クロロギ酸アルキル類とアジド化金属類の組み合わせが安価であることから、コストの面でも好ましい。

[0116] <工程 (i v)>

次に、(i v) の工程を説明する。

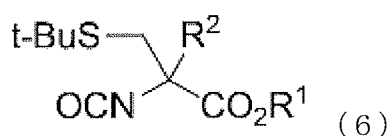
(i v) の工程は、クルチウス転位反応によって一般式 (5)

[化62]



(式中、 R^1 は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物のアジド基をイソシアネート基へと変換し、一般式(6)

[化63]

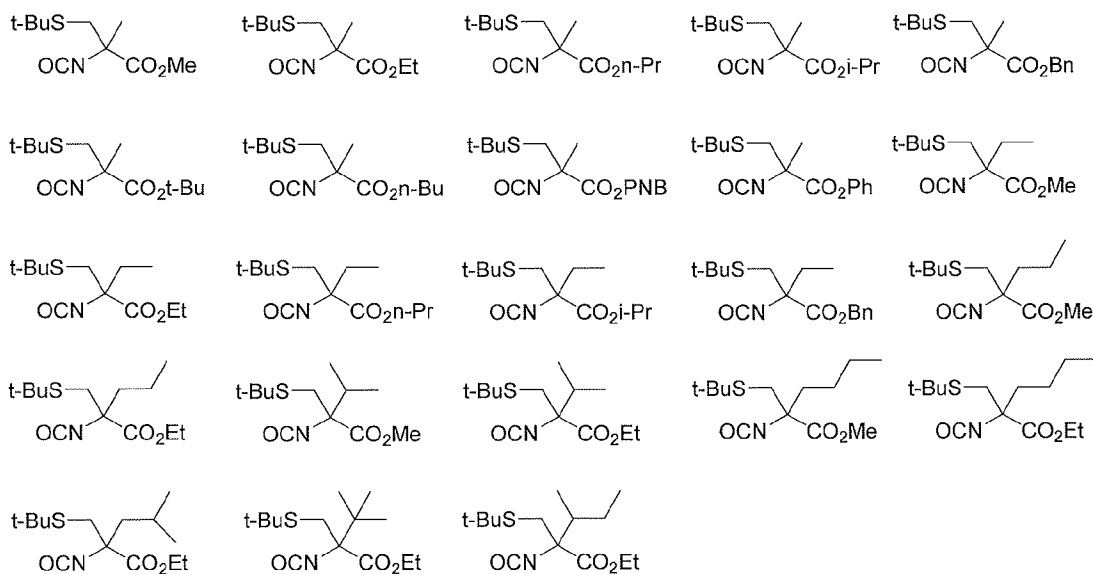


(式中、 R^1 、 R^2 は前記一般式(5)の R^1 、 R^2 と同義である。)で表される化合物を得ることを特徴とする、一般式(6)で表される化合物の製造方法である。

[0117] 前記一般式(5)及び(6)における R^1 、 R^2 については、上述の工程(i)の記載と同様である。

[0118] よって、一般式(6)で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

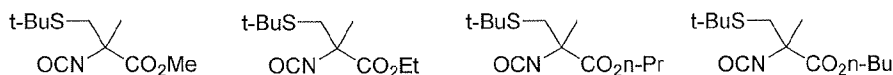
[化64]



上述した化合物の中でも、一般式(6)で表される化合物としては、以下

の化合物が好ましい。

[化65]



[0119] また、前記一般式（６）で表される化合物はラセミ化合物でもキラル化合物でもよい。医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、９５．０％*e. e.*以上が好ましく、９９．０％*e. e.*以上がさらに好ましく、９９．５％*e. e.*以上が特に好ましく、９９．８％*e. e.*以上が最も好ましい。

[0120] クルチウス転位は、酸アジド化合物である一般式（５）で表される化合物を加熱することによって、アジド基の窒素分子の脱離を伴いつつ、イソシアネート化合物へ変換させる反応であり、特段の反応剤を加えなくても反応を進行させることができる。

[0121] この工程に使用できる有機溶媒としては、例えば、アセトン、２－ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチル－*t e r t*－ブチルエーテル、エチル－*t e r t*－ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、１，２－ジメトキシエタン等のエーテル類、*N*，*N*－ジメチルホルムアミド、*N*，*N*－ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、１，２－ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

中でも、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロ

メチルベンゼンは、沸点が高いため、反応温度を高く設定して反応速度を上げることができ、工程時間の短縮に繋がるので好ましい。また、トルエン、キシレンは、前記工程（i i i）から続けて使うことが可能であるため、爆発性のある一般式（5）で表される化合物の濃縮及び溶媒置換を避けることができ、かつ経済的であるためさらに好ましい。水、アルコール類は、一般式（6）で表される化合物と反応し、ウレア構造を有する二量体やカーバメートを副生して収率が低下する可能性がある。

[0122] 有機溶媒の使用量は、例えば、一般式（5）で表される化合物に対して0倍体積量～100倍体積量の範囲で適宜設定することができるが、3倍体積量～30倍体積量が発熱制御又は容積効率の観点から好ましく、7倍体積量～15倍体積量がさらに好ましい。

[0123] 反応温度は、例えば、0℃～300℃の範囲で適宜設定可能であるが、反応時間を短縮でき、かつ一般式（6）で表される化合物の分解を防ぐという観点から40℃～150℃が好ましく、70℃～110℃がさらに好ましい。前記の反応温度よりも高い場合、生成した一般式（6）で表される化合物が分解して収率が下がる傾向がある。一方、前記の反応温度よりも低い場合には、一般式（5）で表される化合物がクルチウス転位を起こすことなく反応系内に溜まりこみ、その後の温度上昇によって一気に反応が進み、短時間で大量の窒素が発生してしまう可能性があるため、安全上の観点から、適宜、窒素の発生量をコントロールすることが好ましい。

なお、本工程では反応が進行するに連れて窒素が発生するため、特に工業スケールでの製造においては、安全上の観点から窒素の発生量をコントロールする必要がある。そのためには一般式（5）で表される化合物が即座にクルチウス転位を起こす温度まで加温した溶媒に、一般式（5）で表される化合物を滴下し、滴下量で窒素の発生量をコントロールするのが好ましい。

[0124] 反応時間は、前項に記載の安全面の観点から、一般式（5）で表される化合物を添加した後すぐに反応が完結するような温度設定にすることが理想的であるが、実際には反応を完結させるために一般式（5）で表される化合物

を添加後 0 時間～5 時間加熱を続けることが好ましく、0 時間～3 時間加熱を続けることがより好ましい。

[0125] この反応の後処理としては、必要に応じて、塩をろ過により除去したり、水を加えて溶媒抽出したり、濃縮して溶媒を除去したりしてもよい。純度次第ではカラム精製してもよいが、一般式 (6) で表される化合物は水分と反応しウレア構造を有する二量体を形成し易いため、後処理は実施しない方が好ましい。

[0126] なお、非特許文献 1 では、前記工程 (i i) の代わりに、1, 2-ジクロロエタン中、塩基としてトリエチルアミンを用い、縮合剤としてジフェニルリン酸アジドを作用させ、加熱している。このような方法では、一般式 (5) で表される化合物が得られるが、加熱下で実施しているので、実際には一般式 (5) で表される化合物は即座にクルチウス転位を起こし、一般式 (6) で表される化合物へと変換されてしまう。つまり、非特許文献 1 に記載の方法では、工程 (i i)、(i i i)、(i v) を一段階で得ることができ、これはジフェニルリン酸アジドの代わりにジエチルリン酸アジドを用いた場合も同様である。しかし、この方法ではリン酸ジフェニルやリン酸ジエチルが副生するため、これらの副生物を除くための操作が必要となる。非特許文献 1 ではフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製を実施しているが、この操作は工業的規模での生産にはふさわしくない。この精製に代わる手段として、水洗が考えられるが、一般式 (6) で表される化合物と水とを接触させると、上述の通り、ウレア構造を有する二量体が副生し、また、副生するリン酸ジフェニルやリン酸ジエチルが一般式 (6) で表される化合物と副反応を起こしやすく、収率低下を招きやすい。

よって、(i i)～(i v) の工程は、前記のように工程 (i i) で、例えば、クロロギ酸エステル類を作用させることにより一般式 (4) で表される化合物を得た後、工程 (i i i) でアジド化金属類を作用させることにより、一般式 (5) で表される化合物を得て、工程 (i v) では一般式 (5) で表される化合物をクルチウス転位によって一般式 (6) で表される化合物

へと変換するといったように、段階的に行う方が品質及び収率の両面で好ましい。

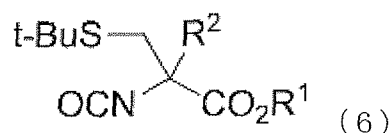
[0127] (i) ~ (iv) の工程を経た後、一般式 (6) で表される化合物を一般式 (1) で表される α -置換システイン又はその塩へと変換することができる。このときの方法としては、特に限定されないが、例えば、後述する (v) の工程を有する方法により変換することが好ましい。

[0128] <工程 (v)>

(v) の工程を説明する。

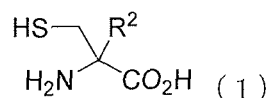
(v) の工程は、一般式 (6)

[化66]



(式中、 R^1 は、置換されていてもよい炭素数1~10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7~20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6~12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1~4のアルキル基を表す。) で表される化合物の (a) イソシアネート基をアミノ基に変換する工程、(b) エステル基を加水分解する工程、及び (c) 酸を作用させて *tert*-ブチル基を除去する工程を含む、一般式 (1)

[化67]

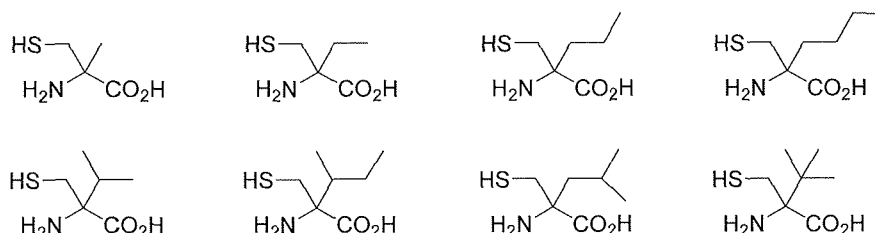


(式中、 R^2 は前記一般式 (6) と同義である。) で表される α -置換システイン又はその塩を得る工程である。

[0129] 前記一般式 (1) 及び (6) で表される化合物における、前記 R^1 、及び R^2 については、上述の工程 (i) の記載と同様である。

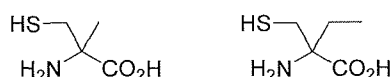
[0130] よって、一般式 (1) で表される α -置換システインの具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化68]



上述した化合物の中でも、一般式（１）で表される α -置換システインとしては、以下の化合物が好ましい。

[化69]



[0131] また、一般式（１）で表される α -置換システインは塩を形成していてもよい。 α -置換システインの塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、シュウ酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、マンデル酸塩等のカルボン酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩等のスルホン酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、フェネチルアミン塩、ピリジン塩等の有機アミン塩等が挙げられる。中でも、塩酸塩が好ましい。

[0132] また、前記一般式（１）で表される化合物はラセミ化合物でもよく、キラル化合物でもよいが、医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく、99.5% e. e. 以上が特に好ましく、99.8% e. e. 以上が最も好ましい。

[0133] （a）イソシアネート基をアミノ基に変換する工程で行なう反応としては、公知の方法を適宜用いることができる。具体的には、酸、又は塩基を作用

させることにより直接アミノ基へと変換する方法、アルコールを作用させることによりカーバメートへと変換した後、酸や塩基、もしくは接触還元によってアミノ基へと変換する方法等が挙げられる。

直接アミノ基へと変換する方法において用いられる酸、塩基としては、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物が挙げられる。この場合の反応温度は、通常、 $0^{\circ}\text{C}\sim 200^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、30分間～50時間である。

また、カーバメートを經由する方法としては、例えば、ベンジルアルコール、*p*-メトキシベンジルアルコール等を作用させ、ベンジルオキシカルボニル保護アミノ基へと変換した後、接触還元によりベンジルオキシカルボニル基を脱保護する方法や、*tert*-ブチルアルコールを作用させて*tert*-ブトキシカルボニル（以下、「Boc」）保護アミノ基へと変換した後、酸を作用させてBoc基を脱保護する方法等が挙げられる。

[0134] （b）エステル基を加水分解する工程では、前記一般式（6）で表される化合物に、水と、酸又は塩基を作用させる。

塩基を作用させて加水分解する場合、当該塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物や、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属炭酸塩等が挙げられる。

酸を作用させて加水分解する場合、酸としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。

塩基を作用させる場合も酸を作用させる場合も、反応温度は、通常、 $0^{\circ}\text{C}\sim 200^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、30分間～50時間である。

[0135] （c）酸を作用させて*tert*-ブチル基を除去する工程では前記一般式（6）で表される化合物に、酸を作用させる。

用いることができる酸としては、*tert*-ブチル基を除去することがで

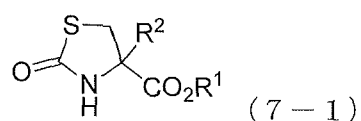
きれば特に制限はないが、強酸が好ましく、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。上述した中でも、安価であることから塩酸、硫酸が好ましい。

この場合の反応温度は、通常、50℃～200℃であり、反応時間は、通常、10時間～150時間である。

[0136] 上述の（a）イソシアネート基をアミノ基に変換する工程、（b）エステル基を加水分解する工程、（c）tert-ブチル基を除去する工程の三つの工程は、どの順番で行ってもよく、二つ以上の工程を同時に行ってもよい。

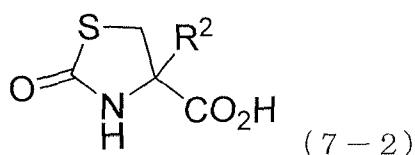
[0137] また、工程（v）としては、以下に述べる（vi-1）、（vi-2）、（vii）の工程を経由することがさらに好ましい。（vi-1）の工程を経由することにより一般的に長時間の反応を必要とするtert-ブチル基の除去が速やかに進行し、一般式（7-1）

[化70]



（式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式（6）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物を得ることができる。また、続いて（vi-2）の工程を経由することにより一般式（7-2）

[化71]



（式中、 R^2 は前記一般式（6）の R^2 と同義である。）で表される化合物が得られる。前記一般式（7-2）で表される化合物は結晶性が高く、中和点以下のpHの水や非極性溶媒に対する溶解度が低いため、無機塩を始めとす

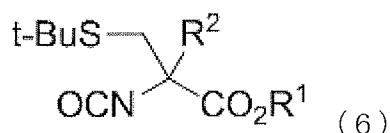
る水溶性の不純物も、各反応中間体のような非水溶性の不純物も晶析によって容易に除去することができる。よって、続く (v i i) の工程の後に得られる一般式 (1) で表される α -置換システイン又はその塩を高純度で得ることができる。

[0138] <工程 (v i - 1)、(v i - 2)>

次に、(v i - 1) と (v i - 2) の工程について説明する。

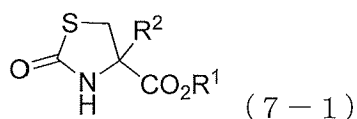
(v i - 1) の工程は、一般式 (6)

[化72]



(式中、 R^1 は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。) で表される化合物に酸を作用させてチアゾリジノン環を構築することにより一般式 (7-1)

[化73]

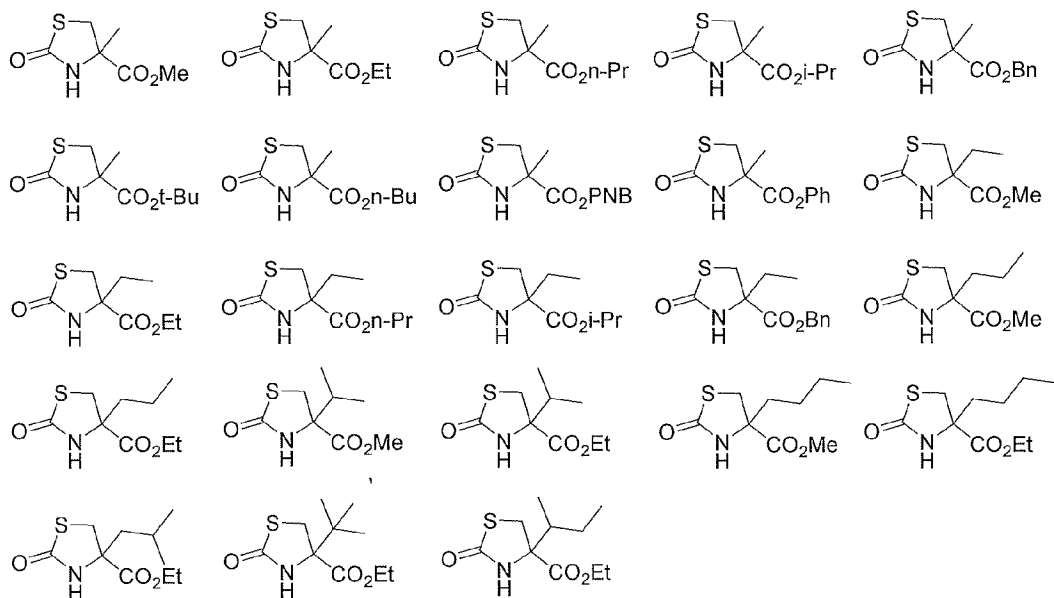


(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式 (6) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物を得る工程である。

[0139] 前記一般式 (6) 及び (7-1) で表される化合物における、前記 R^1 、 R^2 については上述の工程 (i) の記載と同様である。

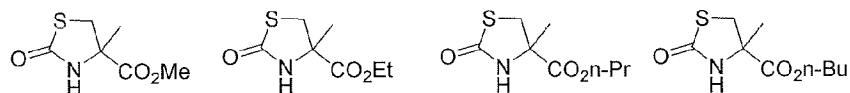
[0140] よって、一般式 (7-1) で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化74]



上述した化合物の中でも、一般式（7-1）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化75]



[0141] また、前記一般式（７－１）はラセミ化合物でもキラル化合物でもよいが、医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、９５．０％*e. e.* 以上が好ましく、９９．０％*e. e.* 以上がさらに好ましく、９９．５％*e. e.* 以上が特に好ましく、９９．８％*e. e.* 以上が最も好ましい。

[0142] 工程 (v i - 1) で用いられる酸としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。中でも、塩酸、硫酸、リン酸、p-トルエンスルホン酸がコストの点でさらに好ましい。

[0143] 酸の使用量は、一般式（６）で表される化合物に対して０．０１モル当量～５０モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、コスト及び後処理の煩雑さを考慮すると、０．１モル当量～１０モル当量が好ましく、０．５モル当量～３モル当量がさらに好ましい。

[0144] 用いられる反応溶媒としては、例えば、アセトン、２－ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルー *tert*－ブチルエーテル、エチルー *tert*－ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、１，２－ジメトキシエタン等のエーテル類、*N*，*N*－ジメチルホルムアミド、*N*，*N*－ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、１，２－ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。水、アルコール類を用いると、一般式（６）で表される化合物と反応してウレア構造を有する二量体やカーバメートを副生してしまい、収率が低下する傾向にあるため、工程（*v*－１）の主溶媒として用いることは好ましくない。水、アルコール類を無機酸、無機塩基の溶解に使用する場合は、最小限に留めるのが好ましい。

したがって、上述した中でも、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、１，２－ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類が、酸に対する安定性の点で好ましく、前記工程（*iv*）から溶媒を変更せず、続けてトルエン、又はキシレンを用いて実施することがコストの点でさらに好ましい。

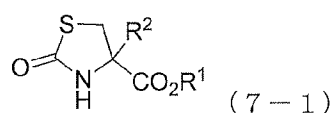
[0145] 反応温度は、例えば、 -30°C ～ 100°C の範囲で適宜設定可能である。しかし、 70°C ～ 100°C の範囲で実施すると、生成する一般式(7-1)で表される化合物は、一般式(7-2)で表される化合物へと短時間で変換される。そのため、一般式(7-1)で表される化合物を単離したい場合は、 -30°C ～ 50°C の範囲で実施するのが好ましく、 0°C ～ 30°C の範囲で実施するのがさらに好ましい。

[0146] 反応時間は、例えば、0.5時間～20時間の範囲で適宜設定可能である。設定温度によっては、10時間～20時間の範囲で実施すると、生成する一般式(7-1)で表される化合物が一般式(7-2)で表される化合物へと変換される傾向にあるため、一般式(7-1)で表される化合物を単離したい場合は、0.5時間～10時間が好ましく、0.5時間～3時間がさらに好ましい。

[0147] 後処理としては、必要に応じて、塩基を加えて中和してもよく、水と非水溶性有機溶媒を用いて抽出してもよく、揮発性の酸であれば濃縮除去してもよい。特に後処理を実施せずに、後述する(vi-2)の工程を実施することがプロセス簡略化の観点で好ましい。

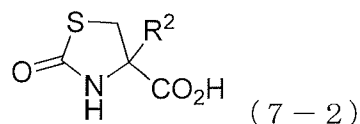
[0148] (vi-2)の工程は、一般式(7-1)

[化76]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(6)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物に酸又は塩基を作用させてエステル基を加水分解し、一般式(7-2)

[化77]



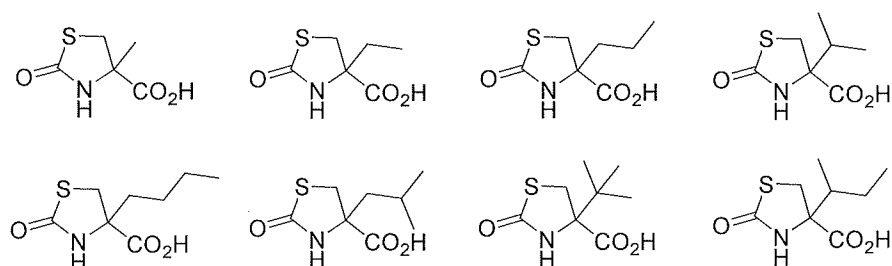
(式中、 R^2 は前記一般式(6)の R^2 と同義である。)で表される化合物を

得る工程である。

[0149] 前記一般式（7-1）及び（7-2）における、前記 R^2 については上述の工程（i）の記載と同様である。

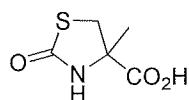
[0150] よって、一般式（7-2）で表される化合物の具体例としては、例えば、以下の化合物が挙げられる。

[化78]



上述した化合物の中でも、一般式（7-2）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化79]



[0151] また、前記一般式（7-2）はラセミ化合物でも、キラル化合物でもよいが、医薬品又はその中間体として製造する場合、一般的に高い光学純度が求められることから、光学純度の高いキラル化合物であることが好ましく、95.0% e. e. 以上が好ましく、99.0% e. e. 以上がさらに好ましく、99.5% e. e. 以上が特に好ましく、99.8% e. e. 以上が最も好ましい。

[0152] 工程（v i -2）で用いられる酸としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。中でも、塩酸、硫酸、リン酸がコストの点でさらに好ましく、揮発性の酸であるため濃縮除去が容易であるという点で塩酸がさらに好ましい。

また、塩基を作用させて加水分解してもよい。用いられる塩基としては、例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属炭酸塩等が挙げられる。

塩基を用いる場合は、上述の通り、前記一般式(7-2)で表される化合物は酸性の水に対する溶解度が低く、反対に塩基性に水に対する溶解度が高いため、ろ過で回収する際には酸を加えてpHを調整する必要がある。また、中和の際に発生する無機塩混入のリスクも発生するため、品質の観点からは酸を使用することが好ましい。

工程(vi-1)においても酸を使用するため、工程(vi-1)で使用した酸を変更せずに続けて作用させ、工程(vi-1)と工程(vi-2)とを連続して実施してもよい。あるいは、工程(vi-2)でさらに酸を追加してもよく、その場合、工程(vi-1)で使用した酸と同一の酸でも異なる酸でもよい。しかし、プロセス簡略化の観点からは、工程(vi-1)の後に特に後処理を行わず、工程(vi-1)で使用した酸を続けて作用させて、これらの工程を連続して実施することが好ましい。即ち、工程(vi-1)で得られた前記一般式(7-1)で表される化合物を含む反応液を、そのまま、反応温度を変更する等して、工程(vi-2)に用いることが好ましい。

[0153] 酸を用いる場合、酸の使用量は、一般式(7-1)で表される化合物に対して0.01モル当量～50モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、コスト及び後処理の煩雑さを考慮すると、0.1モル当量～10モル当量が好ましく、0.5モル当量～2モル当量がさらに好ましい。

[0154] 酸を用いる場合、反応溶媒としては、例えば、水、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエス

テル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルー *t e r t* -ブチルエーテル、エチルー *t e r t* -ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

アルコールは加水分解の進行を阻害する傾向にあるため、上述した中でもベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類が、酸に対する安定性の点で好ましい。ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼンが高温での加熱が可能なことからさらに好ましく、前記工程 (v i - 1) から続けてトルエン、又はキシレンを用いて実施するとコストの点で最も好ましい。

[0155] 酸を用いる場合、溶媒の使用量は、一般式 (6) で表される化合物に対して、例えば、0 倍体積量～1 0 0 倍体積量の範囲で適宜設定可能であり、容積効率の点では0 倍体積量～2 0 倍体積量が好ましく、0 倍体積量～5 倍体積量がさらに好ましい。

[0156] 酸を用いる場合、反応温度は、例えば、- 3 0℃～2 0 0℃の範囲で適宜設定可能である。転化率向上と溶媒の沸点を考慮すると、2 0℃～1 2 0℃が好ましく、温度を上げすぎると一般式 (7 - 2) で表される化合物の分解が進行し収率低下を招くため、5 0℃～9 0℃がさらに好ましい。

[0157] 酸を用いる場合、反応時間は、例えば、0 時間～1 0 0 時間の範囲で適宜設定可能である。温度によっては、長時間実施すると一般式 (7 - 2) で表される化合物の分解が進行し、収率低下を招くため、0 時間～3 0 時間が好

ましく、転化率向上の観点からは5時間～30時間がさらに好ましい。

[0158] 酸を用いる場合、この反応の後処理としては、一般式(7-2)で表される化合物が酸性溶液中で固体であることを利用して、反応溶媒中から晶析回収する方法が挙げられる。あるいは、必要に応じて濃縮して溶媒を除去するだけでもよく、酸もしくは塩基を用いて反応液を中和した後、目的物をイオン交換樹脂に吸着させて塩を分離してから晶析回収してもよく、酸もしくは塩基をイオン交換樹脂に吸着させて除去した上で溶出液から晶析回収してもよく、純度次第ではカラムや再結晶により精製してもよい。酸のみを使用した場合は、一般式(7-2)で表される化合物は一般的に結晶性が高く、かつ高純度で回収可能なため、反応溶媒中からの晶析回収のみを実施することが好ましい。

[0159] また、塩基を用いる場合、反応溶媒としては、塩基に対する安定性の観点から、例えば、水、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、tert-ブタノール等のアルコール類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。中でもベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノ

ルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類が挙げられる。中でも、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼンが高温での加熱が可能なおからさらに好ましく、前記工程(vi-1)から続けてトルエン、キシレンを用いて実施することがコストの点で最も好ましい。

[0160] 塩基を用いる場合、塩基は、一般式(7-1)で表される化合物に対して0.9モル当量~20モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、コスト及び後処理の煩雑さを考慮すると、0.9モル当量~5.0モル当量が好ましく、1.0モル当量~3.0モル当量がさらに好ましい。工程(vi-1)の後に特に後処理を行わず、工程(vi-1)で使用した酸を続けて作用させ、工程(vi-1)から連続して実施する場合には、酸を中和するのに必要な塩基をさらに追加すればよい。

[0161] 塩基を用いる場合、溶媒の使用量は、一般式(6)で表される化合物に対して、例えば、0倍体積量~100倍体積量の範囲で適宜設定可能であり、容積効率の点では0倍体積量~20倍体積量が好ましく、0倍体積量~5倍体積量がさらに好ましい。

[0162] 塩基を用いる場合、反応温度は、例えば、-30℃~100℃の範囲で適宜設定可能である。副反応を抑制するためには0℃~80℃が好ましく、温度を上げすぎると一般式(7-2)で表される化合物の分解が進行して収率低下を招くことがあるため、0℃~50℃がさらに好ましい。

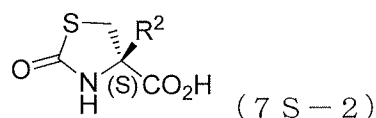
[0163] 塩基を用いる場合、反応時間は、例えば、0時間~100時間の範囲で適宜設定可能である。温度によっては、長時間反応させると一般式(7-2)で表される化合物の分解が進行して収率低下を招くことがあるため、0時間~30時間が好ましく、転化率向上の観点からは5時間~30時間がさらに

好ましい。

[0164] 塩基を用いる場合、この反応の後処理としては、一般式(7-2)で表される化合物が酸性溶液中で固体であることを利用して、反応溶媒中から晶析回収することができる。具体的には、酸によって塩基を中和した後、さらに酸を加えればよい。その他、濃縮して溶媒を除去するだけでもよく、酸を用いて反応液を中和した後、目的物をイオン交換樹脂に吸着させて塩を分離してから晶析回収してもよく、塩基をイオン交換樹脂に吸着させて除去した上で溶出液から目的物を晶析回収してもよい。純度次第ではカラムや再結晶により精製してもよいが、酸のみを使用した場合、一般式(7-2)で表される化合物は一般的に結晶性が高く、かつ高純度で回収可能なため、反応溶媒中からの晶析回収のみを実施することが好ましい。

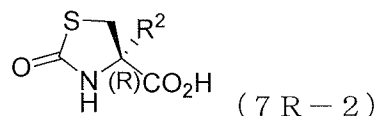
[0165] 一般式(7-2)で表される化合物のうち、一般式(7S-2)

[化80]



(式中、 R^2 は、前記一般式(7-2)の R^2 と同義である。)及び、一般式(7R-2)

[化81]



(式中、 R^2 は、前記一般式(7-2)の R^2 と同義である。)は、ラセミ体と比べて結晶性がさらに高い。従って、ラセミ体よりも、一般式(7S-2)もしくは一般式(7R-2)のどちらか一方を選択的に含むキラル体の方が、晶析等により光学純度を向上させることが容易である。

上述の後処理を行なった後に、一般式(7-2)で表される化合物が目的とする光学純度に達していない場合には、再晶析を繰り返すことによって、光学純度を向上させればよい。特に後述する工程(vii)において一般式(

1) で表される化合物がキラル体である場合は、原料である一般式 (7-2) で表される化合物の光学純度を、あらかじめ晶析によって求められる光学純度まで向上させておくことが好ましい。

[0166] 一般式 (7-2) で表される化合物の晶析溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。このうち1種類の溶媒を用いても良く、2種類以上の溶媒を混合して使用してもよい。

特に、溶解性が高く精製効率が高いことから、例えば、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジ

メチルスルホキシド等の極性溶媒が好ましい。中でも沸点が低く、減圧乾燥による除去がしやすいことから、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類がさらに好ましい。

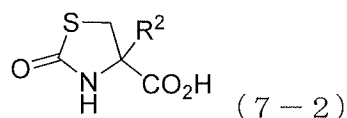
回収率を向上させるために、これらの極性溶媒にベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類等の低極性溶媒を貧溶媒として加えることが好ましい。

[0167] <工程 (v i i) >

次に、(v i i) の工程について説明する。

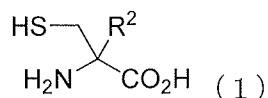
(v i i) の工程は、一般式 (7-2)

[化82]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させてチアゾリジノン環を開環し、一般式(1)

[化83]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される α -置換システイン又はその塩を得る工程である。

[0168] 工程(v i i)で用いられる酸としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の無機酸、トリフルオロ酢酸、トリフ

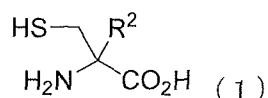
ルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。

また、塩基としては、例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属炭酸塩等が挙げられる。中でも強塩基が好ましく、具体的には水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物が挙げられる。

塩基を用いると、生成した α -置換システインが二量化してジスルフィドを形成しやすくなることから、収率及び品質の点で酸を使用することが好ましい。中でも塩酸、トリフルオロ酢酸、臭化水素、フッ化水素、ヨウ化水素等の揮発性の酸は濃縮だけで除去が可能であることからさらに好ましく、コストの観点から塩酸が最も好ましい。

[0169] また、工程(v i i)で用いられる酸又は塩基のうち少なくとも一部は、工程(v i - 2)で用いた酸又は塩基を流用することも可能である。すなわち、工程(v i - 2)の後、特に後処理を行わずに、工程(v i - 2)で得られた反応液をそのまま後述する工程(v i i)の反応条件に供することで、一般式(1)

[化84]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される α -置換システイン又はその塩を得ることもできる。

しかし、一般式(1)で表される α -置換システイン又はその塩を高純度で製造する場合は、原料となる一般式(7-2)で表される化合物も高純度であることが求められる。そのため、上述の通り、工程(v i - 2)の後是一般式(7-2)で表される化合物を晶析回収する操作を実施して不純物を除いた後に、工程(v i i)を実施するのが品質管理の観点で好ましい。

[0170] 酸又は塩基の使用量としては、例えば、一般式(7)で表される化合物に

対して0.1モル当量～200モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、1モル当量～30モル当量が容積効率の点で好ましい。また、酸を用いる場合、反応時間を短縮するためには一般式(7)で表される化合物が酸に完全に溶解している状態が好ましく、また、酸を除去する工程のプロセス負荷を考慮すると5モル当量～20モル当量とすることが、さらに好ましい。

[0171] また、必要に応じて溶媒の存在下で反応させてもよく、当該溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。酸を用いる場合は、酸との副反応を起こさないものが好ましく、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類が好ましいが、酸の濃度が高いほど反応が促進されるため、溶媒を用いず、酸を溶媒として利用するのがさらに好ましい。

[0172] 反応温度は、例えば、-30℃～300℃の範囲で適宜設定可能であり、溶媒の沸点を考慮すると、25℃～150℃が好ましい。中でも揮発性の酸を用いる場合、反応温度が沸点を超えると酸が揮発するため、酸濃度が下が

って反応速度が遅くなることから、80℃～110℃がさらに好ましい。密閉可能な耐圧性の反応容器を用いることで酸の揮発を防ぎながら実施することもできるが、この場合の好ましい範囲は前記に限らない。

[0173] 反応時間としては、例えば、1時間～300時間の範囲で適宜設定可能である。収率の観点から、10時間～200時間が好ましく、特に酸を用いる場合は40時間～100時間がさらに好ましい。

[0174] 酸を用いる場合、この反応の後処理は、 α -置換システインを塩として回収するのか否かによって適宜選択可能である。例えば、酸との塩として回収する場合は、濃縮して溶媒を除去すればよい。 α -置換システインとして回収する場合は、反応液に中和点まで塩基を加え、 α -置換システインを析出させてろ過により回収してもよく、反応液を陽イオン交換樹脂に通して α -置換システインを吸着させることで酸を除いた後、 α -置換システインの溶出液を濃縮して回収してもよい。 α -置換システイン又はその塩を高純度で得るためには、再晶析を実施し、純度を上げることが好ましい。

[0175] 再晶析する場合には、晶析溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン

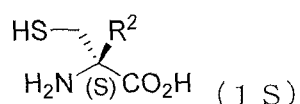
化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、このうち1種類の溶媒を用いても良く、2種類以上の溶媒を混合して使用してもよい。メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類に対しては精製の効果が高いことから好ましい。

α -置換システインはこれらの溶媒に対する溶解度が高く、単一溶媒で晶析を行なうと回収率が低いため、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類といった非極性溶媒を貧溶媒として加えることがより好ましい。中でも、メタノール、エタノール、ノルマルプロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブタノール、*tert*-ブタノール等のアルコール類とベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類の組み合わせが精製効果と高い回収率を両立できるためさらに好ましく、ろ過後の乾燥による溶媒除去のしやすさの面と作業者の安全を考慮するとメタノール、エタノール、もしくはイソプロピルアルコールと、トルエンとの組み合わせが最も好ましい。

[一般式(1S)で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法]

[0176] 前記一般式(1)で表される α -置換システイン又はその塩のうち、立体配置がS体である式(1S)

[化85]

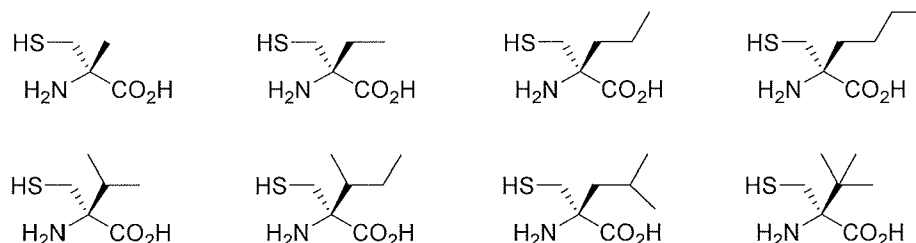


(式中、 R^2 は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で表される α -置換-D-システイン又はその塩は医薬品等の中間体として有用である。中でも R^2 がメチル基である α -メチル-D-システイン又はその塩は、特に鉄過剰症治療薬の中間体として有用であることが知られており、工業的なスケールでの

生産可能な製造法の確立が期待されている。

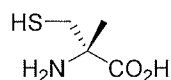
[0177] 前記一般式（1 S）で表される α -置換システインの具体例としては、以下の化合物が挙げられる。

[化86]



上述した化合物の中でも、化合物（1 S）としては、以下の化合物が好ましい。

[化87]

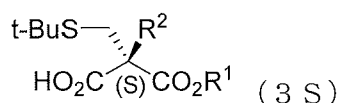


[0178] 一般式（1 S）で表される α -置換-D-システイン又はその塩が医薬品の中間体として使用される場合、上述の通り高い光学純度が要求される。一般的には99.0% e. e. 以上が好ましく、99.5% e. e. 以上がさらに好ましく、99.8% e. e. 以上が特に好ましい。

[0179] 以下、一般式（1 S）で表される α -置換-D-システイン又はその塩の製造方法について説明するが、各工程の反応条件等については[一般式（1）で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法]の記載と同様である。

一般式（1 S）で表される α -置換-D-システイン又はその塩を製造するためには、前記工程（i）で製造した一般式（3 S）

[化88]

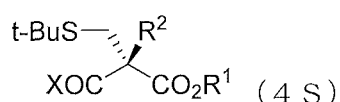


（式中、 R^1 は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよ

い炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は前記一般式(1S)と同義である)で表される化合物を用いて前記工程(i i)～(v)を実施すればよい。

[0180] まず、工程(i i)において前記一般式(3S)に縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させて一般式(4S)

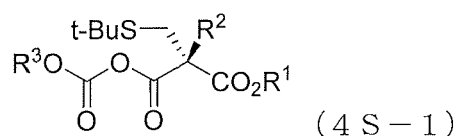
[化89]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(3S)の R^1 及び R^2 と同義である。Xは、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ 又はハロゲン原子を表す。)で表される化合物を得ればよい。一般式(4S)で表される化合物は、Xの種類に応じてS体となることもR体となることもあり得る。

中でもクロロギ酸エステル類を作用させてXが $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ である一般式(4S-1)

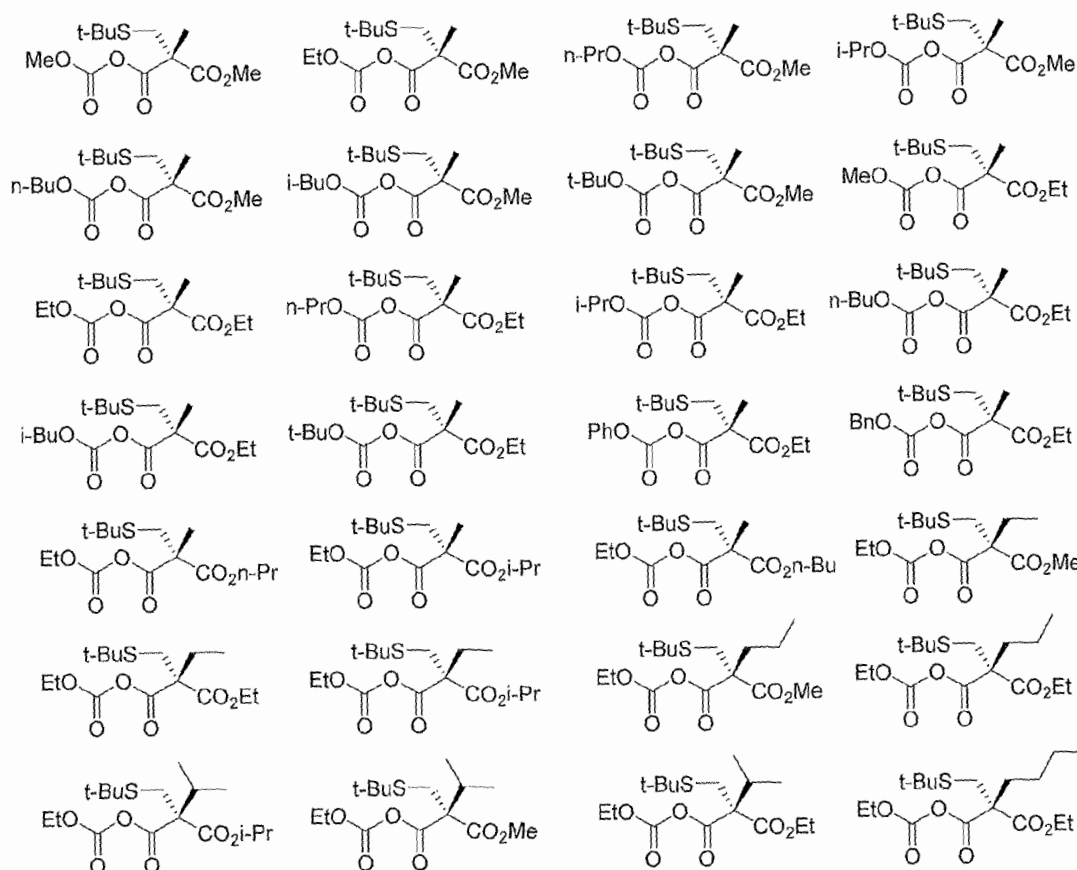
[化90]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前記一般式(4)の R^1 、 R^2 及び R^3 と同義である。)で表される化合物を得るのが好ましい。

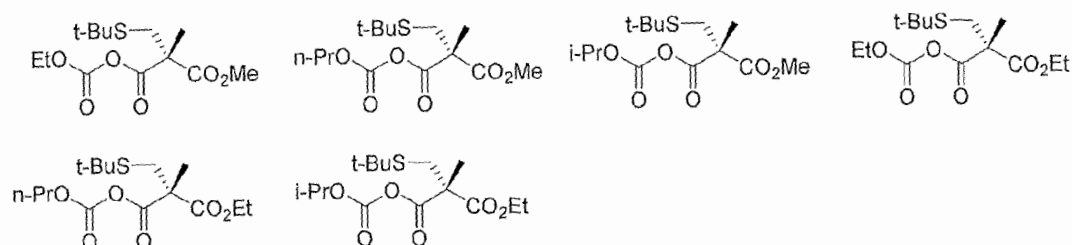
[0181] 前記一般式(4S-1)で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化91]



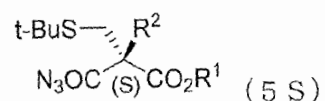
上述した化合物の中でも、化合物（4 S - 1）としては、以下の化合物が好ましい。

[化92]



[0182] 次に工程（i i i）において前記一般式（4 S）で表される化合物にアジド化剤を作用させて一般式（5 S）

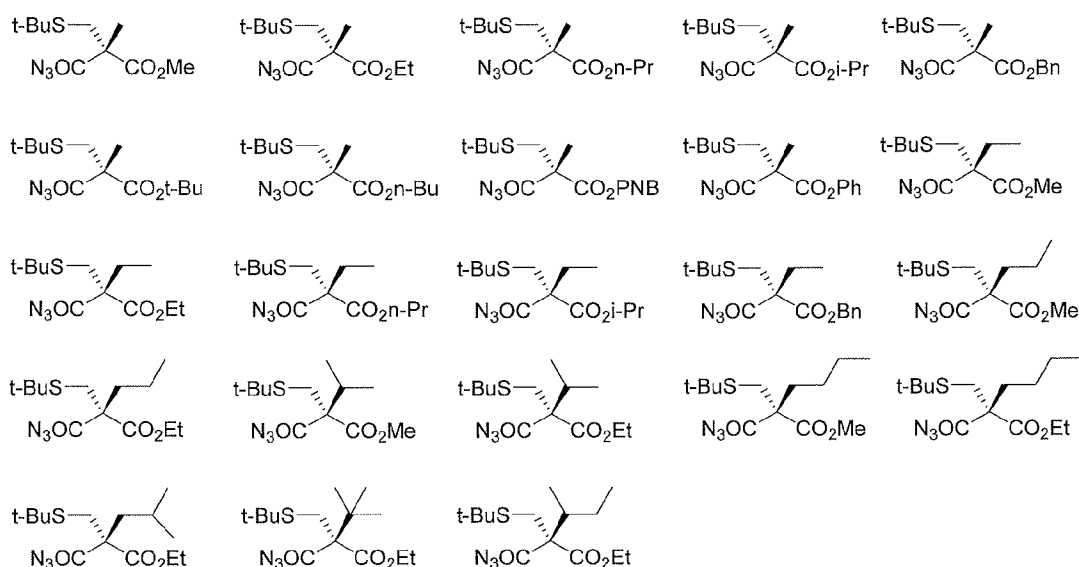
[化93]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(4 S)の R^1 及び R^2 と同義である)で表される化合物を得ればよい。中でもXが $-OC(O)OR^3$ 基である前記一般式(4 S-1)で表される化合物を原料として使用するのが好ましい。

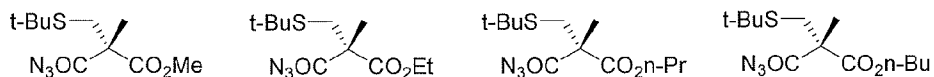
[0183] 前記一般式(5 S)で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化94]



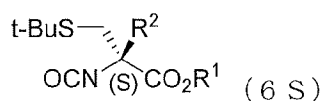
上述した化合物の中でも、一般式(5 S)で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化95]



[0184] 次に工程(i v)において前記一般式(5 S)で表される化合物をクルチウス転位反応により、一般式(6 S)

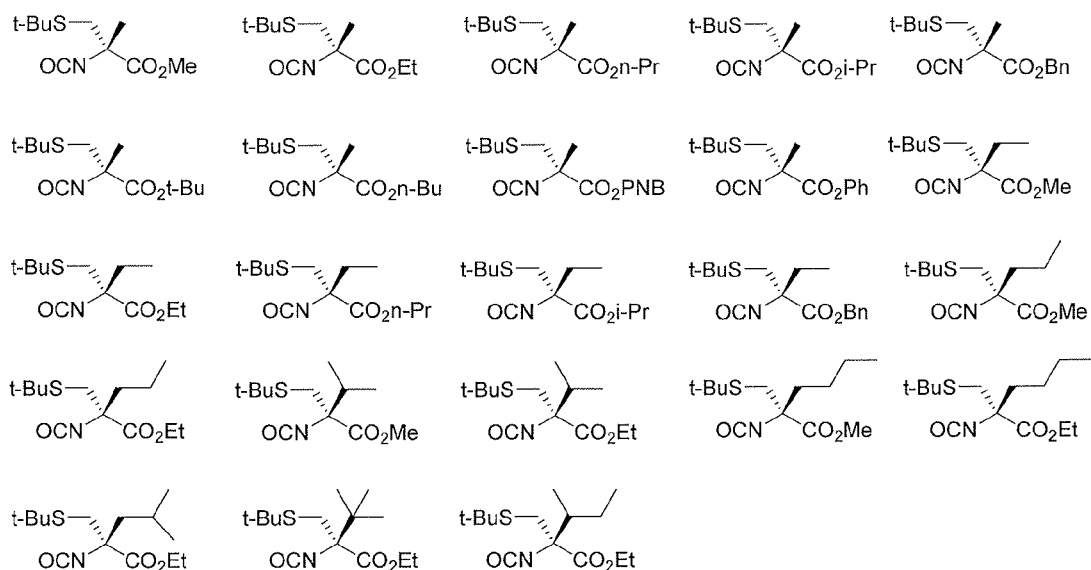
[化96]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(5 S)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物へと変換すればよい。

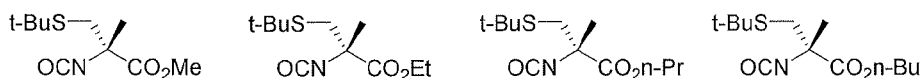
[0185] 前記一般式(6S)で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化97]



上述した化合物の中でも、一般式(6S)で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

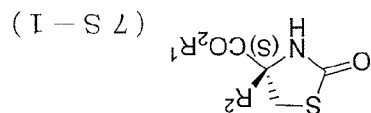
[化98]



[0186] 次に、工程（v）において（a）イソシアネート基をアミノ基へと変換する工程、（b）エステル基を加水分解してカルボキシル基に変換する工程、（c）酸を作用させてtert-ブチル基を除去する工程を経て前記一般式（1 S）が得られる。中でも、前記一般式（6 S）で表される化合物を得た後は、前記工程（vi-1）、（vi-2）、（vii）を経由することが好ましい。

[0187] すなわち工程 (v i - 1) において前記一般式 (6 S) に酸を作用させチア
ゾリジノン環を構築することにより一般式 (7 S - 1)

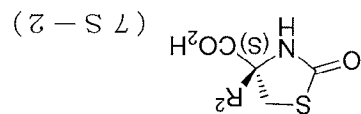
[化99]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(6S)の R^1 及び R^2 と同義である。)

で表される化合物へと変換する。次いで工程(Ⅶ-2)において前記一般式(7S-1)で表される化合物に酸、又は塩基を作用させてエステル基を加水分解することにより、一般式(7S-2)

[化100]



(式中、 R^2 は、前記一般式(7S-1)の R^2 と同義である。)で表される

化合物へと変換する。次に、工程(Ⅶ-1)において前記一般式(7S-2)に酸、又は塩基を作用させてチアゾリジノン環を開環することにより、前記一般式(1S)で表される α -置換-D-シスチン又はその塩が得られ

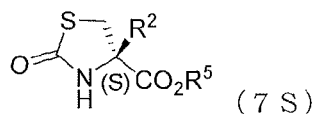
る。

[0188]

言い換えれば、工程(Ⅶ-1)を経由することにより一般的に長時間の反応を必要とするtert-ブチル基の除去が速やかに進行し、一般式(7S-1)で表される化合物を短時間で得ることができる。また続く工程(Ⅶ-2)で得られる一般式(7S-2)で表される化合物は結晶性が高く、

中和点以下のpHの水や非極性溶媒に対する溶解度が低いため、無機塩を始めとする水溶性の不純物と各反応中間体のような非水溶性の不純物の何れについても晶析によって除去することが容易であり、続く工程(Ⅶ-1)の後、一般式(1S)で表される α -置換-D-シスチン又はその塩を高純度で得ることができる。加えて、一般式(7S-2)で表される化合物は当該化合物のラセミ体と比べて結晶性がさらに高いことから、晶析によって光学純度を向上させることも容易である。よって、以下の一般式(7S)

[化101]

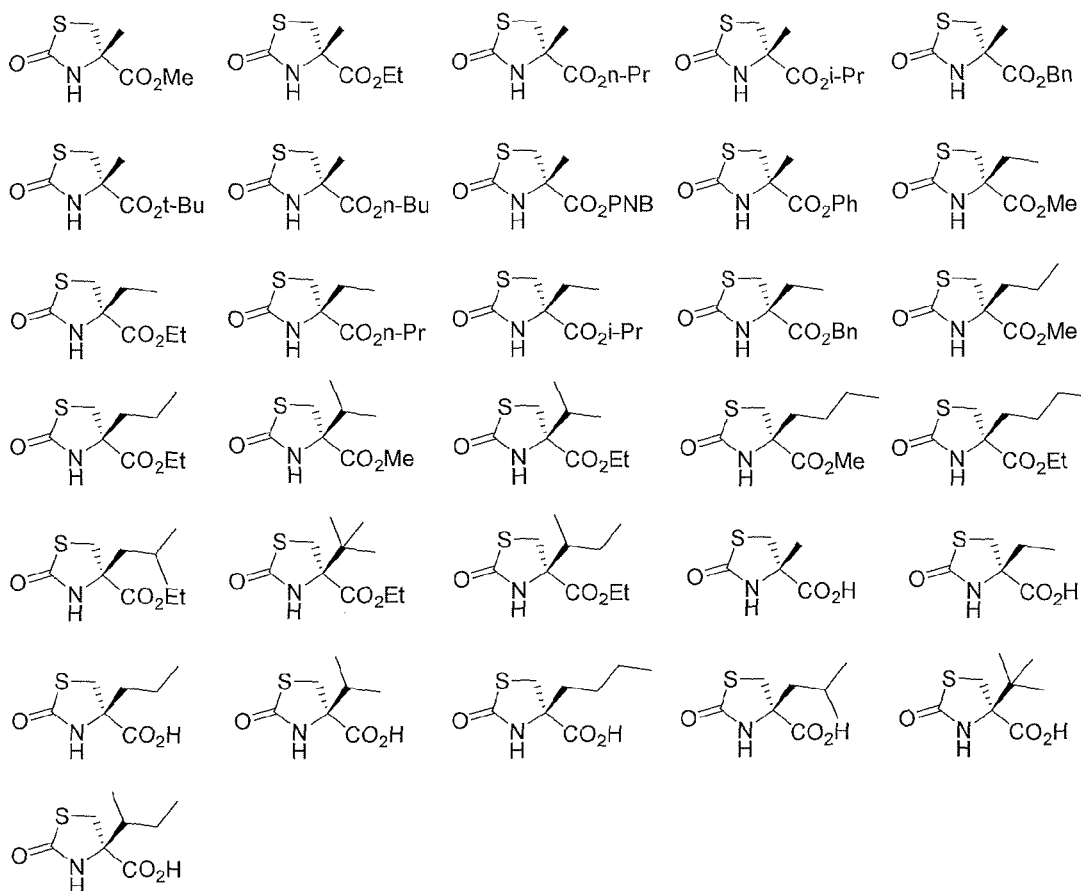


(式中、 R^2 は前記一般式(6)と同義である。 R^5 は、水素原子、又は、前記一般式(6S)の R^1 と同義である。)で表される化合物は、高品質の一般式(1S)で表される α -置換システイン又はその塩を短時間で製造するための重要な中間体であると言える。

ここで、一般式(7S)は、一般式(7S-1)と一般式(7S-2)を含むものである。

[0189] 前記一般式(7S)で表される化合物の具体例としては、以下の化合物が挙げられる。

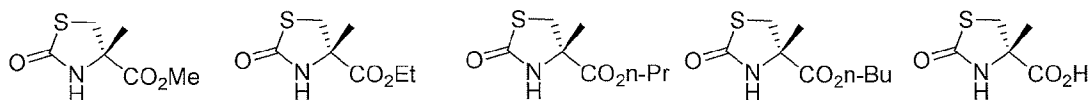
[化102]



上述した化合物の中でも、一般式(7S)で表される化合物としては、以

下の化合物が好ましい。

[化103]

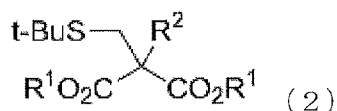


[0190] 一般式（1 S）で表される α -置換-D-システイン又はその塩が医薬品
の中間体として使用される場合、上述の通り高い光学純度が要求されること
から、前駆体である一般式（7 S）で表される化合物の光学純度も99.0
%e.e.以上が好ましく、99.5%e.e.以上がさらに好ましく、9
9.8%e.e.以上が特に好ましい。工程（v i - 2）を実施した後、一
般式（7 - 2）が目的とする光学純度に達していない場合は、再晶析を繰り
返すことによって、光学純度を向上させればよい。

[0191] [一般式（2）で表される化合物の製造方法]

前記で述べた（i）～（v i i）の工程の出発物質は、一般式（2）

[化104]



（式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル
基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換され
ていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアル
キル基を表す。）で表される化合物であり、当該化合物の従来の製造方法で
は、発がん性物質であるビスクロロメチルエーテルが生成する可能性があっ
たため、工業的には好ましくないものであった。

[0192] そこで、本発明者らは、ビスクロロメチルエーテルを生成せず、安全に一
般式（2）で表される化合物を製造する方法を見出したので、以下にその説
明をする。

[0193] 一般式（2）で表される化合物の製造方法は、（v i i i）～（x）又は
（x i）の何れかの工程を含む。

[0194] <工程 (v i i i) >

まず、(v i i i) の工程について説明する。

(v i i i) の工程は、t e r t ーブチルメルカプタンとホルムアルデヒドを反応させることにより、t e r t ーブチルチオメタノールを生成する工程である。

[0195] t e r t ーブチルメルカプタンは、市販されているものを使用すればよい。ホルムアルデヒドは、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、1, 3, 5-トリオキサンの形で市販されているものをいずれも使用可能であるが、コストの点及び取り扱いの容易さの観点から、ホルマリンが好ましい。

[0196] ホルムアルデヒドは、例えば、t e r t ーブチルメルカプタンに対して0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜設定可能であり、定量的にt e r t ーブチルチオメタノールを得るためには、0.9モル当量～2.0モル当量が好ましく、コストの観点及び後処理の簡便さから0.9モル当量～1.2モル当量がさらに好ましい。

[0197] 本工程では、溶媒を使用してもよいが、溶媒を使用せずホルマリンを溶媒として実施しても反応が進行するため、溶媒を使用しないほうがコストの観点で好ましい。

[0198] 反応温度は、例えば、-50℃～200℃の範囲で適宜設定可能であるが、-20℃～100℃が好ましく、また、反応性及び、t e r t ーブチルメルカプタンの沸点を考慮して、40℃～80℃がさらに好ましい。

[0199] 反応時間は、例えば、0.5時間～100時間の範囲で適宜設定可能であるが、1時間～40時間が好ましく、5時間～20時間がさらに好ましい。

[0200] 本工程の反応の後、t e r t ーブチルチオメタノール内にホルムアルデヒドが残ると、次に説明する工程 (i x) においてクロロ化剤のような塩化水素を発生させる物質と反応し、発がん性物質であるビスクロロメチルエーテル生成の要因となる。よって、過剰にホルムアルデヒドを使用した場合は、後処理として、ホルムアルデヒドを除去する工程を加える必要がある。例えば、水と非水溶性有機溶媒を加えて水洗することでホルムアルデヒドを水層

に除去する、*tert*-ブチルチオメタノールを蒸留精製する、固体のパラホルムアルデヒドをろ過する等の方法を用いることができる。中でも、水と非水溶性有機溶媒を加えて水洗するのがホルムアルデヒドの除去効率が高いため好ましい。

水洗に用いる非水溶性有機溶媒は、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類等が挙げられる。中でも、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類が、水との分離性が高く、また低沸点であるため蒸留により除去しやすく、再利用可能であるため好ましい。

溶媒として水を用いる場合は、使用する非水溶性有機溶媒にもよるが、*tert*-ブチルチオメタノールの水洗による水層へのロスをも最小限にするために無機塩を溶解した水を用いるのが好ましく、コストの観点から食塩水を用いるのがより好ましい。

[0201] <工程 (i x) >

次に、(i x) の工程について説明する。

(i x) の工程は、前記 (v i i i) の工程で得られた *tert*-ブチルチオメタノールに、塩基の存在下、クロル化剤を作用させて、*tert*-ブチルチオクロロメタンを得る工程である。

[0202] クロル化剤としては、例えば、塩化水素、塩化ピバロイル、塩化アセチル、塩化ベンゾイル、塩化チオニル、三塩化リン、五塩化リン、オキシ三塩化リン、塩化オキサリル、塩化スルフリル等が挙げられる。中でも、塩化チオニルが安価でかつ反応選択性が高いため好ましい。

[0203] クロル化剤の使用量は、例えば、*tert*-ブチルチオメタノールに対し 0.7 モル当量～10 モル当量の範囲で適宜設定可能である。コスト及び後処理の容易さから 0.8 モル当量～3 モル当量が好ましく、*tert*-ブチルチオクロロメタンを定量的に得るためには、0.9 モル当量～1.2 モル当量がさらに好ましい。

[0204] また、塩基としては、求核性を持たない塩基であれば特段の制限はないが、例えば、ピリジン、2-クロロピリジン、3-クロロピリジン、2-メチルピリジン、3-メチルピリジン、2,3-ルチジン、2,4-ルチジン、2,5-ルチジン、2,6-ルチジン、3,4-ルチジン、3,5-ルチジン等のピリジン類、トリエチルアミン、トリイソプロピルアミン、ジメチルイソプロピルアミン、ジメチルブチルアミン、ジエチルメチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、*N*-メチルモルホリン等の3級アミン等が挙げられる。コストの観点からピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンが好ましく、後述する後処理法において副生する塩酸塩の溶解性の低いことが有利であることと、収率の観点から、ピリジンがさらに好ましい。

[0205] 塩基の使用量は、例えば、*tert*-ブチルチオメタノールに対して、0.7 モル当量～10 モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、0.8 モル当量～5 モル当量が好ましく、コスト及び後処理の容易さから 0.9 モル当量～1.5 モル当量がさらに好ましい。また、クロル化剤の使用量に対して、1.0 モル当量～1.1 モル当量であることが最も好ましい。

[0206] (ix) の工程は、反応溶媒を使用してもよく、例えば、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチ

ルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

中でも、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン、ジクロロメタン、クロロホルムは、酸に不活性なので副反応を起こしにくく、再利用可能であるため、好ましい。また、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類は、副生する塩基の塩酸塩を溶かしにくい溶媒であり後述する後処理工程での除去がしやすいため、さらに好ましい。

水、アルコール類は、クロル化剤を分解しやすいことから、混入量を最小限にすることが好ましい。

[0207] 反応溶媒の使用量は、tert-ブチルチオメタノールに対して、例えば、0倍体積量～100倍体積量の範囲で適宜設定可能である。当該工程は発熱が大きいので、溶媒を使用しないのはプロセス安全上問題があること、また容積効率の観点から、tert-ブチルチオメタノールに対して1倍体積量～20倍体積量の反応溶媒を使用することが好ましい。また、副生する塩基の塩酸塩が析出した際の攪拌効率の確保及び容積効率を考慮して、5倍体積量～15倍体積量がさらに好ましい。

[0208] 反応温度は、例えば、-80℃～100℃の範囲で適宜設定可能であり、-50℃～50℃が好ましい。また、温度が高すぎるとtert-ブチルチオクロロメタンが分解し収率が低下することから、-15℃～25℃がさらに好ましい。

[0209] 反応時間は、例えば、0.5時間～50時間の範囲で適宜設定可能であり、1時間～20時間が好ましい。また、長時間反応させるとtert-ブチ

ルチオクロロメタンが分解し収率が低下することから、1時間～8時間がさらに好ましい。

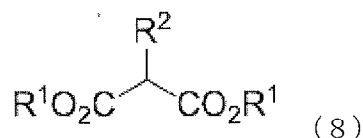
[0210] この後処理としては、反応液中に析出してくる塩基の塩酸塩をろ過や水洗で除去すればよい。除去後は、純度次第で溶媒を除去するだけでもよく、蒸留精製してもよい。例えば塩基としてピリジンを用いた場合、上述の通りピリジン塩酸塩は溶媒への溶解度が低いことから、ろ過実施後は溶媒除去だけでも充分だが、さらに蒸留操作を加えると、高純度の *tert*-ブチルチオクロロメタンが得られるため好ましい。

[0211] <工程 (x)>

次に、(x) の工程について説明する。

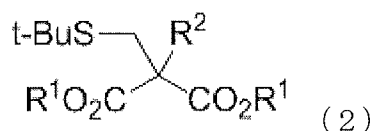
(x) の工程は、前記工程 (ix) で得られた *tert*-ブチルチオクロロメタンに、塩基の存在下、一般式 (8)

[化105]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数 1～10 のアルキル基、置換されていてもよい炭素数 7～20 のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数 6～12 のアリール基を表し、 R^2 は炭素数 1～4 のアルキル基を表す。) で表される化合物を作用させて、一般式 (2)

[化106]



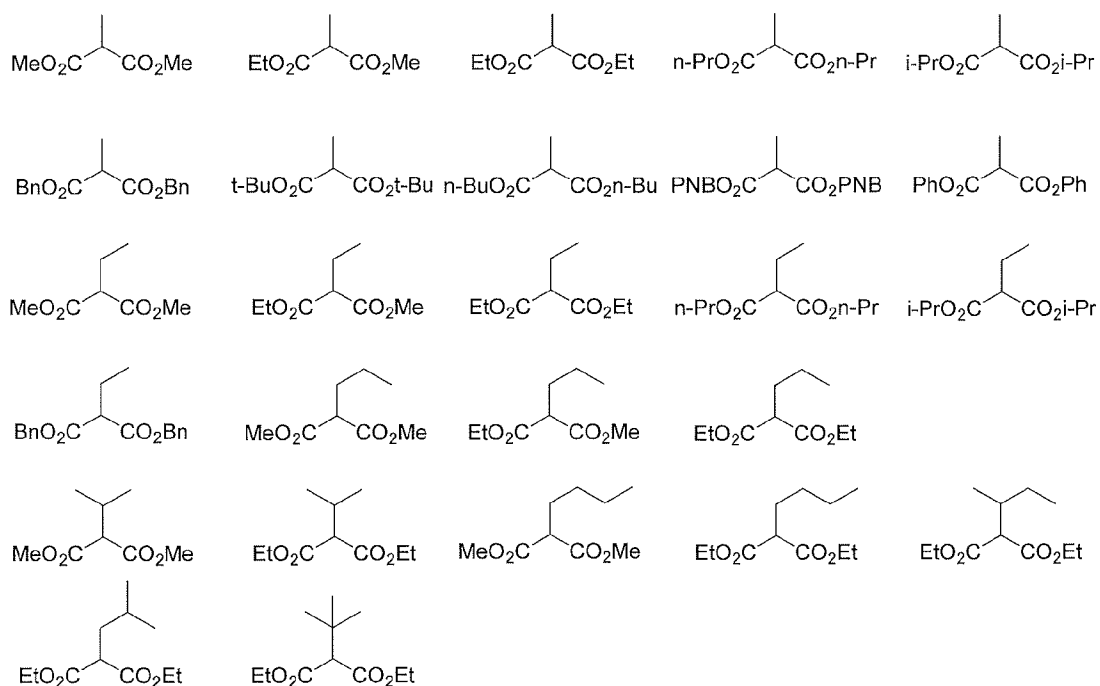
(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式 (8) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物を得る工程である。

[0212] 一般式 (8) で表される化合物において、前記 R^1 、 R^2 については前記工程 (i) の記載と同様である。

よって、一般式 (8) で表される化合物の具体例としては、例えば以下の

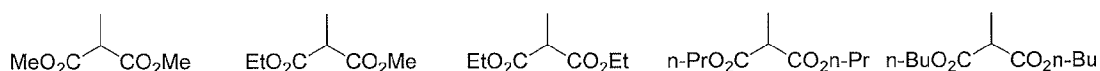
化合物が挙げられる。

[化107]



上述した化合物の中でも、一般式（８）で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化108]



[0213] 一般式（８）で表される化合物は市販されているものを使用しても良く、Tetrahedron Letters (2008), 49, (15), 2446-2449. に記載の方法等に従い、マロン酸ジアルキルと塩基、アルキル化剤との組み合わせによって製造してもよい。

[0214] また、一般式（８）で表される化合物においてR¹は必ずしも同一である必要は無く、それぞれ異なってもよい。R¹が異なる場合、前記一般式（８）で表される化合物にはR体、S体の二つのエナンチオマーが存在するが、その混合比は特に問わない。

[0215] tert-ブチルチオクロロメタンの使用量は、例えば、前記一般式（８）で表される化合物に対して、0.7モル当量～10モル当量の範囲で適宜

設定可能であるが、前記一般式（２）で表される化合物を定量的に得るためには０．９モル当量～５モル当量が好ましく、１．０モル当量～１．５モル当量がコストの点からさらに好ましい。

[0216] また、塩基としては、例えば、アルカリ金属アルコキシド、又はアルカリ金属水素化物が挙げられる。アルカリ金属アルコキシドとしては、リチウムエトキシド、リチウムメトキシド、リチウム *tert*-ブトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウム *tert*-ブトキシド、カリウムエトキシド、カリウムメトキシド、カリウム *tert*-ブトキシド等が挙げられる。アルカリ金属水素化物としては、水素化リチウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が挙げられる。

中でも、ナトリウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウム *tert*-ブトキシド、カリウムエトキシド、カリウムメトキシド、カリウム *tert*-ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシドは、反応時に水素の発生が無く安全に取り扱え、かつアルカリ金属水素化物に含まれるミネラルオイルを除去する操作を必要としないため好ましく、カリウム *tert*-ブトキシドが、有機溶媒への溶解度が高く求核性が低いことからさらに好ましい。

[0217] 塩基は、例えば、一般式（８）で表される化合物に対して、０．７モル当量～１０モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、前記一般式（２）で表される化合物を定量的に得るためには０．９モル当量～５モル当量が好ましく、コストの観点及び副反応を低減するためには０．９モル当量～１．５モル当量がさらに好ましい。

[0218] 当該工程においては反応溶媒を使用してもよい。反応溶媒としては、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジ

オキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

中でも、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミドジメチルスルホキシド、ジメチルスルホキシド等の非プロトン性の極性溶媒は、一般式(8)で表される化合物と塩基が反応して生成するアルカリ金属塩の溶解度が高いことから反応を促進する効果があるため好ましく、テトラヒドロフランが、安価、かつ入手容易であることからさらに好ましい。

[0219] 反応溶媒の使用量は、tert-ブチルチオクロロメタンに対して、例えば、0倍体積量～100倍体積量の範囲で適宜設定可能である。中でも、一般式(8)で表される化合物のアルカリ金属塩を溶解させる溶媒を加えることで反応が進行しやすくなること、及び、容積効率の観点から、1倍体積量～20倍体積量が好ましく、3倍体積量～8倍体積量がさらに好ましい。

[0220] 反応温度は、例えば、-100℃～200℃の範囲で適宜設定可能であり、-50℃～100℃が好ましい。温度が低すぎると一般式(8)で表される化合物のアルカリ金属塩の溶媒への溶解度が下がることで反応が遅くなり、高すぎると副反応が生じて収率が低下する可能性があることから、-10℃～50℃がさらに好ましい。

[0221] 反応時間は、例えば、0.5時間～100時間の範囲で適宜設定可能であり、1時間～20時間が好ましい。長すぎると副反応が生じて収率が低下する可能性があるため、1時間～10時間がさらに好ましい。

[0222] この反応の後処理としては、反応液中に析出してくる無機塩をろ過で除くか、水と非水溶性溶媒を加えて水洗で除去するのが好ましい。中でも、使用する反応溶媒によっては該反応溶媒へ無機塩が溶解することから、水洗を加えるのがより好ましい。また、反応液に水を加えると水層は塩基性になるため、一般式(8)で表される化合物中のエステル基の加水分解を抑制するた

めには、反応液中に低温下で酸性の水を加える、水を加えた後に酸を添加して水層のpHを中性にコントロールする、反応液を酸性の水溶液に添加する等の方法を用いることができる。水を加えた後に酸を添加して水層のpHを中性にコントロールするのが好ましい。無機塩の除去後は、純度次第では濃縮して溶媒を除去するだけでもよいし、カラム精製してもよい。

[0223] 後処理において用いられる非水溶性溶媒としては、例えば、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルーtert-ブチルエーテル、エチルーtert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類等の溶媒を使用して抽出すればよい。

中でも、一般式(2)で表される化合物の溶解性が高いことから、トルエン、キシレン、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチルーtert-ブチルエーテルが好ましく、コストの面からトルエンがさらに好ましい。

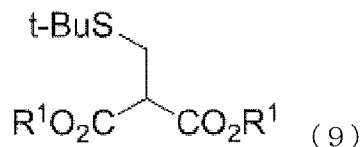
[0224] 前記(viii)～(x)の工程により、出発物質である一般式(2)で表される化合物を製造することが可能である。

[0225] また、以下に述べる(xi)の工程により、(viii)～(x)とは別の方法で、前記一般式(2)で表される化合物を製造することができる。

[0226] <工程(xi)>

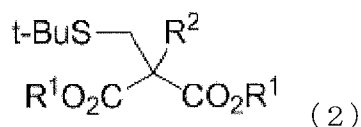
(xi)の工程は、一般式(9)

[化109]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物に、塩基の存在下で、アルキル化剤を作用させて、一般式(2)

[化110]



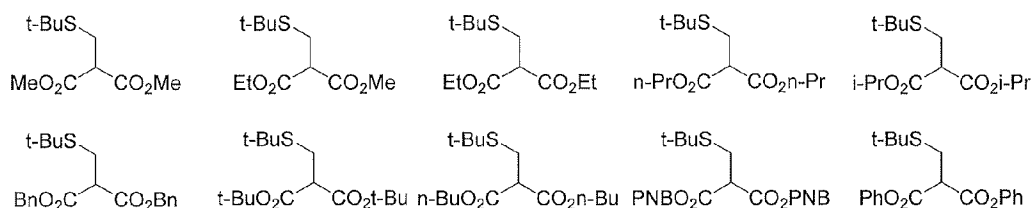
(式中、 R^1 は、前記一般式(9)の R^1 と同義である。 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物を得る工程である。

[0227] 一般式(9)で表される化合物は、例えば国際公開第2010/129066や、Organic synthesis, 1958, 38, 22に記載の方法で合成したメチレンマロン酸ジアルキルにtert-ブチルメルカプタンを作用させることで得られる。

[0228] 前記一般式(9)で表される化合物における前記 R^1 、及び R^2 については、上述の工程(i)の記載と同様である。

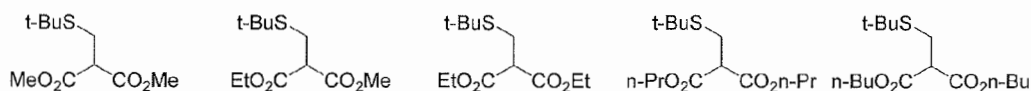
よって、一般式(9)で表される化合物の具体例としては、例えば以下の化合物が挙げられる。

[化111]



上述した化合物の中でも、一般式(9)で表される化合物としては、以下の化合物が好ましい。

[化112]



[0229] また、一般式（９）で表される化合物において R^1 は必ずしも同一である必要は無く、それぞれ異なってもよい。 R^1 が異なる場合、前記一般式（９）で表される化合物には R 体、 S 体の二つのエナンチオマーが存在するが、その混合比については特に制限はない。

[0230] アルキル化剤としては、例えば、 R^2Y 、 $(R^2O)_2SO_2$ （式中、 R^2 は前記一般式（２）と同義であり、 Y はハロゲン原子、又は置換されていてもよい炭素数６～１２のアリールスルホニルオキシ基、炭素数１～１０のアルキルスルホニルオキシ基、及び炭素数７～２０のアラルキルスルホニルオキシ基を表す）等が使用可能である。

前記 Y のハロゲン原子としては、例えば、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。炭素数６～１２のアリールスルホニルオキシ基としては、ベンゼンスルホニルオキシ基、１－ナフタレンスルホニルオキシ基、２－ナフタレンスルホニルオキシ基が挙げられる。炭素数１～１０のアルキルスルホニルオキシ基としては、メタンスルホニルオキシ基、エタンスルホニルオキシ基、プロパンスルホニルオキシ基が挙げられる。炭素数７～２０のアラルキルスルホニルオキシ基としては、ベンジルスルホニルオキシ基等が挙げられる。当該アリールスルホニルオキシ基、アルキルスルホニルオキシ基、アラルキルスルホニルオキシ基が有していてもよい置換基としては、例えば、メチル基、エチル基等の炭素数１～６のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等の炭素数１～６のアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、ニトロ基等が挙げられる。置換基の数は特に限定されないが、置換基が２個以上ある場合は、置換基の種類は同一でも異なってもよい。

R^2 としては塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メタンスルホニルオキシ基、トリフルオロメタンスルホニルオキシ基、４－トルエンスルホニルオキシ

基が好ましい。中でも、臭素原子、ヨウ素原子、メタンスルホニルオキシ基、及び *p*-トルエンスルホニルオキシ基が、反応性の高さから好ましく、ヨウ素原子がさらに好ましい。

[0231] アルキル化剤の使用量は、例えば、一般式（９）で表される化合物に対して 0.7 モル当量～10 モル当量の範囲で適宜設定可能であるが、速やかに反応を進行させて副反応を抑えるために、多少過剰な方がよく、1.0 モル当量～3.0 モル当量が好ましい。また、コストの観点、及び過剰過ぎると副反応が進行しやすいことから、1.1 モル当量～2.0 モル当量がさらに好ましい。

[0232] 塩基としては、例えば、アルカリ金属アルコキシド又はアルカリ金属水素化物が挙げられ、アルカリ金属アルコキシドとしては、リチウムエトキシド、リチウムメトキシド、リチウム *tert*-ブトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウム *tert*-ブトキシド、カリウムエトキシド、カリウムメトキシド、カリウム *tert*-ブトキシド等が挙げられる。アルカリ金属水素化物としては、水素化リチウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が挙げられる。

一般式（９）で表される化合物は、塩基の存在下、*tert*-ブチルチオ基の脱離と付加を繰り返す。脱離が起こると前記一般式（９）はメチレンマロン酸ジアルキルへと変換されるが、ここに求核性のある塩基が存在するとメチレンマロン酸ジアルキルへのマイケル付加反応を起こし、収率が低下する可能性がある。一方、求核性の無い塩基はこのような副反応を起こすことがない。よって前記塩基としては、求核性の無い水素化リチウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物が好ましく、コスト及び安全面の観点から水素化ナトリウムがさらに好ましい。

[0233] 塩基の使用量は、例えば、一般式（９）で表される化合物に対して 0.7 モル当量～10 モル当量の範囲で適宜設定可能である。溶媒等の水分により一部失活しやすいことから 0.9 モル当量～4.0 モル当量が好ましく、また、コスト及び副反応抑制の観点から 1.0 モル当量～2.0 モル当量がさ

らに好ましい。

[0234] 反応溶媒としては、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

中でも、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタン、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等の非プロトン性の極性溶媒は、一般式(9)で表される化合物と塩基が反応して生成する塩の溶解度が高いことから反応を促進する効果があるため好ましい。また、沸点が低く濃縮除去が容易である点から、テトラヒドロフランがさらに好ましい。

[0235] 反応溶媒の使用量は、一般式(9)で表される化合物に対して、例えば、0倍体積量~100倍体積量の範囲で適宜設定可能であるが、塩基の種類によっては反応熱が大きく、溶媒に懸濁させずに実施するのが危険であること、及び、容積効率の観点から、1倍体積量~30倍体積量が好ましく、8倍体積量~20倍体積量がさらに好ましい。

[0236] 反応温度は、例えば、-100℃~200℃の範囲で適宜設定可能であり、-50℃~100℃が好ましい。反応温度が低すぎると一般式(9)で表される化合物と塩基とからなる塩の反応溶媒への溶解量が下がることで反応が遅くなり、反応温度が高すぎると二量体の生成等の副反応が生じる可能性があることから、-10℃~50℃がさらに好ましい。

[0237] 反応時間は、例えば、0時間~30時間の範囲で適宜設定可能であり、5

分～5時間が好ましい。反応時間が長すぎると副反応が生じる可能性があるため、15分～2時間がさらに好ましい。

[0238] この反応の後処理としては、反応液中に析出してくる無機塩をろ過や水洗で除去するのが好ましいが、使用する溶媒次第では反応溶媒へ無機塩が溶解することから、水洗を加えるのがより好ましい。また、反応液に水を加えると水層は塩基性になるため、一般式(8)もしくは一般式(9)で表される化合物中のエステル基の加水分解を抑制するためには、反応液中に低温下で酸性の水を加える、水を加えた後に酸を添加して水層のpHを中性にコントロールする、反応液を酸性の水溶液に添加する等の方法を用いることができ、水を加えた後に酸を添加して水層のpHを中性にコントロールするのが好ましい。無機塩の除去後は、純度次第では濃縮して溶媒を除去するだけでもよいし、カラム精製してもよい。

[0239] 当該工程において後処理の水洗操作に用いられる非水溶性溶媒としては、例えば、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、トリフルオロメチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン等の脂肪族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル類、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類等の溶媒を使用して抽出すればよい。

中でも、ノルマルペンタン、ノルマルヘキサン、ノルマルヘプタン、シクロヘキサン、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、

ジクロロメタンは、沸点が低く除去効率が良いことから好ましく、ジエチルエーテル、ジノルマルプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジノルマルブチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、メチル-*tert*-ブチルエーテル、エチル-*tert*-ブチルエーテルは、抽出効率が良いことからさらに好ましい。

[0240] [新規化合物]

本発明により、以下に示す新規化合物を提供することができる。

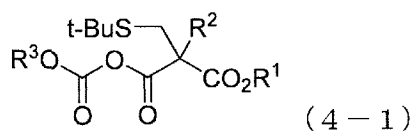
本発明の新規化合物は、本発明の製造方法により製造することができ、また、通常の有機化学手法を用いて、合成することも可能である。

なお、以下の一般式(4-1)、(5)、(6)、および(7S)におけるR₁、R₂、及びR₃の具体例、及び一般式(4-1)、(5)、(6)、および(7S)で表される化合物の具体例は、上述の[一般式(1)で表されるα-置換システイン又はその塩の製造方法]、又は[一般式(1S)で表されるα-置換システイン又はその塩の製造方法]に記載のものと同様である。

<一般式(4-1)で表される化合物>

一般式(4-1)

[化113]

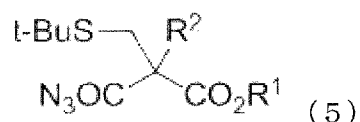


(式中、R₁及びR₃はそれぞれ独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R₂は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

<一般式(5)で表される化合物>

一般式(5)

[化114]

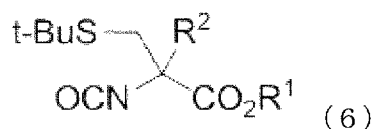


(式中、R¹は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

<一般式(6)で表される化合物>

一般式(6)

[化115]

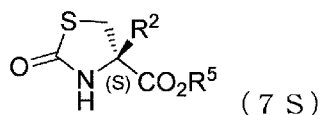


(式中、R¹は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

<一般式(7S)で表される化合物>

一般式(7S)

[化116]



(式中、R²は炭素数1～4のアルキル基を表し、R⁵は、水素原子、又は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物。

実施例

[0241] 以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

本実施例における定量分析は、GC (Gas Chromatography) もしくはHPLC (High Performance Liquid Chromatography) を用い、以下の条件で測定を行った。

<GC-1>

カラム：GLサイエンスTC-5 (0.53mm×300mm、膜厚5μm)

キャリアガス：ヘリウム、カラム流量3.93mL/分 (スプリット比20:1)、入り口圧：22.2kPa、全流量：85.4mL/分 (線速度：30cm/秒)

カラム温度：50℃ (5分保持) → 昇温10℃/分 → 200℃ (10分保持)

インジェクション温度：220℃

ディテクション温度：230℃

検出器：FID、水素：40mL/分、空気：400mL/分、メイクアップガス窒素：30mL/分、信号アッテネーション×2-3

試料注入量：1.0μL

<HPLC-1>

カラム：ナカライテスク COSMOSIL 5C18-MSII (4.6mm×250mm、粒子径5μm)

移動相：50mmol/Lテトラフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル=30/70 (体積比)

流速：1.0mL/分

カラム温度：35℃

検出波長：UV220nm

<HPLC-2>

カラム：ダイセル CHIRALPAK OZ-3R (4.6mm×150

mm)

移動相：0.02重量%テトラフルオロ酢酸水溶液／アセトニトリル＝75／25（体積比）

流速：0.7 mL／分

カラム温度：30℃

検出波長：UV220 nm

<HPLC-3>

カラム：SIELC primesep 100（4.6 mm×150 mm、粒子径5 μm）

移動相：A：0.1重量%トリフロロ酢酸水溶液 B：アセトニトリル

グラジエント（B濃度）：0分10%→15分30%→20分80%

流速：1.0 mL／分

カラム温度：40℃

検出波長：UV210 nm

<HPLC-4>

カラム：資生堂 Chiral CD-Ph（4.6 mm×250 mm、粒子径5 μm）

移動相：（100 mmol／L 過塩素酸＋0.2重量%リン酸）水溶液／アセトニトリル＝99／1（体積比）

流速：0.5 mL／分

カラム温度：30℃

検出波長：205 nm

[0242] [実施例1] 工程(viii)：tert-ブチルチオメタノールの製造

窒素気流下、1 Lの反応器にtert-ブチルメルカプタン240 g（2.66 mol）、ホルマリン（37重量%）216 g（2.66 mol）を室温で加えて攪拌した。60℃で9時間反応させた後、反応器を50℃～60℃の範囲に保ちながらシクロヘキサン160 gを加えて分液抽出し、水相を除去した。その後、シクロヘキサン層を減圧濃縮してシクロヘキサンを留

去し、得られた粗 *tert*-ブチルチオメタノールを 70℃/2.0 kPa で減圧蒸留したところ、*tert*-ブチルチオメタノールが 208 g (1.73 mmol、収率 65.0%) で得られ、<GC-1>での GC 分析の結果、純度は 99 面積% だった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (9H, s), 2.11 (1H, t, $J=6.4$ Hz), 4.83 (2H, d, $J=6.4$ Hz)

[0243] [実施例 2] 工程 (ix) : *tert*-ブチルチオクロロメタンの製造

窒素気流下、3 L の反応器に実施例 1 で製造した *tert*-ブチルチオメタノール 190 g (1.58 mmol)、シクロヘキサン 1.44 kg を室温で加えた。ここに内温を 0℃ に保ちながらピリジン 150 g (1.90 mmol) を加えた。この混合液に、内温を -2℃ ~ 6℃ の範囲に保ちながら塩化チオニル 226 g (1.89 mmol) を滴下した。-4℃ ~ 0℃ の範囲で 1 時間攪拌した後、シクロヘキサン 380 g を添加し、析出した塩をろ別した。得られたろ液を濃縮してシクロヘキサンを留去した後、得られた粗 *tert*-ブチルチオクロロメタンを 57℃/3.0 kPa で減圧蒸留したところ、*tert*-ブチルチオクロロメタンが 140 g (1.01 mmol、収率 63.9%) 得られ、<GC-1>での GC 分析の結果、純度は 98 面積% だった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.42 (9H, s), 4.86 (2H, s)

[0244] [実施例 3] 工程 (x) : 2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルの製造

窒素気流下、3 L の反応器にカリウム-*tert*-ブトキシド 107 g (0.953 mmol)、テトラヒドロフラン 790 g を加えた。そこに内温 18℃ ~ 26℃ の範囲でメチルマロン酸ジエチル 158 g (0.907 mmol) を 30 分かけて滴下した。さらに 30 分攪拌した後、内温 18℃ ~ 26℃ の範囲に保ちながら、実施例 2 で製造した *tert*-ブチルチオクロロメタ

ン 132 g (0.953 mol) を 1 時間かけて滴下した。さらに 3 時間攪拌した後、トルエン 395 g と 2 重量%塩酸 395 g (0.229 mol) を加え 30 分攪拌した後、水層を分離した。続いてトルエン層に水 395 g を加え 1 時間攪拌した後に、分液により水層を除去する操作を 2 回繰り返した。トルエン層を濃縮してトルエンを留去した後、得られた粗 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルにエタノール 250 g を加えて攪拌した後、溶媒を留去する操作を 2 回繰り返した結果、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルが 246 g (0.848 mol、収率 93.5%) 得られ、<GC-1>での GC 分析の結果、GC 純度は 95.2 面積%だった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (6H, t, $J=7.1$ Hz), 1.31 (9H, s), 1.48 (3H, s), 3.03 (2H, s), 4.20 (4H, q, $J=7.1$ Hz)

[0245] [参考例 1] 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]マロン酸ジエチルの製造窒素気流下、100 mL の三つ口フラスコにパラホルムアルデヒド 706 mg (23.5 mmol)、酢酸銅 (I) 一水和物 628 mg (3.15 mmol)、酢酸 1.32 g (22.0 mmol)、トルエン 6.67 mL、マロン酸ジエチル 3.00 g (18.7 mmol) を加えた後、ディーンスターク管を取り付けて 110°C で 6 時間攪拌した。反応液を室温に戻してトルエン 4 mL を加えた後、水 10 mL で 2 回、飽和塩化ナトリウム水溶液 10 mL で 1 回有機層を洗浄した。そこに tert-ブチルメルカプタン 1.00 mL (8.88 mmol) とトリエチルアミン 1.30 mL (9.33 mmol) を加え 25°C で 1.5 時間攪拌した。この反応溶液を飽和塩化アンモニウム水溶液 6 mL で 2 回、飽和塩化ナトリウム水溶液 10 mL で 1 回洗浄した。得られたトルエン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を濃縮してトルエンを留去した後、得られた粗 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]マロン酸ジエチルをシリカゲルカラム

クロマトグラフィーで精製し、2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]マロン酸ジエチル1.32g(5.02mmol、収率26.8%)を得た。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 1.28 (6H, t, $J=7.1\text{ Hz}$), 1.33 (9H, s), 3.03 (2H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 3.51 (1H, t, $J=7.8\text{ Hz}$), 4.17–4.28 (4H, m)

[0246] [実施例4] 工程(xi): 2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルの製造

窒素気流下、50mLの三口フラスコに、テトラヒドロフラン3.50mL、60重量%水素化ナトリウムを0.160g(4.00mmol)を加えて氷冷した。そこに参考例1で製造した2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]マロン酸ジエチル0.700g(2.67mmol)とテトラヒドロフラン3.50mLの混合溶液を滴下した。10分間攪拌した後、ヨウ化メチル0.183mL(2.94mmol)とテトラヒドロフラン2.00mLの混合溶液を15分かけて滴下した。さらにヨウ化メチル0.0410mL(0.659mmol)を2回滴下し、20分攪拌した。水3.5mLを添加した後、*tert*-ブチルメチルエーテル7.0mLで2回、抽出した。*tert*-ブチルメチルエーテル層を合わせた後、飽和食塩水3.5mLで洗浄し、分液した。得られた*tert*-ブチルメチルエーテル層を濃縮し、無色油状物質を0.710g取得した。 $^1\text{H-NMR}$ 解析の結果、この油状物質は、2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルを0.646g(2.34mmol、収率87.6%)含有することが分かった。

[0247] [実施例5] 工程(i): 2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルの製造

窒素気流下、100mLナスフラスコに、2-[(*tert*-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチル4.20g(15.2mmol)

、エタノール 25 mL を加えて 2℃ に冷却し、内温 2℃～5℃ の範囲で 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 16.0 mL (16.0 mmol) を 10 分かけて滴下した。さらに 22℃ で 3 時間攪拌した後、エタノールを留去した。得られた反応液はトルエン 4.2 mL で 2 回洗浄した。水層に 1 mol/L の塩酸を 17 mL 加えて pH 1 に調整した後、トルエン 4.2 mL で 3 回抽出した。トルエン層を合わせて無水硫酸ナトリウム 4.20 g で乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を濃縮してトルエンを留去した後、得られた粗 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、無色油状物質を 3.26 g 得た。¹H-NMR 解析の結果、この油状物質は、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルを 3.16 g (12.7 mmol、収率 83.5%) 含有することが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (3H, t, J=7.1 Hz), 1.31 (9H, s), 1.54 (3H, s), 3.02 (1H, d, J=11.9 Hz), 3.08 (1H, d, J=11.9 Hz), 4.24 (2H, q, J=7.1 Hz)

[0248] [実施例 6] 工程 (ii) : 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-3-[(エトキシカルボニル)オキシ]-2-メチル-3-オキソプロパン酸エチルの製造

窒素気流下、200 mL の四つ口フラスコに、実施例 5 で製造した 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチル 2.21 g (8.90 mmol)、トルエン 28 mL を加え 0℃ に冷却した。ここに内温 1℃～8℃ の範囲でトリエチルアミン 1.36 mL (9.76 mmol) を 2 分間かけて滴下した。続いて、クロロギ酸エチル 932 μL (9.79 mmol) を内温 1℃～8℃ の範囲で 4 分かけて滴下し、内温 0℃ でさらに 1 時間攪拌した。¹H-NMR 解析の結果、この反応液は 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-3-[(エトキシカルボニル)オキシ]-2-メチル

ルー 3 - オキシプロパン酸エチルを含むことが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (3 H, t, $J=7.1$ Hz), 1.32 (9 H, s), 1.35 (3 H, t, $J=7.1$ Hz), 1.55 (3 H, s), 3.03 (1 H, d, $J=12.1$ Hz), 3.09 (1 H, d, $J=12.1$ Hz), 4.24 (2 H, q, $J=7.1$ Hz), 4.32 (2 H, q, $J=7.1$ Hz)

[0249] [実施例 7] 工程 (iii) : 2 - (アジドカルボニル) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] プロパン酸エチルの製造

実施例 6 で製造した 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 3 - [(エトキシカルボニル)オキシ] - 2 - メチルー 3 - オキシプロパン酸エチルを含むトルエン溶液を 0℃まで冷却し、アジ化ナトリウム 908 mg (10.7 mmol) と水 4.4 mL を混合した水溶液を内温 0℃～3℃の範囲で加え、内温 0℃でさらに 6 時間攪拌した。続いて水層を除去し、得られたトルエン層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 10 mL、飽和塩化アンモニウム水溶液 10 mL、飽和食塩水 10 mL で洗浄した。得られたトルエン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、硫酸ナトリウムをろ別した。 $^1\text{H-NMR}$ 解析の結果、この溶液は 2 - (アジドカルボニル) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] プロパン酸エチルを含むことが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (3 H, t, $J=7.1$ Hz), 1.31 (9 H, s), 1.54 (3 H, s), 3.02 (1 H, d, $J=11.9$ Hz), 3.08 (1 H, d, $J=11.9$ Hz), 4.24 (2 H, q, $J=7.1$ Hz)

[0250] [実施例 8] 工程 (iv) : 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルの製造

窒素気流下、300 mL の四つ口フラスコに、実施例 7 で製造した 2 - (アジドカルボニル) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] プロパン酸

エチルを含むトルエン溶液を内温 75℃～80℃の範囲で3時間攪拌し、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-イソシアナトプロパン酸エチルのトルエン溶液を23.1g得た。¹H-NMR解析の結果、この溶液中の2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-イソシアナトプロパン酸エチルの含有量は1.65g(6.72mmol、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルから収率75.5%)だった。得られた測定結果を以下に示す。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.29 (3H, t, J=7.1Hz), 1.30 (9H, s), 1.52 (3H, s), 2.78 (1H, d, J=12.1Hz), 2.98 (1H, d, J=12.1Hz), 4.23 (2H, q, J=7.1Hz)

[0251] [実施例9] 工程(vi-1): 4-メチル-2-オキソ-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸エチルの製造

実施例8で製造した2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-イソシアナトプロパン酸エチルを353mg(1.44mmol)含むトルエン溶液6.01gにp-トルエンスルホン酸一水和物288mg(1.51mmol)をアセトン1.30mLに溶解して加え、内温20℃で2.5時間攪拌した。続いて溶媒を濃縮し、水を1.4mL加えた後、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH7に調製した。トルエン1.1mLで4回、tert-ブチルメチルエーテル1.1mLで2回抽出した後、得られた有機層をまとめて濃縮し、薄黄色油状物を得た。¹H-NMR解析の結果、この油状物質は、4-メチル-2-オキソ-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸エチルを含むことが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.32 (3H, t, J=7.1Hz), 1.61 (3H, s), 3.30 (1H, d, J=11.4Hz), 3.82 (1H, d, J=11.4Hz), 4.27 (2H, q, J=7.1Hz)

[0252] [実施例10] 工程(vi-2)及び工程(vii): 4-メチル-2-オキ

ソー１，３－チアゾリジン－４－カルボン酸及び α －メチルシステイン塩酸塩の製造

窒素気流下、実施例９で製造した４－メチル－２－オキソー１，３－チアゾリジン－４－カルボン酸エチルを含む油状物を５０ｍＬナスフラスコに入れ、６ｍｏｌ／Ｌの塩酸９．４ｍＬ（５６ｍｍｏｌ）を加えた後、内温１００℃で１０時間攪拌した。この反応液の¹H－NMR解析の結果、この反応液は４－メチル－２－オキソー１，３－チアゾリジン－４－カルボン酸を含むことが分かった。¹H－NMR（４００MHz，D₂O） δ １．５２（３H，s），３．４０（１H，d，J＝１１．６Hz），３．６９（１H，d，J＝１１．６Hz）

続いて、この反応液をさらに内温１００℃で３０時間攪拌した。この反応液の¹H－NMR解析の結果、この反応液は α －メチルシステイン塩酸塩を含むことが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

¹H－NMR（４００MHz，D₂O） δ １．５３（３H，s），２．８４（１H，d，J＝１５．０Hz），３．１１（１H，d，J＝１５．０Hz）

[0253] [実施例１１] 工程（i）における加水分解酵素遺伝子のクローニング

バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）Thailー８株由来加水分解酵素カルボキシエステラーゼNP（CENP、GenBank Accession No. AAC43262、配列番号２）をコードする遺伝子配列（cenp、配列番号１）を元に、cenp遺伝子の全長を増幅させるためのプライマーnpfw（配列番号１９）とnprv（配列番号２０）を設計、合成した。バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC3108株、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC3215株、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC3335株、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC14144株、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC14191株、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）NBRC

14473株、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) NBRC101246株、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) NBRC101590株、の染色体DNAを鋳型とし、プライマーnpfw (配列番号19) とnpv (配列番号20) を用いて常法に従ってPCR反応を行った。その結果、それぞれ約1.0kbp、計8種のDNA断片を得た。

得られた計8種のDNA断片をそれぞれ制限酵素EcoRI、XbaIにより消化した。得られたDNA断片を、それぞれ、定法に従って、MunI、XbaIにより消化したPCT/JP2011/069680に記載のプラスミドpKW32のtrcプロモーターの下流に導入し、プラスミドpKCENP1、pKCENP2、pKCENP3、pKCENP4、pKCENP5、pKCENP6、pKCENP7、pKCENP8を得た。

得られた計8種のプラスミドに挿入された加水分解酵素遺伝子の配列を常法に従って解読した。各遺伝子配列は、それぞれcenp-1 (配列番号3)、cenp-2 (配列番号5)、cenp-3 (配列番号7)、cenp-4 (配列番号9)、cenp-5 (配列番号11)、cenp-6 (配列番号13)、cenp-7 (配列番号15)、cenp-8 (配列番号17) であった。各遺伝子がコードする加水分解酵素のアミノ酸配列は、それぞれCENP-1 (配列番号4)、CENP-2 (配列番号6)、CENP-3 (配列番号8)、CENP-4 (配列番号10)、CENP-5 (配列番号12)、CENP-6 (配列番号14)、CENP-7 (配列番号16)、CENP-8 (配列番号18) であった。

得られた計8種のプラスミドを用いて、大腸菌JM109 (タカラバイオ株式会社製) を常法に従い形質転換し、組換え大腸菌JM109/pKCENP1、JM109/pKCENP2、JM109/pKCENP3、JM109/pKCENP4、JM109/pKCENP5、JM109/pKCENP6、JM109/pKCENP7、JM109/pKCENP8を得た。当該遺伝子を発現する菌体を得るために、各組換え大腸菌について力

ナマイシン、及び *lac* プロモーター誘導物質を含む液体 LB 培地を用いて 30℃ で培養し、培養約 20 時間目に集菌した。

得られた加水分解酵素のアミノ酸配列 CENP-1（配列番号 4）に対する、得られたその他の加水分解酵素のアミノ酸配列（配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18）の相同性を、BLAST を用いてそれぞれ算出し、表 1 に示す。

また、加水分解酵素のアミノ酸配列 CENP-1（配列番号 4）に対する、市販酵素バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）由来プロテアーゼ（市販酵素、シグマーアルドリッチ社製）、及びブタ肝臓由来エステラーゼ（市販酵素、シグマーアルドリッチ社製）のアミノ酸配列の相同性を、BLAST を用いて検索したところ、いずれも相同性は示されなかった。

[0254] [表1]

表 1

加水分解酵素 のアミノ酸配列	配列番号	<i>Bacillus subtilis</i> IFO3108 由来カルボキシエステ ラーゼ NP（配列番号 4）と の相同性
CENP-1	4	100%
CENP-2	6	99%
CENP-3	8	99%
CENP-4	10	99%
CENP-5	12	99%
CENP-6	14	99%
CENP-7	16	99%
CENP-8	18	99%

[0255] [実施例 12] 工程（i）における加水分解酵素のスクリーニング

100 mmol/L リン酸カリウムを含む水溶液中で、実施例 11 で得られた 8 種の菌体各々と、30 g/L の 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルとを混合し、30℃、pH 7 の条件で一

晩振盪させながら反応させた。また、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来プロテアーゼ (シグマーアルドリッチ社製) についても同条件で一晩振盪させながら反応させた。

各々の反応後の溶液 $200\ \mu\text{L}$ に対し $1\ \text{mol/L}$ 塩酸 $100\ \mu\text{L}$ を添加し反応を停止させた後、 $10000\ \text{rpm}$ で遠心分離を行った。得られた遠心分離後の上清 $50\ \mu\text{L}$ は、 50 体積%アセトニトリル、及び $50\ \text{mmol/L}$ トリフルオロ酢酸溶液 $950\ \mu\text{L}$ と混合した後、＜HPLC-2＞の条件により光学純度分析を行った。

また、市販酵素バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来エステラーゼ BS1 (ユーリッヒファインケミカルズ社製)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来エステラーゼ BS3 (ユーリッヒファインケミカルズ社製)、又は、ブタ肝臓由来エステラーゼ (シグマーアルドリッチ社製) の菌体各々と、 $5\ \text{g/L}$ の 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルとを、 $100\ \text{mmol/L}$ リン酸カリウムを含む水溶液中で、 30°C 、 $\text{pH}\ 7$ の条件で一晩振盪させながら反応させた。反応後の溶液 $250\ \mu\text{L}$ に対し $250\ \mu\text{L}$ のアセトニトリルを加えた後、 $10000\ \text{rpm}$ で遠心分離を行った。得られた遠心分離上清を＜HPLC-2＞の条件で分析し、生成した 2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルの光学純度分析を行った。

これらの結果を表 2、及び図 2 に示す。

[0256]

[表2]

表 2

組換え大腸菌、又は酵素名	S体光学純度 ee (%)
JM109/pKCENP1	99.8
JM109/pKCENP2	99.7
JM109/pKCENP3	99.7
JM109/pKCENP4	99.8
JM109/pKCENP5	99.8
JM109/pKCENP6	99.8
JM109/pKCENP7	99.6
JM109/pKCENP8	99.8
バチルス・リケニフォルミス (<i>Bacillus licheniformis</i>) 由来プロテアーゼ (市販酵素、シグマーアルドリッチ社製)	94.5
バチルス・ステアロサーモフィルス (<i>Bacillus stearothermophilus</i>) 由来エステラーゼBS1 (市販酵素、ユーリッヒファインケミカルズ社製)	-95.4
バチルス・ステアロサーモフィルス (<i>Bacillus stearothermophilus</i>) 由来エステラーゼBS3 (市販酵素、ユーリッヒファインケミカルズ社製)	-95.4
ブタ肝臓由来エステラーゼ(市販酵素、シグマーアルドリッチ社製)	-84.3

[0257] [実施例13] 工程(i) : (S)-2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルの製造

1 Lのジャーファーメンター(エイブル社製、型式BMJ)に、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルを14.4 g (52.1 mmol)、1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7)を65.0 g、実施例11で調製した組換え大腸菌JM109/pKCENP1を26.0 g、脱塩水555 gを投入した後、充分に混合した。その後、30℃、500 rpmで16時間反応させた。反応中、20重量%水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.0に維持した。反応完了は<HPLC1>の条件で分析し、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチルの消失を確認することで判断した。

得られた反応液を8000 rpmで遠心分離し、反応液上清を得た。その

後、0.2 μ mの細孔の精密濾過膜処理により菌体を除去し、さらに分画分子量10000の限外ろ過膜処理を行った。得られたろ液に対しトルエンを160 mL加え、十分に攪拌した後に分液することで、残存する2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸ジエチル等の不純物を有機層に除去し、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルを含む水層を得た。水層のpHを6 mol/L硫酸を用いてpH2.0まで低下させた後、トルエンを160 mL加え十分に攪拌することでトルエン層に2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルを抽出した。残った水層に対してトルエンを160 mL加え十分に攪拌することで水層に残存する2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルもトルエン層に抽出した。

得られたトルエン溶液を<HPLC1>の条件で分析した結果、2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチル11.7 g (47.1 mmol、収率90.4%)が得られたことを確認した。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (3H, t, $J=7.1$ Hz), 1.31 (9H, s), 1.54 (3H, s), 3.02 (1H, d, $J=11.9$ Hz), 3.08 (1H, d, $J=11.9$ Hz), 4.24 (2H, q, $J=7.1$ Hz)

<HPLC-2>の条件で光学純度を分析した結果、得られた2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチルの立体配置は(S)であり、光学純度は99.8% e. e.であった。

[0258] [実施例14] 工程(ii): (R)-2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-3-[(エトキシカルボニル)オキシ]-2-メチル-3-オキソプロパン酸エチルの製造

窒素気流下、300 mLの四つ口フラスコに、実施例13で製造した(S)-2-[(tert-ブチルチオ)メチル]-2-メチルマロン酸エチル22.4 g (90.1 mmol)、トルエン130 mLを加えた。これを5

℃に冷却した後、内温 5℃～10℃の範囲でトリエチルアミン 10.0 g (99.1 mmol) を 5 分かけて滴下した。窒素気流下、500 mL の四つ口フラスコにクロロギ酸エチル 10.8 g (99.2 mmol)、トルエン 22.4 mL を加え、5℃まで冷却した。ここに先に調製した (S) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] - 2 - メチルマロン酸エチルのトリエチルアミン塩のトルエン溶液を内温 5℃～12℃の範囲で 15 分かけて滴下した。続いて内温 5℃のままさらに 1 時間攪拌した。¹H - NMR 解析の結果、このトルエン溶液は (R) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] - 3 - [(エトキシカルボニル) オキシ] - 2 - メチル - 3 - オキソプロパン酸エチルを含む溶液であることを確認した。得られた測定結果を以下に示す。

¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.32 (9H, s), 1.35 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.55 (3H, s), 3.03 (1H, d, J = 12.1 Hz), 3.09 (1H, d, J = 12.1 Hz), 4.24 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.32 (2H, q, J = 7.1 Hz)

[0259] [実施例 15] 工程 (iii) : (S) - 2 - (アジドカルボニル) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] プロパン酸エチルの製造

実施例 14 で製造した (R) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] - 3 - [(エトキシカルボニル) オキシ] - 2 - メチル - 3 - オキソプロパン酸エチルのトルエン溶液を 2℃まで冷却し、アジ化ナトリウム 9.19 g (108 mmol) と水 40 mL を混合した水溶液を内温 2℃～4℃の範囲で 4 分かけて滴下した。内温 2℃でさらに 1 時間攪拌した後、1 mol/L の塩酸 60 mL (60.0 mmol) を内温 2℃～3℃の範囲で 10 分かけて滴下した。トルエン層と水層に分液した後、水層はトルエン 45 mL を加えて再度抽出し、先のトルエン層と合わせて、5 重量%炭酸水素ナトリウム水溶液 35 mL 洗浄した。得られたトルエン層に無水硫酸マグネシウム 11.2 g を加え、0℃で 2 時間攪拌した後、ろ過した。ろ別した硫酸マグネシ

ウムはトルエン 11 mL で洗浄し、洗浄液はろ液と混合した。得られたトルエン溶液を $^1\text{H-NMR}$ 解析した結果、このトルエン溶液は (S) - 2 - (アジドカルボニル) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル]プロパン酸エチルを含むことが分かった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (3 H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.31 (9 H, s), 1.54 (3 H, s), 3.02 (1 H, d, $J = 11.9$ Hz), 3.08 (1 H, d, $J = 11.9$ Hz), 4.24 (2 H, q, $J = 7.1$ Hz)

[0260] [実施例 16] 工程 (iv) : (S) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルの製造

窒素気流下、500 mL の四つ口フラスコにトルエン 45 mL を加え、85°C に加熱した。ここに、実施例 15 で製造した (S) - 3 - (アジドカルボキシ) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル]プロパン酸エチルを 23.3 g (85.3 mmol) 含むトルエン溶液を内温 84°C ~ 91°C の範囲で 4 時間かけて滴下した。滴下後さらに 85°C で 1 時間攪拌し、(S) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルのトルエン溶液を得た。 $^1\text{H-NMR}$ 解析の結果、このトルエン溶液に含まれる (S) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルは 21.5 g (87.6 mmol)、(S) - 2 - [(tert-ブチルチオ)メチル] - 2 - メチルマロン酸エチルからの収率 97.2% だった。得られた測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (3 H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.30 (9 H, s), 1.52 (3 H, s), 2.78 (1 H, d, $J = 12.1$ Hz), 2.98 (1 H, d, $J = 12.1$ Hz), 4.23 (2 H, q, $J = 7.1$ Hz)

[0261] [実施例 17] 工程 (vi-1) 及び工程 (vi-2) : (S) - 4 - メチル - 2 - オキソ - 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸エチル及び (S) - 4 - メチル - 2 - オキソ - 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸の製造

窒素気流下、200 mL の四つ口フラスコに (S) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルを 11.2 g (45.6 mmol) 含むトルエン溶液 39.2 g を加えた。ここに 35 重量%塩酸 9.19 g (88.4 mmol) を加え、25℃で 45 分攪拌した。この反応液のトルエン層を ^1H -NMR 解析した結果、(S) - 4 - メチルー 2 - オキソー 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸エチルを含むことが分かった。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.32 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.60 (3H, s), 3.28 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 3.80 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.26 (2H, q, $J = 7.1$ Hz)

続いてこの反応液を内温 60℃～70℃に昇温してさらに 1 時間攪拌した。トルエンを留去した後、水 22.6 g、35 重量%塩酸 2.40 g (23.0 mmol) を加え、内温 70℃～90℃の範囲で 4 時間攪拌した。室温に冷却した後、析出した結晶をろ過によって取得した。得られた結晶をトルエン 23 mL、水 23 mL で洗浄し、白色結晶 5.97 g を得た。<HPLC - 3>の条件での HPLC 分析の結果、この白色結晶は (S) - 4 - メチルー 2 - オキソー 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸を 5.56 g (34.5 mmol、収率 75.7%) 含むことが分かった。得られた化合物の測定結果を以下に示す。

^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.52 (3H, s), 3.40 (1H, d, $J = 11.6$ Hz), 3.69 (1H, d, $J = 11.6$ Hz)

[0262] [実施例 18] 工程 (vi - 1) 及び工程 (vi - 2) : (S) - 4 - メチルー 2 - オキソー 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸エチル及び (S) - 4 - メチルー 2 - オキソー 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸の製造 : (S) - 4 - メチルー 2 - オキソー 1, 3 - チアゾリジン - 4 - カルボン酸の製造

窒素気流下、50 mL の試験管に (S) - 2 - [(tert - ブチルチオ) メチル] - 2 - イソシアナトプロパン酸エチルを 1.33 g (5.4 mmol)

o l) 含むトルエン溶液 4.62 g を加えた。ここに p-トルエンスルホン酸 1 水和物 1.52 g (5.4 mmol) を加え、室温で 60 分攪拌した後、同温度にて 2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 8 mL (16.0 mmol) を加えた。1.5 時間攪拌の後、トルエン層を分液操作にて除去した。得られた水層に、室温で 98 重量%硫酸 0.4 g を添加すると、結晶が析出した。混合物を内温 5℃ まで冷却後、析出している結晶をろ過によって取得した。得られた結晶を少量の水で洗浄し、(S)-4-メチル-2-オキソ-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸 0.70 g (4.3 mmol、収率 79.6%) を得た。

[0263] [実施例 19] 工程 (vii) : α -メチル-D-システイン塩酸塩の製造
窒素気流下、100 mL の四つ口フラスコ、実施例 17 で製造した (S)-4-メチル-2-オキソ-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸 3.72 g (23.1 mmol) を含む白色固体 4.00 g を加えた。ここに 35 重量%塩酸 60 mL (720 mmol) を加えた後、内温 100℃ に加熱して 51 時間攪拌した。35 重量%塩酸を留去し、トルエン 5 mL を加えて 35 重量%塩酸を共沸留去する操作を 2 回繰り返した。得られた粗 α -メチル-D-システイン塩酸塩の固体に 2-プロパノール 12 mL を加え、50℃ に加熱して溶解させた。この溶液にトルエン 20 mL を加えた後、8.56 g の溶媒を留去し、残った溶液を 2 時間かけて 0℃ まで冷却し、生成した結晶をろ過によって取得した。得られた結晶はトルエン 4 mL で洗浄した後、20℃ で 1.5 時間減圧乾燥し、2.89 g の白色結晶を得た。＜HPLC-3＞の条件での HPLC 分析の結果、この白色結晶は α -メチル-D-システイン塩酸塩を 2.71 g (収率 68.4%) 含むことが分かった。＜HPLC-4＞の条件での HPLC 分析の結果から、光学純度は 99.9% e.e. であった。得られた化合物の測定結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 1.53 (3H, s), 2.84 (1H, d, $J=15.0\text{ Hz}$), 3.11 (1H, d, $J=15.0\text{ Hz}$)

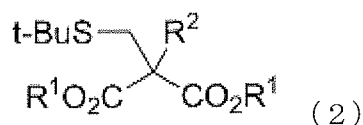
産業上の利用可能性

[0264] 本発明では、医薬品等の中間体として有用な、光学活性 α -置換システイン又はその塩を、入手容易であり安価な原料によって、より簡便に短時間で安全に製造でき、工業的規模において安定生産が可能である。

請求の範囲

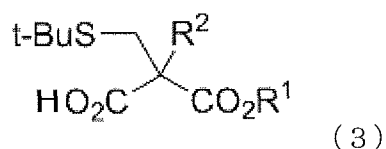
[請求項1] 工程 (i) 一般式 (2)

[化1]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、塩基、酸、又はエステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／若しくは該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させて、一般式(3)

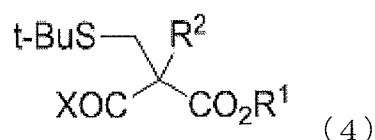
[化2]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(2)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物を得る工程；

工程(ii) 前記一般式(3)で表される化合物に、縮合剤又は酸ハロゲン化剤を作用させて、一般式(4)

[化3]

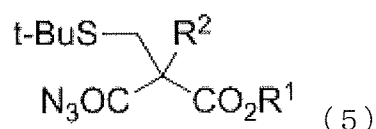


(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(2)の R^1 及び R^2 と同義であり、 X は $-\text{OP}(\text{O})(\text{OPh})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^3$ 又はハロゲン原子を表し、 R^3 は置換されていてもよい炭

素数 1 ～ 10 のアルキル基、置換されていてもよい炭素数 7 ～ 20 のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数 6 ～ 12 のアリール基を表す。) で表される化合物を得る工程；

工程 (iii) 前記一般式 (4) で表される化合物に、アジド化剤を作用させて、一般式 (5)

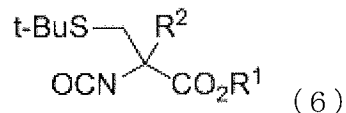
[化4]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式 (2) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物を得る工程；

工程 (iv) 前記一般式 (5) で表される化合物を、クルチウス転位反応によって変換し、一般式 (6)

[化5]



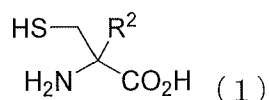
(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式 (2) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物を得る工程；及び

工程 (v) 前記一般式 (6)

で表される化合物のイソシアネート基をアミノ基へと変換する工程、エステル基を加水分解する工程、及び酸を作用させて tert-ブチル基を除去する工程；

を含むことを特徴とする、一般式 (1)

[化6]



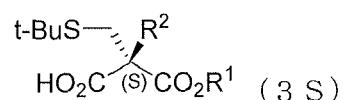
(式中、 R^2 は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。) で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[請求項2] 前記工程 (i) において、

前記酵素が、(A) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16 若しくは 18 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

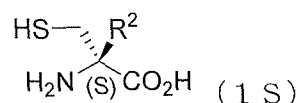
(B) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16 若しくは 18 のアミノ酸配列と 35% 以上の同一性を有し、かつ、前記一般式 (2) で表される化合物を加水分解し、前記一般式 (3) で表される化合物のうち立体配置が S 体である一般式 (3 S)

[化7]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式 (3) の R^1 及び R^2 と同義である。) で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質、又は、(C) 配列番号 4、6、8、10、12、14、16 若しくは 18 で表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式 (2) で表される化合物を加水分解し、前記一般式 (3) で表される化合物のうち立体配置が S 体である一般式 (3 S) で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質であり、前記一般式 (1) で表される α -置換システインが、以下の立体配置が S である一般式 (1 S)

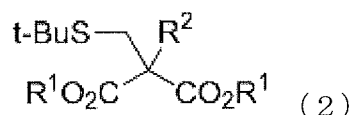
[化8]



(式中、 R^2 は前記一般式 (1) の R^2 と同義である。) で表される α -置換システインである、請求項 1 に記載の α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[請求項3] 工程 (i) 一般式 (2)

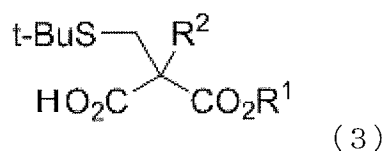
[化9]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物にエステル基を加水分解する活性を有する酵素、該酵素を生産する能力を有する細胞、該細胞の処理物、及び／又は該細胞を培養して得られた該酵素を含む培養液を作用させる工程；

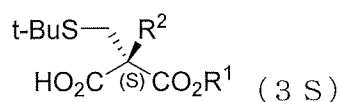
を含むことを特徴とする、前記一般式(3)

[化10]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(2)における R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物のうち、立体配置がS体である一般式(3S)

[化11]



(式中、 R^1 及び R^2 は、前記一般式(2)における R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[請求項4]

前記酵素が、

(A) 配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(B) 配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18

のアミノ酸配列と35%以上の同一性を有し、かつ、前記一般式(2)で表される化合物を加水分解し、立体配置がS体である前記一般式(3S)で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質、又は、

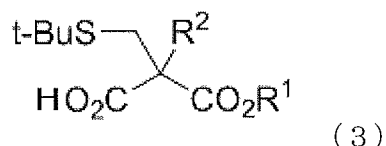
(C) 配列番号4、6、8、10、12、14、16若しくは18で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、前記一般式(2)で表される化合物を加水分解し、立体配置がS体である前記一般式(3S)で表される化合物へと変換させる活性を有するタンパク質である、

請求項3に記載の前記一般式(3S)で表される化合物の製造方法

。

[請求項5] 工程(ii)一般式(3)

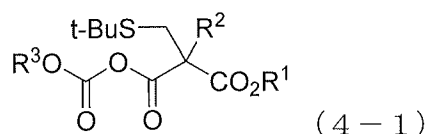
[化12]



(式中、R¹は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、クロロギ酸エステルを作用させる工程；

を含むことを特徴とする、一般式(4-1)

[化13]

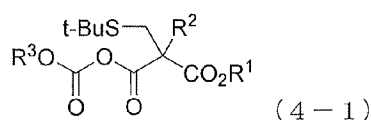


(式中、R¹及びR²は前記一般式(3)のR¹及びR²と同義である

。R³は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物の製造方法。

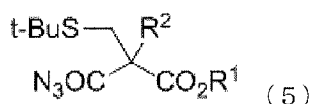
[請求項6] 工程(iii)一般式(4-1)

[化14]



(式中、R¹とR³はそれぞれ独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、アジド化金属類を作用させる工程；を含むことを特徴とする、一般式(5)

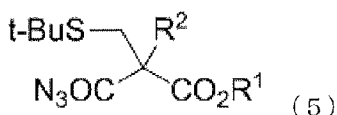
[化15]



(式中、R¹及びR²は前記一般式(4-1)のR¹及びR²と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[請求項7] 工程(iv)一般式(5)

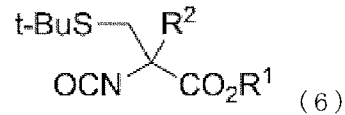
[化16]



(式中、R¹は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、R²は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物を、クルチウス転位反

応により変換する工程；
 を含むことを特徴とする、
 一般式（６）

[化17]

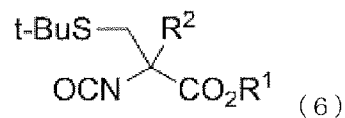


（式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式（５）の R^1 及び R^2 と同義である。）で表される化合物の製造方法。

[請求項8]

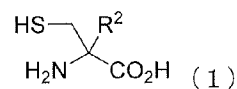
工程（v）一般式（６）

[化18]



（式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数１～１０のアルキル基、置換されていてもよい炭素数７～２０のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数６～１２のアリール基を表し、 R^2 は炭素数１～４のアルキル基を表す。）で表される化合物のイソシアネート基をアミノ基へと変換する工程、エステル基を加水分解する工程、及び酸を作用させてtert-ブチル基を除去する工程；
 を含むことを特徴とする一般式（１）

[化19]



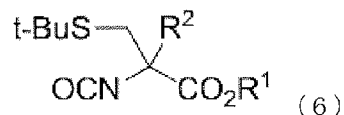
（式中、 R^2 は前記一般式（６）の R^2 と同義である。）で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[請求項9]

前記工程（v）が、

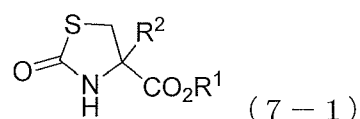
工程（vi-1）一般式（６）

[化20]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(6)の R^1 及び R^2 と同義である。
。)で表される化合物に酸を作用させチアゾリジノン環を構築することにより一般式(7-1)

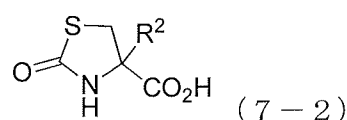
[化21]



(式中、 R^1 、及び R^2 は前記一般式(6)の R^1 、及び R^2 と同義である。
。)で表される化合物へと変換する工程；

工程(vi-2) 前記一般式(7-1)で表される化合物に酸、又は塩基を作用させてエステル基を加水分解することにより、一般式(7-2)

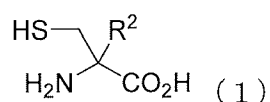
[化22]



(式中、 R^2 は前記一般式(7-1)の R^2 と同義である。)で表される化合物を得る工程；及び

工程(vii) 前記一般式(7-2)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させてチアゾリジノン環を開環し、前記一般式(1)で表される α -置換システイン又はその塩を製造する工程；
を含むことを特徴とする請求項8に記載の一般式(1)

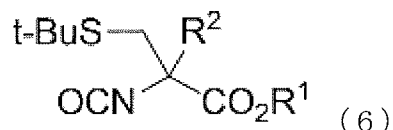
[化23]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

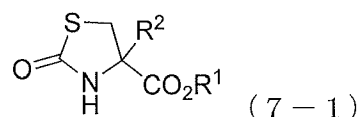
[請求項10] 工程(vi-1)一般式(6)

[化24]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸を作用させてチアゾリジノン環を構築する工程；
を含むことを特徴とする、一般式(7-1)

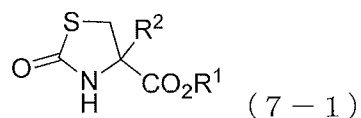
[化25]



(式中、 R^1 及び R^2 は前記一般式(6)の R^1 及び R^2 と同義である。)で表される化合物の製造方法。

[請求項11] 工程(vi-2)一般式(7-1)

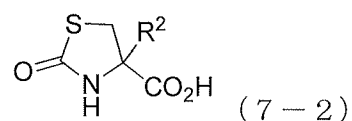
[化26]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物に、酸又は塩基を作用させてエステル基を加水分解する工程；

を含むことを特徴とする、一般式（7-2）

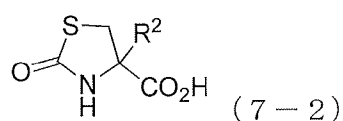
[化27]



（式中、 R^2 は前記一般式（7-1）の R^2 と同義である。）で表される化合物の製造方法。

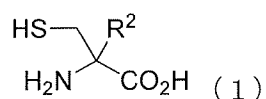
[請求項12] 工程（vii）一般式（7-2）

[化28]



（式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で表される化合物に、酸又は塩基を作用させチアゾリジノン環を開環する工程；
を含むことを特徴とする、一般式（1）

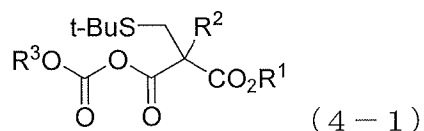
[化29]



（式中、 R^2 は前記一般式（7-2）の R^2 と同義である。）で表される α -置換システイン又はその塩の製造方法。

[請求項13] 一般式（4-1）

[化30]

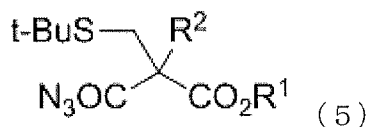


（式中、 R^1 及び R^3 はそれぞれ独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で表される

化合物。

[請求項14] 一般式 (5)

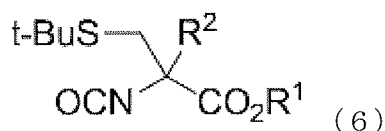
[化31]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

[請求項15] 一般式 (6)

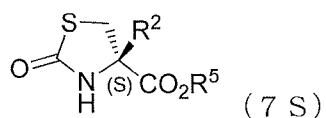
[化32]



(式中、 R^1 は置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表し、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物。

[請求項16] 一般式 (7 S)

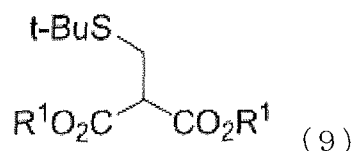
[化33]



(式中、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表し、 R^5 は、水素原子、又は、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物。

[請求項17] 工程 (xi) 一般式 (9)

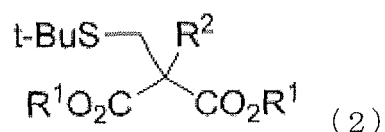
[化34]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10のアルキル基、置換されていてもよい炭素数7～20のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数6～12のアリール基を表す。)で表される化合物を、塩基の存在下、アルキル化剤と作用させる工程；

を含むことを特徴とする、一般式(2)

[化35]



(式中、 R^1 は前記一般式(9)の R^1 と同義であり、 R^2 は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で表される化合物の製造方法。

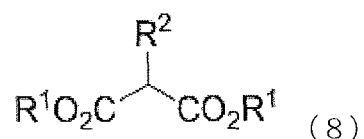
[請求項18]

工程(viii) tert-ブチルメルカプタンとホルムアルデヒドとを反応させ、tert-ブチルチオメタノールを得る工程；

工程(ix) tert-ブチルチオメタノールを塩基の存在下、クロル化剤と反応させ、tert-ブチルチオクロロメタンを得る工程；及び

工程(x) tert-ブチルチオクロロメタンを塩基の存在下、一般式(8)

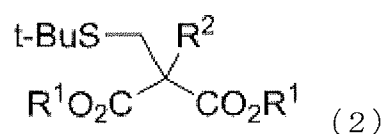
[化36]



(式中、 R^1 は、独立して、置換されていてもよい炭素数1～10の

アルキル基、置換されていてもよい炭素数 7 ～ 20 のアラルキル基、又は、置換されていてもよい炭素数 6 ～ 12 のアリール基を表し、 R^2 は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。) で表される化合物と作用させ、前記一般式 (2) で表される化合物を得る工程；
を含むことを特徴とする一般式 (2)

[化37]



(式中、 R^1 は前記一般式 (8) の R^1 と同義であり、 R^2 は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。) で表される化合物の製造方法。