



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

Int. Cl.³ C07D 277/34

Zgłoszono: 80.10.24 (P. 227474)

Pierwszeństwo: 79.10.29 Stany Zjednoczone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 81.09.18

Opis patentowy opublikowano: 1985 05 31



Twórca wynalazku ———

Uprawniony z patentu: PFIZER Inc.,
Nowy Jork (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego, półproduktu użytecznego do syntezy peptydów. W szczególności, N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego stosuje się w reakcji z niższymi estrami alkilowymi L-feniloalaniny i otrzymuje się w ten sposób niższe estry alkilowe L-asparaginylo-L-feniloalaniny, użyteczne jako silne środki słodzące do produktów żywnościowych i napojów. Szczególnie korzystny jako środek słodzący jest ester metylowy.

Wytwarzanie N-tiokarboksybezwodników aminokwasów zostało opisane w J. Org. Chem. 36, 49 (1971). Jedną z interesujących metod jest reakcja N-alkoksytiokarbonyloaminokwasu z trójhalogenkiem fosforu. Aby można było stosować N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego jako półprodukt do wytwarzania niższych estrów alkilowych L-asparaginylo-L-feniloalaniny przeznaczonych dla produktów żywnościowych, trzeba go móc otrzymać w stanie czystym z dobrą wydajnością.

W znanych sposobach wytwarzania pochodnych aminokwasów jako rozpuszczalniki stosuje się zwykle benzen, ster lub esterowodorofuran. W sposobie wytwarzania N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego z kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego nie można stosować benzenu jako rozpuszczalnika, ponieważ wyjściowa pochodna aminokwasu nie rozpuszcza się w benzenie. Pozostałe dwa rozpuszczalniki mają również pewne wady. W esterowodorofuranie rozpuszcza się bardzo dobrze wyjściowy kwas N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowy, ale i produkt, czyli N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego. W związku z tym, otrzymanego produktu nie można łatwo wyodrębnić z roztworu w esterowodorofuranie, a odparowywanie rozpuszczalnika daje produkt mocno zanieczyszczony. Eter stosowany również jako rozpuszczalnik nie może być jednak używany w skali przemysłowej ze względu na palność i łatwość eksplozji. Wady te dyskwalifikują eter jako rozpuszczalnik, mimo, że posiada on dogodną charakterystykę rozpuszczalności zarówno wobec substancji wyjściowej jak i produktu.

Wymienione wady znanych rozpuszczalników reakcji skłoniły do poszukiwań lepszego rozpuszczalnika, który zgodnie z potrzebami, pozwoli na otrzymanie czystego produktu z wysoką wydajnością.

W toku badań stwierdzono, że różne pochodne aminokwasów mają różne charakterystyki rozpuszczalności, zależne od wielu czynników, takich jak ciężar cząsteczkowy, obecność grup funkcyjnych i podobne, użyteczność jednego rozpuszczalnika do wytwarzania określonego N-tiokarboksybezwodnika aminokwasu nie stanowi wystarczającej wskazówki, że będzie on odpowiedni do wytwarzania innych pochodnych. Należy podkreślić wyjątkową strukturę N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego w stosunku do N-tiokarboksybezwodników kwasowych, ponieważ posiada on grupę β -karboksylową stwierdzono, że jeżeli reakcję kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego z trójhalegenkiem fosforu prowadzi się w octanie niższego alkilu, to N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego wypada z roztworu podczas reakcji i może być łatwo i z dobrą wydajnością odyzyskiwany w bardzo czystej postaci, bez konieczności dalszego rozdzielania i oczyszczania.

Stwierdzenie, że octany alkilowe są odpowiednimi rozpuszczalnikami reakcji kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego z trójhalegenkiem fosforu było złamaniem pewnych utartych sposobów myślenia, gdyż zwykle jako rozpuszczalniki stosuje się substancje pozbawione reaktywnych grup funkcyjnych.

W sposobie według wynalazku zastosowano z korzyścią rozpuszczalnik posiadający estrową grupę funkcyjną, chociaż zanim przeprowadzono doświadczenia nie było wiadomo, czy grupa ta pozostanie trwała w warunkach reakcji (literatura dotycząca przedmiotu nie zawiera informacji na ten temat), ani czy badany rozpuszczalnik spełni stawiane mu wymagania, tj. czy będzie dobrym rozpuszczalnikiem dla związków wyjściowych stosowanych w reakcji a złym, powodującym wytrącenie, dla wytwarzanego produktu.

Sposób według wynalazku polega na tym, że N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego otrzymuje się w reakcji, w której 0,75–1,25 molarne roztwór kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego o 1–3 atomach węgla w grupie alkoksylowej, w octanie alkilu o 1–4 atomach węgla w grupie alkilowej, poddaje się reakcji z trójhalegenkiem fosforu, takim jak trójbromek fosforu lub trójlchlorek fosforu, w temperaturze od 10°C do 50°C, korzystnie 20–40°C, a następnie wyodrębnia się otrzymany stały N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego. Korzystnymi octanami niższego alkilu są octan etylu i octan metylu, najbardziej korzystny jest octan etylu.

Zaletą sposobu według wynalazku w stosunku do znanego sposobu wytwarzania N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego jest duża czystość otrzymanego produktu, co jest bardzo ważne ze względu na stosowanie go w produktach żywnościowych, a ponadto wysoka wydajność. Wydajność procesu prowadzonego sposobem według wynalazku wynosi zwykle 72–95%, a tylko w niektórych przypadkach jest niższa, gdyż wynosi 65 lub 63%. Nawet te niższe wydajności procesu są takie same albo wyższe niż wydajności uzyskiwane znanym sposobem, w którym otrzymany produkt był znacznie bardziej zanieczyszczony.

N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego o wzorze 1 otrzymuje się w reakcji kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego o 1–3 atomach węgla w grupie alkoksylowej o wzorze 2, w którym alkoksyl jest etoksylem, z takim trójhalegenkiem fosforu, jak trójbromek lub trójlchlorek fosforu, prowadzonej zgodnie ze schematem na rysunku.

Kwas N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowy otrzymuje się łatwo znanymi sposobami, np. w reakcji kwasu L-asparaginowego z odpowiednim alkiloksantogenianem metylu. Korzystnymi kwasami N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowymi są pochodne metoksylowa i etoksylowa.

Reakcję kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego z trójhalegenkiem fosforu prowadzi się w octanie alkilu, w którym grupa alkiłowa ma 1–4 atomów węgla, korzystnie w octanie etylu lub octanie metylu, a najbardziej korzystnie w octanie etylu. Octan alkilu stosuje się w takiej ilości, by uzyskać początkowe stężenie kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego 0,75–1,25 molarne, korzystnie 1,0–1,25 molarne. Kwas N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowy i trójhalegenek fosforu są rozpuszczalne w octanie alkilu, natomiast wytwarzany N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego jest w nim praktycznie nierozpuszczalny i wypada z roztworu w bardzo czystej postaci, natychmiast po jego powstaniu podczas reakcji.

W wyniku stosowania jako rozpuszczalników octanów alkilowych uzyskuje się ulepszony, bardziej ekonomiczny i prosty proces otrzymywania z wysoką wydajnością czystego N-tiokarbo-

ksybezwodnika kwasu L-asparaginowego. Nie zachodzi tutaj potrzeba stosowania skomplikowanych metod wyodrębniania i oczyszczania jak to ma miejsce w przypadku innych rozpuszczalników, w których N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego jest bardziej rozpuszczalny.

Ponadto, octany alkilowe są odpowiednie do stosowania w produkcji przemysłowej na wielką skalę N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego. Unika się wtedy problemów związanych ze stosowaniem bardziej lotnych rozpuszczalników, takich jak eter dwuetylowy.

Jako trójhalegenek fosforu stosuje się trójbromek fosforu lub trójbromek fosforu, korzystnie trójbromek, w ilości 0,3–0,5 mola na jeden mol kwasu N-kalkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego. Korzystnie stosuje się 0,33–0,4 mola trójhalegenku fosforu. Reakcję prowadzi się na ogół w temperaturze od -10°C do 50°C , korzystnie od 20°C do 40°C . Czas trwania reakcji zależy od temperatury i wynosi na ogół od 5 minut do 1 godziny.

N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego jest praktycznie nierozpuszczalny w octanie alkilu i wypada z roztworu natychmiast po wytworzeniu się w reakcji. Tak więc, pożądany produkt można łatwo wyodrębnić w stałej czystej postaci, np. drogą odsączenia, korzystnie po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury od -10°C do 5°C .

Otrzymany N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego można stosować bezpośrednio bez dalszego oczyszczania do syntezy peptydów, np. do otrzymywania niższych estrów alkilowych L-asparaginylo-L-feniloalaniny użytecznych jako środki słodzące, poddając go reakcji z niższymi estrami alkilowymi L-feniloalaniny. Reakcję sprzęgania aminokwasów prowadzi się na ogół przy wartości pH 8–10, korzystnie 9, w zakresie temperatur -10°C – 40°C , korzystnie w temperaturze 0 – 10°C . Otrzymaną pochodną dwupeptydową N-tiokarboksybezwodnika przekształca się następnie w pożądany niższy ester alkilowy L-asparaginylo-L-feniloalaniny, doprowadzając wartość pH mieszaniny reakcyjnej 2–6, korzystnie 4,5–5,5.

Sposób według wynalazku jest ilustrowany poniższymi przykładami.

Przykład I. 19,95 g (0,150 mola) kwasu L-asparaginowego zawieszono w temperaturze 0°C w 15 ml wody i następnie wkraplano podczas mieszania 50% roztwór wodorotlenku sodowego (24 g, 0,30 mola). Następnie dodano jednorazowo 22,44 g (0,165 mola) etyloksantogenianu metylu w 15 ml metanolu. Całość ogrzewano w ciągu 2 godzin w temperaturze 45°C , ochłodzono do temperatury pokojowej i przemyto dwoma porcjami chlorku etylenu. Warstwę wodną zakwaszono stężonym kwasem solnym w temperaturze 0°C , po czym roztwór wysycono chlorkiem sodowym i ekstrahowano dwiema porcjami octanu magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 29,4 g (89%) białego krystalicznego kwasu N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowego o temperaturze topnienia 133°C .

Widmo NMR (DMSO-d_6) δ : 1,23 (t, 3 H, $J=7$ Hz), 2,67 (d, 2 H, $J=6$ Hz), 4,37 (q, 2 H, $J=7$ Hz), 4,93 (dt, 1 H, $J=6$ i 8 Hz), 9,26 (d, 1 H, $J=8$ Hz).

Przykład II. Do 50% roztworu zawierającego 350,9 g (8,58 mola) wodorotlenku sodowego dodano porcjami podczas mieszania w temperaturze 0°C 571 g (4,29 mola) kwasu L-asparaginowego, a następnie tak szybko jak to było możliwe 550 g (4,51 mola) metyloksantogenianu metylu w 405 ml metanolu. Całość ogrzewano w ciągu 1,5 godziny w temperaturze 45°C , ochłodzono do pokojowej temperatury i przemyto dwoma porcjami chlorku metylenu. Chlorek metylenu odrzucono, a fazę wodną zakwaszono stężonym kwasem solnym w temperaturze 0°C . Roztwór ekstrahowano trzema porcjami octanu etylu. Połączone ekstrakty octanowe przemyto solanką i suszono bezwodnym siarczanem magnezu, po czym odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano oleisty żółty produkt krystalizujący po dodaniu chlorku etylenu i n-heksanu. Po odsączeniu, przemyciu n-heksanem i wysuszeniu otrzymano 420 g (47%) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego o temperaturze topnienia 128 – 130°C .

Widmo NMR (DMSO-d_6) δ : 2,73 (d, 2 H, $J=6$ Hz), 3,63 (s, 3 H), 4,43 (dt, 1 H, $J=6$ Hz i 8 Hz), 6,63 (d, 1 H, $J=8$ Hz).

Widmo IR (KBr): 1715, 1515 cm^{-1} .

Przykład III. 207,0 g (1,00 mol) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego rozpuszczono w 1200 octanu etylu w temperaturze 0°C i dodano jednorazowo do roztworu 47 ml (0,50

mola) trójbromku fosforu. Łaźnię chłodzącą usunięto i pozwolono, by temperatura samorzutnie doszła do 35°C. Roztwór mieszano w ciągu 10 minut. Wytrącił się osad w postaci białych granulek. Mieszaninę ochłodzono do temperatury 0–5°C, odsączono osad i przemyto go małą ilością eteru etylowego, a następnie wysuszono. Otrzymano 157,4 g (90%) analitycznie czystego N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego o temperaturze topnienia 200–205°C (z rozkładem) skręcalności właściwej $[\alpha]^{25}_D = 109,5^\circ$ ($c = 1$, czterowodorofuran).

Widmo IR (KBr): 3225, 1739, 1724, 1653 i 1399 cm^{-1} .

Widmo NMR (DSMO- d_6) δ : 2,83 (d, 2 H, $J = 5$ Hz), 4,70 (t, 1 H, $J = 5$ Hz), 9,23 (szeroki s, 2 H).

Widmo masowe m/e : 175 $/M^+$, 87 i 60.

Przykład IV. Do roztworu 4,14 g (20 milimoli) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego w 24 ml octanu metylu dodano w temperaturze 25°C jednorazowo 0,66 ml (7 milimoli) trójbromku fosforu. Po upływie 10 minut produkt wyodrębniono w sposób podany w przykładzie III. Otrzymano 2,51 g (72%) czystego N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego identycznego pod względem wszystkich właściwości fizycznych i spektralnych z produktem z przykładu III.

Przykład V. Do roztworu 4,14 g (20 milimoli) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego w 24 ml octanu n-butyłu dodano jednorazowo w temperaturze 25°C 0,66 ml (7 milimoli) trójbromku fosforu. Po upływie 10 minut produkt izolowano w sposób przedstawiony w przykładzie III. Otrzymano 3,10 g (89%) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego.

Przykład VI. Stosując postępowanie opisane w przykładzie III, 4,14 g (20 milimoli) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z 0,66 ml (7 milimoli) trójbromku fosforu w 24 ml octanu izopropylowego. Otrzymano N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego z 82% wydajnością.

Przykład VII. Stosując postępowanie opisane w przykładzie III 4,14 g (20 milimoli) kwasu N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z trójbromkiem fosforu w 24 ml octanu III-rz-butyłu. Otrzymano N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego z 86% wydajnością.

Przykład VIII. Stosując postępowanie opisane w przykładzie IV, 2,21 g (10 milimoli) kwasu N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z 0,33 ml (3,5 milimola) trójbromku fosforu w 13,3 ml octanu etylu. Otrzymano 1,61 g (92%) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego.

Przykład IX. Stosując postępowanie z przykładu IV, 2,21 g (10 milimoli) kwasu N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z 0,33 ml (3,5 milimola) trójbromku fosforu w 8,3 ml octanu etylu. Otrzymano 1,66 g (95%) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego.

Przykład X. Stosując postępowanie z przykładu IV, 2,21 g (10 milimoli) kwasu N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z 0,33 ml (3,5 milimola) trójbromku fosforu w 8,3 ml octanu metylu. Otrzymano 1,62 g (93%) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego.

Przykład XI. Stosując postępowanie z przykładu IV, 2,21 g (10 milimoli) kwasu N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowego poddano reakcji z 0,33 ml (3,5 milimola) trójbromku fosforu w 8,3 ml octanu n-propylu. Otrzymano 1,14 g (65%) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego.

Przykład XII. 108 g (0,50 mola) chlorowodoru estru metylowego L-feniloalaniny rozpuszczono w temperaturze 0–5°C w 100 ml wody i wartość pH roztworu doprowadzono do 9,0 za pomocą 50% roztworu wodorotlenku sodowego. Do roztworu wodorotlenku sodowego dodano porcjami podczas silnego mieszania 91,9 g (0,525 mola) N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego, utrzymując wartość pH na poziomie 8,9–9,1 za pomocą ewentualnego dodawania 50% roztworu wodorotlenku sodowego. Mieszanie i dodawanie roztworu wodorotlenku kontynuowano do ustabilizowania się wartości pH na poziomie 9,0 (około 60 minut). Wartość pH doprowadzono następnie do 5,0–5,5 za pomocą 12 n kwasu solnego i dodano metanol w ilości umożliwiającej dobre mieszanie. Wytrącony osad odsączono, przemyto małą ilością lodowato zimnej wody i suszono. Otrzymano 92 g (63%) estru metylowego kwasu L-asparaginylo-L-feniloalaniny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania N-tiokarboksybezwodnika kwasu L-asparaginowego polegający na reakcji kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego o 1-3 atomów węgla w grupie alkoksylowej z trójbromkiem lub trójchlorkiem fosforu w temperaturze od -10°C do 50°C , **znamienny tym**, że reakcji poddaje się 0,75-1,25 molarny roztwór kwasu N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowego w octanie alkilu o 1-4 atomów węgla w grupie alkilowej, a następnie z roztworu wyodrębnia wytworzony, stały N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego.

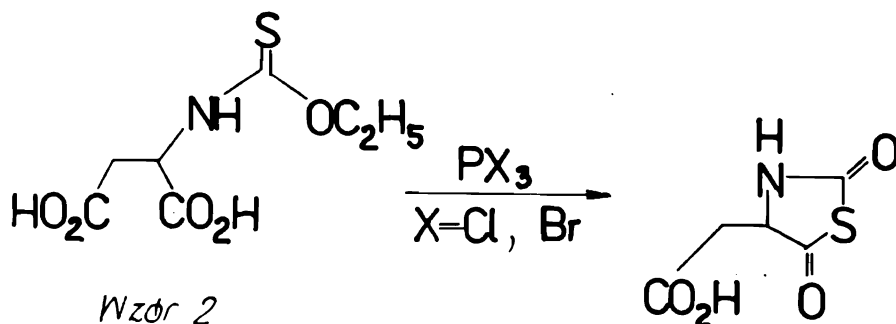
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik stosuje się octan etylu.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik stosuje się octan metylu.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze $20-40^{\circ}\text{C}$.

5. Sposób według zastrz. 1, albo 2, albo 3, albo 4, **znamienny tym**, że jako kwas N-alkoksytiokarbonylo-L-asparaginowy stosuje się kwas N-metoksytiokarbonylo-L-asparaginowy lub kwas N-etoksytiokarbonylo-L-asparaginowy.

6. Sposób według zastrz. 1, albo 2, albo 3, albo 4, **znamienny tym**, że N-tiokarboksybezwodnik kwasu L-asparaginowego wyodrębnia się przez odsączenie roztworu w temperaturze od -10°C do 5°C .



Wzór 2

Wzór 1

Schemat