



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 C 103/52
C 12 P 21/02
// A 23 L 1/236

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

643 532

⑮ Gesuchsnummer: 7193/82

⑮ Teilgesuch von: 353/78

⑮ Anmeldungsdatum: 13.01.1978

⑮ Priorität(en): 27.01.1977 JP 52-7279
19.05.1977 JP 52-57036

⑮ Patent erteilt: 15.06.1984

⑮ Patentschrift
veröffentlicht: 15.06.1984

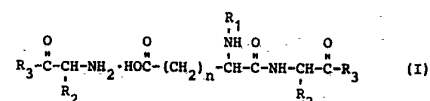
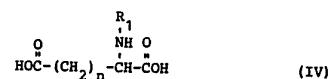
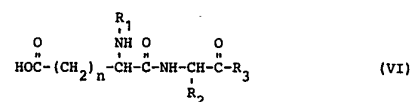
⑮ Inhaber:
Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.,
Shinnanyo-shi/Yamaguchi-ken (JP)
(Zaidanhojin) Sagami Chemical Research Center,
Chiyoda-ku/Tokyo (JP)

⑮ Erfinder:
Yoshikazu Isowa, Setagaya-ku/Tokyo (JP)
Muneki Ohmori, Toshima-ku/Tokyo (JP)
Kaoru Mori, Sagamihara-shi/Kanagawa-ken (JP)
Tetsuya Ichikawa,
Sagamihara-shi/Kanagawa-ken (JP)
Yuji Nonaka, Shin-nanyo-shi/Yamaguchi-ken
(JP)
Keiichi Kihara, Shin-nanyo-shi/Yamaguchi-ken
(JP)
Kiyotaka Oyama,
Shin-nanyo-shi/Yamaguchi-ken (JP)
Heijiro Satoh, Shin-nanyo-shi/Yamaguchi-ken
(JP)
Shigeaki Nishimura,
Shin-nanyo-shi/Yamaguchi-ken (JP)

⑮ Vertreter:
Ritscher & Seifert, Zürich

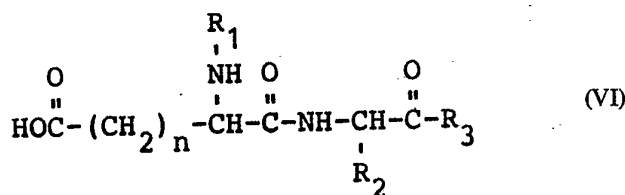
⑮ Verfahren zur Herstellung eines Dipeptidesters.

⑮ Zur Herstellung eines Dipeptidesters der Formel (VI) wird eine entsprechende N-substituierte Monoaminodicarbonsäure der Formel (IV) mit einem entsprechenden Aminocarbonsäureester der Formel (V) in wässrigem Medium in Gegenwart einer Protease bei einem pH-Wert, bei welchem die Protease enzymatisch aktiv ist, umgesetzt, um eine entsprechende Additionsverbindung der Formel (I) abzuscheiden; die Additionsverbindung wird vom wässrigen Medium abgetrennt und mit einer Säure zersetzt; aus den so erhaltenen Zersetzungsprodukten gewinnt man den Dipeptidester der Formel (VI). Die Reste R_1 , R_2 und R_3 haben die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung. Ferner wird gegebenenfalls die Gruppe R_1 aus der Verbindung (VI) abgespalten.



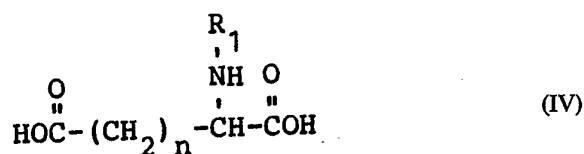
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Dipeptidestern der Formel (VI)

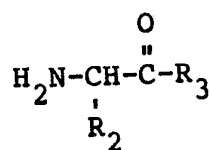


in der R_1 eine aliphatische Oxycarbonylgruppe, eine Benzyl-oxycarbonylgruppe, die kernsubstituiert sein kann, eine Benzoylgruppe oder eine aromatische Sulfonyl- oder Sulfinylgruppe, R_2 eine Methylgruppe, eine Isopropylgruppe, eine Isobutylgruppe, eine Isoamylgruppe oder eine Benzylgruppe, R_3 eine Niederalkoxygruppe, eine Benzyloxygruppe oder eine Benzhydryloxygruppe und n 1 oder 2 ist, gekennzeichnet durch

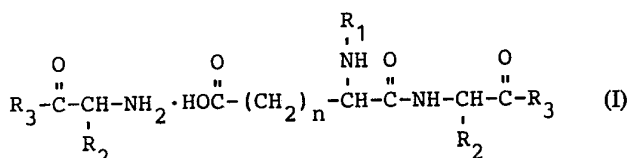
(a) Umsetzen einer entsprechenden N-substituierten Monoaminodicarbonsäure der Formel (IV)



mit einem entsprechenden Aminocarbonsäureester der Formel (V)



in einem wässrigen Medium in Gegenwart einer Protease bei einem pH-Wert, bei welchem die Protease enzymatisch aktiv ist, um dadurch eine entsprechende Additionsverbindung der Formel (I)



abzuscheiden,

- (b) Abtrennung der Additionsverbindung vom wässrigen Medium,
(c) Umsetzung der Additionsverbindung mit einer Säure zur Zersetzung der Additionsverbindung und
(d) Gewinnung des Dipeptidesters aus den Zersetzungsprodukten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (VI) in LL-Form gewonnen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Additionsverbindung vor ihrer Umsetzung mit Säure gemäss Schritt (c) in einem organischen Lösungsmittel gelöst wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösungsmittel ein Keton, Dioxan, Tetrahydrofuran, ein chlorierter niederer Kohlenwasserstoff, ein nicht-protonisches polares organisches Lösungsmittel, ein Ester oder ein Alkohol ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die in Schritt (c) mit der Additionsverbindung umgesetzte Säure in Form einer wässrigen Lösung verwendet und der Dipeptidester aus einer organischen Lösungsmittelphase gewonnen wird.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure der Additionsverbindung in Schritt (c) als wässrige Lösung zugegeben und der freigesetzte Dipeptidester als Feststoff gewonnen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass R_1 die Benzyloxycarbonylgruppe, R_2 die Benzylgruppe, R_3 die Methoxygruppe und n Eins ist.

8. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 erhaltener Dipeptidester der Formel (VI).

9. Dipeptidester nach Anspruch 8, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 7.

10. Verfahren zur Herstellung von Dipeptidestern der Formel (VI'), worin R_1 Wasserstoff bedeutet, dadurch gekennzeichnet, dass man entweder nach dem Verfahren des Anspruches 1 einen Dipeptidester der Formel (VI) herstellt, worin R_1 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat und anschliessend die Schutzgruppe R_1 zur Gewinnung der entsprechenden Aminoverbindung absplattet oder gemäss den Verfahrensstufen (a) bis (b) des Anspruches 1 eine Additionsverbindung der Formel (I) herstellt, diese durch Umsetzung mit einer Säure unter gleichzeitiger Abspaltung der Schutzgruppe R_1 zersetzt und den Dipeptidester der Formel (VI') aus den Zersetzungsprodukten gewinnt.

11. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 10 erhaltener Dipeptidester der Formel (VI').

Es ist bekannt, dass Proteasen, wie Papain und Chymotrypsin, zum Aufbau von Peptidbindungen als Umkehrreaktion der Proteinzersehung Verwendung finden. So erfolgte z.B. nach Bergmann die Herstellung von Aniliden unter Verwendung von Papain, und die Peptidsynthesen unter Verwendung von Monoaminomonocarbonsäuren, wie Leucin mit N-ständiger Benzoylschutzgruppe und Leucin und Glycin, beide mit C-ständiger Amid- oder Anilidschutzgruppe, gelang Fruton mit Papain und Chymotrypsin [Advances in Protein Chemistry, Bd. 5, S. 33 (1949), Academic Press Inc. New York, N.Y.].

Kürzlich wurde von Peptidsynthesen unter Verwendung von Aminosäuren mit N-ständiger Benzyloxycarbonylschutzgruppe und Aminosäuren mit C-ständiger Estergruppe mit Enzymen, wie Papain, Prolisin, Subtilisin BPN', usw. berichtet [Abstracts of the 35th Autumn Conference of the Chemical Society of Japan, S. 482 und 486 (1976)].

In diesen Verfahren werden die Produkte in wässrigem Medium als wasserunlösliche Produkte abgeschieden, die durch den Verlust wasserlöslicher Gruppen entstehen (dies ist erforderlich, um die reversible Reaktion in Richtung der Peptidbildung zu zwingen). Wenn demgemäss eine wasserlösliche Gruppe in dem Reaktionsprodukt noch erhalten bleiben soll, wie dies z.B. der Fall ist, wenn man die Aminosäuren mit einer zweiten Carboxylgruppe in der Seitenkette (z.B. Asparaginsäure oder Glutaminsäure) als Ausgangsverbindung verwendet, scheint es erwünscht zu sein, die wasserlöslichen Gruppen der Ausgangsverbindung mit einer weniger hydrophilen Schutzgruppe zu maskieren.

Erfindungsgemäss wurde nun gefunden, dass bei Verwendung von Monoaminodicarbonsäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure, die eine N-ständige Schutzgruppe besitzt, als Ausgangsverbindungen die erhaltenen Dipeptide selbst jedoch nicht abgeschieden werden, und dass bei Wahl bestimmter Aminosäuren mit einer C-ständigen Estergruppe

(Aminocarbonsäureester) als andere Ausgangsverbindungen die Abscheidung von Additionsverbindungen aus den Dipeptiden, bei denen es sich um enzymatische Reaktionsprodukte handelt, und den Aminosäureestern erfolgt.

Es ist bekannt, dass Peptidderivate verschiedene physiologische Aktivitäten besitzen, und diese Peptidderivate können nach verschiedenen Methoden hergestellt werden. Die Peptide mit einem sauren Aminosäurerest, wie α -L-Asparaginyphenylalanin-niederalkylester, die sich als Süßmittel eignen, können aus einer Vorstufe mit einer Benzyloxycarbonylgruppe als N-ständige Schutzgruppe durch Abspaltung der Schutzgruppe erhalten werden.

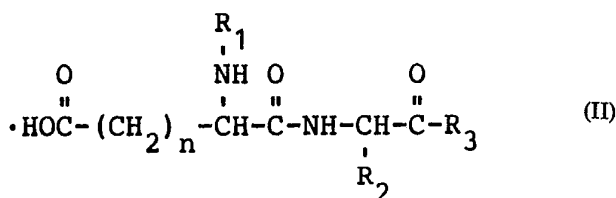
Die Peptide mit N-ständiger Schutzgruppe, wie N-Benzyloxycarbonyl-L- α -glutamylphenylalanin-niederalkylester, können leicht zu Peptiden mit freier C-ständiger Carboxylgruppe hydrolysiert werden, und diese hydrolysierten Peptide werden als Substrate zur Messung der enzymatischen Aktivität von Carboxypeptidasen verwendet.

Die N-geschützten oder -ungeschützten Dipeptidester können durch Umsetzung von sauren Aminosäureanhydriden mit einer geschützten oder ungeschützten Aminogruppe mit Aminosäurealkylestern erhalten werden (bekanntgemachte JA-PA 14217/74 und JA-OS 61451/73, 76835/73, 58025/75 und 71642/75).

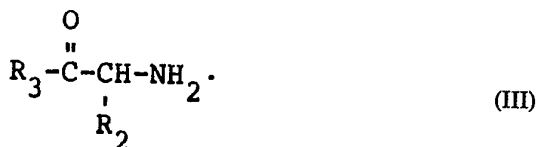
Die gewünschten Dipeptidester können jedoch nicht in einfacher Weise nach den üblichen Verfahren erhalten werden, da nach diesen Verfahren neben den gewünschten Dipeptidestern zwangsläufig auch Dipeptidester mit Peptidbindungen an den seitenständigen Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren entstehen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Dipeptidestern der im Oberbegriff von Anspruch 1 definierten Formel (VI), welches Verfahren die im Kennzeichen von Anspruch 1 genannten Merkmale hat.

Die im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Additionsverbindungen der Formel (I) enthalten Bausteine der Formel (II)

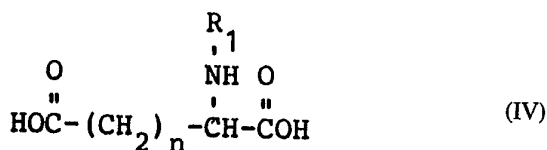


die in LL-Form vorliegen können, und der Formel (III)



die in L-, D- oder hauptsächlich D-Form vorliegen können, wobei R_1 , R_2 und R_3 die oben angegebene Bedeutung haben.

Die Additionsverbindungen der Formel (I) werden durch Umsetzen einer entsprechenden N-substituierten Monoaminocarbonsäure der Formel (IV)



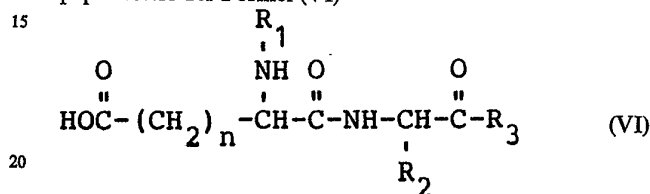
mit einem entsprechenden Aminocarbonsäureester der Formel (V)



in wässrigem Medium in Gegenwart von Protease hergestellt.

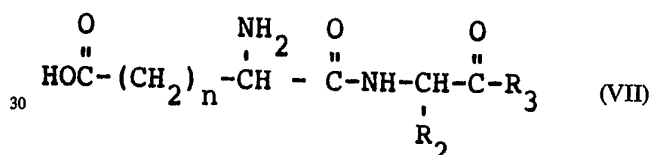
Die Monoaminocarbonsäure der Formel (IV) und der Aminocarbonsäureester der Formel (V) liegen vorzugsweise in L-Form vor, können aber auch in DL-Form vorliegen.

Die erhaltene Additionsverbindung der Formel (I) wird vom wässrigen Medium abgetrennt und zur Gewinnung des Dipeptidesters der Formel (VI)



mit einer Säure zersetzt. Die N-Schutzgruppe kann in an sich bekannter Weise nachfolgend oder bereits im Zuge der Zersetzung mit Säure zur Bildung von Dipeptidester mit freier

Aminogruppe der Formel (VII)



abgespalten werden.

Auf diese Weise können z.B. die α -L-Asparaginy-L-phenylalaninalkylester, die einen süßen Geschmack wie Zucker besitzen, erhalten werden. α -L-Asparaginy-L-phenylalaninmethylester besitzt eine Süßkraft, die das 200fache derjenigen von Zucker beträgt. Das Asparaginsäurerüst liegt vor, wenn $n = 1$ ist; wenn hingegen $n = 2$ ist, dann liegt das Glutaminsäurerüst vor.

Allgemein kann R_1 eine aliphatische Oxycarbonylgruppe, z.B. eine tert.-Butyloxycarbonylgruppe $[(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-]$ oder tert.-Amyloxycarbonylgruppe $[(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{O}-\text{CO}-]$ oder Benzyloxycarbonylgruppe $(\phi-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-)$, oder eine gegebenenfalls kernsubstituierte Benzyloxycarbonylgruppe, wie eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe $(\text{p}-\text{CH}_3\text{O}-\phi-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-)$, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonylgruppe $[\text{3,5}-(\text{CH}_3\text{O})_2-\phi-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-]$, 2,4,6-Trimethoxybenzyloxycarbonylgruppe $[\text{2,4,6}-(\text{CH}_3\text{O})_3-\phi-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-]$, Benzoylgruppe $(\phi-\text{CO}-)$ oder p-Toluolsulfonylgruppe $(\text{p}-\text{CH}_3-\phi-\text{SO}_2-)$ oder eine aromatische Sulfinylgruppe, z.B. eine o-Nitrosulfinylgruppe, bedeuten.

Je nach der Bedeutung von R_2 hat die Verbindung (V) das Alaningerüst ($\text{R}_2 = \text{Methyl}$), das Valingerüst ($\text{R}_2 = \text{Isopropyl}$), das Leucingerüst ($\text{R}_2 = \text{Isobutyl}$), das Isoleucingerüst ($\text{R}_2 = \text{Isoamyl}$) oder das Phenylalaningerüst ($\text{R}_2 = \text{Benzyl}$).

R_3 bedeutet einen Niederalkoxyrest, z.B. Methoxygruppen $(\text{CH}_3\text{O}-)$, Ethoxygruppen $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-)$, Propoxygruppen $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}-)$ und Butoxygruppen $(\text{C}_4\text{H}_9\text{O}-)$ oder eine Benzyloxy- oder Benzhydryloxygruppe.

Typische Beispiele für R_1 , R_2 und R_3 sind:

$\text{R}_1 = \text{Benzyloxycarbonyl}$ und p-Methoxybenzyloxycarbonyl;

$\text{R}_2 = \text{Benzyl}$;

$\text{R}_3 = \text{Methoxy- oder Äthoxy.}$

Eine typische erfindungsgemäss verwendete Additionsverbindung (I), erhalten durch Umsetzung von N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und L-Phenylalaninmethylester,

zeigt die nachfolgend wiedergegebenen IR- und NMR-Spektren.

IR-Spektrum

3260 cm^{-1} (N-H-Streckschwingung); 3000 bis 3200 cm^{-1} (C-H-Streckschwingung); 1740 cm^{-1} (C=O-Ester); 1720 cm^{-1} (C=O Urethan); 1660 cm^{-1} (erste Amidabsorption); 1630 cm^{-1} (Carboxylat); 1540 cm^{-1} (zweite Amidabsorption); 1430 und 1450 cm^{-1} (C-H-Deformationschwingung); 1390 cm^{-1} (Carboxylat); 1220 bis 1290 cm^{-1} (C-O-C-Streckschwingung und dritte Amidabsorption); 1050 cm^{-1} (Phenylschwingung in der Ebene); sowie 740 und 695 cm^{-1} (Schwingung des monosubstituierten Benzolrings ausserhalb der Ebene).

NMR-Spektrum

- (1) $\delta = 2,75$ ppm (2H)
- (2) $\delta = 3,02$ ppm (4H)
- (3) $\delta = 3,61$ ppm (3H) 3,7 ppm (3H)
- (4) $\delta = 4,4$ to 4,8 ppm (3H)
- (5) $\delta = 5,05$ ppm (2H)
- (6) $\delta = 5,82$ ppm (5H)
- (7) $\delta = 7,3$ ppm (15H).

Die Ergebnisse der Elementaranalyse der Additionsverbindung sind im wesentlichen die gleichen wie die berechneten Werte für die Formel I, in der R_1 , R_2 und R_3 eine Benzyloxycarbonyl-, Benzyl- bzw. Methoxygruppe bedeuten, und n den Wert 1 hat.

Wenn die Additionsverbindung der Behandlung mit einer starken Säure, wie Chlorwasserstoffsäure, unterworfen und das Produkt mit einem organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, extrahiert wird, erhält man aus der organischen Schicht eine saure Verbindung. Wenn man die vorgenannte typische Additionsverbindung in dieser Weise behandelt, zeigt die erhaltene saure Verbindung charakteristische Eigenschaften, die für die Verbindung der Formel VI in LL-Form, in der R_1 , R_2 , R_3 und n die gleiche Bedeutung wie in der vorgenannten typischen Additionsverbindung haben, erwartet werden können.

Wenn die aus der vorgenannten typischen Additionsverbindung erhaltene saure Verbindung der katalytischen Hydrierung mit Wasserstoff unterworfen wird, erhält man den bekannten LL-Asparaginyphenylalanin-methylester.

Alle Daten, einschliesslich der IR- und NMR-Spektren, sowie die für die Verbindungen erhaltenen Elementaranalysen in irgendeiner der vorgenannten Stufen, erhärten die in den Formeln gezeigten Strukturen.

Entsprechende Ergebnisse werden auch in dem Fall erhalten, wo die Verbindungen mit anderen Bedeutungen für R_1 , R_2 , R_3 und n im Rahmen der Formeln (IV) und (V) bzw. (I) verwendet werden.

Wird die Schutzgruppe für die Aminogruppe, d.h. R_1 , nach einer bekannten Methode abgespalten, z.B. durch katalytische Hydrierung, so lässt sich der Dipeptidester mit einer Aminogruppe und einer Carboxylgruppe erhalten.

Die so erhältlichen Dipeptidester haben wertvolle Eigenschaften. So lassen sich z.B. α -L-Asparaginyphenylalanin-niederalkylester, insbesondere der Methylester, wobei n den Wert 1 besitzt, R_2 eine Benzylgruppe ist und R_3 eine Niederalkoxygruppe, vorzugsweise eine Methoxygruppe, ist, als Süsstoffe verwenden.

Peptide mit einer N-ständigen Schutzgruppe und einer freien C-ständigen Carboxylgruppe, die aus dem Dipeptidester mit einer Schutzgruppe für die Aminogruppe durch übliche Hydrolyse erhalten werden können, bieten ebenfalls wertvolle Eigenschaften. So kann z.B. N-Benzyloxycarbonyl- α -L-glutamyl-phenylalanin als Substrat zur Messung der

enzymatischen Aktivität von Carboxypeptidasen verwendet werden.

Bei den als Ausgangsverbindungen verwendeten N-substituierten Monoaminodicarbonsäuren (IV) handelt es sich um N-substituierte Asparaginsäure für $n = 1$ und um N-substituierte Glutaminsäure für $n = 2$.

Für die Wahl der Schutzgruppe R_1 gilt allgemein, dass diese die Aminogruppe in der Reaktion schützen und dementsprechend stabil sein soll. Ferner soll sich die Abspaltung von R_1 von der Aminogruppe ohne Beeinträchtigung des Gerüsts des Produktes erzielen lassen.

Um die Abtrennung von Reaktionsprodukt aus wässrigem Medium zu erleichtern, sollte das Produkt keine die Wasserlöslichkeit erhöhenden Gruppen, wie Sulfonsäuregruppen, 15 enthalten.

Geeignete N-substituierte Monoaminodicarbonsäuren (IV) lassen sich leicht durch Einführung der Schutzgruppe R_1 in die Monoaminodicarbonsäure nach üblichen Verfahren herstellen.

Die Verbindungen (V) sind Aminosäureester mit einer hydrophoben Gruppe in der Seitenkette, wobei es sich um Alaninester für $R_2 = \text{Methyl}$, um Valinester für $R_2 = \text{Isopropyl}$, um Leucinester für $R_2 = \text{Isobutyl}$, um Isoleucinester für $R_2 = \text{sek.-Butyl}$ und um Phenylalaninester für $R_2 = \text{Benzyl}$ handelt. Von diesen Gruppen R_2 stellt die Benzylgruppe, die als Aminosäureester Phenylalaninester liefert, den typischsten Fall dar.

Bei den erfindungsgemäss verwendeten Proteasen handelt es sich vorzugsweise um Metalloproteasen, die ein Metallion im aktiven Zentrum besitzen. Geeignete Metalloproteasen sind aus Mikroorganismen herrührende Enzyme, wie neutrale Proteasen von *Ray fungus*, Prolisin, Thermolysin, Collagenase, *Crotalus atrox*-Protease usw. Es ist auch möglich, rohe Enzyme, wie Thermoase, Tacynase-N, Pronase, usw. zu verwenden. Zur Dämpfung der in den rohen Enzymen enthaltenen Esterase wird es bevorzugt, einen Enzym-inhibitor, z.B. einen Potato-Inhibitor, mit den rohen Enzymen zu verwenden. Es ist auch möglich, Thiolproteasen, wie Papain, oder Serinproteasen, wie Trypsin, zu verwenden, jedoch besitzen diese Esterase-Aktivität. Man muss somit bei der Durchführung der Reaktion unter Verwendung dieser Enzyme auf die Verhinderung der Esterhydrolyse bzw. Verseifung achten.

Bei der erfindungsgemässen Synthese erfolgt die Bildung der Peptidbindung in wässrigem Medium, vorzugsweise wässriger Lösung, bei solchen pH-Werten, dass die Protease enzymatisch aktiv ist.

Die Reaktion zur Bildung der Additionsverbindung aus Peptid und Aminocarbonsäureester ist somit pH-abhängig und erfolgt vorzugsweise bei pH-Werten von 4 bis 9, insbesondere 5 bis 8. Demgemäss können die Ausgangsverbindungen, nämlich die N-substituierten Monoaminodicarbonsäuren und die Aminocarbonsäureester, in freier Form oder in Salzform vorliegen. Wenn jedoch beide in dem wässrigen Medium gelöst werden, ist es erforderlich, den pH-Wert auf den genannten Bereich einzustellen.

Beispiele für geeignete pH-Regler sind anorganische oder organische Säuren und Basen, wie Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure und Essigsäure; Alkalihydroxide, wie Natrium- und Kaliumhydroxid; Alkalicarbonate, wie Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Kaliumcarbonat und Kaliumhydrogencarbonat; sowie organische und anorganische Amine, wie Ammoniak, Trimethylamin, Triethylamin und Ethanolamin.

Die Mengen an Wasserstoffionen und Hydroxylionen, die durch die Reaktion freigesetzt werden, sind äquivalent, wobei die Veränderung des pH-Wertes durch die Reaktion meist nicht gross ist. Zur Verhinderung einer pH-Änderung

ist die Verwendung von Puffern möglich. Bei technischer Herstellung ist es vorteilhaft, den pH-Wert unter Verwendung eines pH-Reglers, der durch einen pH-Messer gesteuert wird, zu regeln.

Bei dem wässrigen Medium handelt es sich im allgemeinen um wässrige Lösungen. Man kann dem wässrigen Medium auch mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel in solchem Umfang zusetzen, wie das Lösungsmittel die Abscheidung des Reaktionsproduktes nicht verhindert.

Die Bildung der Verbindung (I) wird vorzugsweise bei Temperaturen von 10 bis 90°C, vorzugsweise 20 bis 50°C, unter dem Gesichtspunkt der Erhaltung der Enzymaktivität durchgeführt. Die Reaktion ist im allgemeinen in etwa 30 min bis 24 Std. beendet, obwohl die Reaktionszeit an sich keiner Beschränkung unterliegt.

Die Konzentration beider Ausgangsverbindungen (IV) und (V) im wässrigen Medium unterliegen an sich keiner besonderen Beschränkung; um die Abscheidung des Reaktionsproduktes zu begünstigen, wird aber vorzugsweise bei höheren Konzentrationen gearbeitet. Die Löslichkeit der anfallenden Additionsverbindungen in Wasser ist relativ gering. So beträgt z.B. die Löslichkeit der Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalanin-methylester und L-Phenylalanin-methylester etwa 0,3 g/100 g Wasser bei 20°C. Demgemäss können geeignete Konzentrationen beispielsweise im Bereich von 0,001- bis 7-molar, vorzugsweise 0,1- bis 4-molar, liegen.

Das Verhältnis der Ausgangsverbindungen zueinander unterliegt an sich keiner besonderen Beschränkung. Erfindungsgemäss kommt es jedoch auf die Verbindung eines Moleküls der N-substituierten Monoaminodicarbonsäure mit 2 Molekülen des Aminocarbonsäureesters an, wobei das stöchiometrische Molverhältnis der Ausgangsverbindungen 1 : 2 beträgt. In der Praxis angewendete Verhältnisse liegen im allgemeinen im Bereich von 100 : 1 bis 1 : 100, vorzugsweise 5 : 1 bis 1 : 5 und insbesondere 2 : 1 bis 1 : 3.

Es ist nicht immer erforderlich, die gesamten Mengen der Ausgangsverbindungen im wässrigen Medium zu lösen; vielmehr kann man Teilmengen der Ausgangsverbindungen suspendieren, da die Konzentrationen der Ausgangsverbindungen mit zunehmender Reaktion abnehmen, wodurch die suspendierten Ausgangsverbindungen allmählich in Lösung gehen.

In diesem Fall kann eine Veränderung des pH-Wertes eintreten, wobei es erforderlich sein kann, den pH-Wert der Lösung mit fortschreitender Reaktion einzustellen.

Die Menge der erfindungsgemäss verwendeten Protease unterliegt an sich keiner besonderen Beschränkung. Bei hoher Konzentration des Enzyms kann die Reaktion in kurzer Zeit beendet sein. Bei geringer Konzentration des Enzyms ist die Reaktionszeit verlängert. Somit liegt die Konzentration im allgemeinen im Bereich von etwa 2 bis 400 mg (5×10^{-5} bis 1×10^{-2} mMol), pro 1 mMol der Ausgangsverbindungen, vorzugsweise etwa 5 bis 100 mg (1×10^{-4} bis 3×10^{-3} mMol), pro 1 mMol der Ausgangsverbindungen.

Erfindungsgemäss erfolgt die Ausbildung der Peptidbindung nur bei L-Isomeren, jedoch nicht bei D-Isomeren. Andererseits können die für die Durchführung der Additionsreaktion zur Bildung der Additionsverbindungen verwendeten Aminosäureester sowohl in L-Form, D-Form als auch als Gemisch vorliegen. Bei Verwendung von DL-Aminocarbonsäureestern wird das L-Isomere des DL-Aminocarbonsäureesters in der Lösung durch die Peptidsynthesen verbraucht, wodurch der verbleibende Aminosäureester mit überwiegend D-Form für die Bildung der Additionsverbindung aus Dipeptidester und Aminocarbonsäureester Verwendung findet.

Die Verbindungen (IV) und (V) können im wesentlichen mit quantitativer Ausbeute umgesetzt werden, wenn die Konzentrationen der Ausgangsverbindungen hoch sind. Werden 2 Mol DL-Aminocarbonsäureester pro 1 Mol N-substituierte Monoaminodicarbonsäure in L-Form verwendet, so kann man die im wesentlichen aus LL-Dipeptidester und D-Aminocarbonsäureester aufgebaute Additionsverbindung erhalten.

Verwendet man die N-substituierte Monoaminodicarbonsäure in DL-Form und den Aminosäureester in L-Form, so erweist sich das D-Isomere der DL-Form der N-substituierten Monoaminodicarbonsäure als inert und verbleibt in dem wässrigen Medium, wodurch die Additionsverbindung aus dem LL-Dipeptidester und dem L-Aminocarbonsäureester erhalten werden kann. Wird demgemäss die D-Form der N-substituierten Monoaminodicarbonsäure aus dem wässrigen Medium isoliert, so ist es möglich, gleichzeitig die Bildung der Additionsverbindung und die optische Spaltung der N-substituierten DL-Monoaminodicarbonsäure zu erreichen. Unterwirft man die isolierte N-substituierte D-Monoaminodicarbonsäure nach herkömmlichen Verfahren der Racemisierung, so kann das Reaktionsprodukt als Ausgangsverbindung Verwendung finden.

Verwendet man die N-substituierte DL-Monoaminodicarbonsäure und den DL-Aminocarbonsäureester, so lassen sich die N-substituierte DL-Monoaminodicarbonsäure aus dem wässrigen Medium, und die Additionsverbindung aus dem LL-Dipeptidester und dem D-Aminocarbonsäureester erhalten, wobei die Additionsverbindung wie vorstehend dargelegt, in die Komponenten zerlegt werden kann. Hierauf können die Herstellung des Dipeptidesters und die optische Spaltung der N-substituierten DL-Monoaminodicarbonsäure und des DL-Aminocarbonsäureesters gleichzeitig erreicht werden.

Erfindungsgemäss ist es möglich, die Stufen der Einführung und Abspaltung einer Schutzgruppe für die Carboxylgruppe in einer Seitenkette wegzulassen, was man bei den herkömmlichen Verfahren für unabdingbar gehalten hat. Demgemäss lassen sich Verluste an Ausgangsverbindungen vermeiden. Die Produktausbeute ist bei Auswahl entsprechender Bedingungen bemerkenswert hoch.

Für das Verfahren der Erfindung können DL-Ausgangsverbindungen verwendet werden. Bei den herkömmlichen Verfahren unter Verwendung von Enzymen ist das D-Isomere der DL-Ausgangsverbindungen für die Reaktion nutzlos, was einen Verlust an Ausgangsverbindungen mit sich bringt, obwohl die Reaktion hierdurch nicht beeinträchtigt wird. Beim Verfahren der Erfindung können die D-Ausgangsverbindungen hingegen wirksam für die Abscheidung des Dipeptids verwendet und anschliessend wiedergewonnen werden.

Die Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens lässt sich also mit der optischen Spaltung von N-substituierten DL-Aminodicarbonsäuren und DL-Aminocarbonsäureestern verbinden.

Die Zersetzung der Additionsverbindung (I) kann wie oben bereits erwähnt mit Säure, gegebenenfalls auch in Form von saurem Ionenaustauscher wie in einigen Beispielen beschrieben erfolgen. Je nach Wahl kann in wässrigem oder nicht-wässrigem Medium gearbeitet werden. Als Säuren sind anorganische oder organische Säuren geeignet; Brönsted-Säuren werden häufig bevorzugt. Beispiele für geeignete anorganische Säuren sind Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure. Beispiele für geeignete organische Säuren sind Ameisensäure, Essigsäure, Citronensäure, Toluolsulfonsäure usw. Die Konzentration der Säure ist nicht besonders kritisch und kann unter Berücksichtigung anderer Verfahrensbedingungen gewählt werden.

Gemäss einer ersten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Zersetzung der Additionsverbindung (I) in einer sauren wässrigen Lösung, in welcher die saure Komponente meist in stöchiometrischer Menge oder darüber vorliegt, z.B. in einer Menge von 1-100 Äquivalent, vorzugsweise 1-20 Äquivalent, insbesondere 1-10 Äquivalent, jeweils bezogen auf 1 Mol der Additionsverbindung (I), da die saure Komponente zur Ionisierung des Aminocarbonsäureesterbausteins und damit zu seiner Auflösung in der wässrigen Lösung in Form seines Salzes führt.

Für einige Zwecke muss der Dipeptidester (VI) nicht besonders rein sein. In solchen Fällen ist es möglich, geringere Mengen der sauren Komponente, als dem stöchiometrischen Verhältnis entspricht, zu verwenden, z.B. 0,5 Äquivalent pro 1 Mol der Additionsverbindung (I). Für einige praktische Zwecke kann man z.B. etwa 0,8 Äquivalent, pro 1 Mol der Additionsverbindung (I), verwenden.

Das Verhältnis der sauren wässrigen Lösung zu den Ausgangsverbindungen liegt vorzugsweise in einem Bereich, in dem der Dipeptidester (VI) in festem Zustand vorliegen kann, da der erhaltene Dipeptidester (VI) als Feststoff abgetrennt wird. Viele Dipeptidester (VI) besitzen jedoch eine geringe Löslichkeit in Wasser oder in der sauren wässrigen Lösung, z.B. im Fall des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylesters, dessen Löslichkeit 0,028 g/100 g Wasser und 0,017 g/100 g verdünnter Salzsäure (10^{-2} -molar) bei 25°C beträgt. Demgemäss kann der Anteil der sauren wässrigen Lösung relativ hoch sein. Andererseits wird bei dem Verfahren der Erfindung die Additionsverbindung (I) mit der sauren wässrigen Lösung vorzugsweise so in Berührung gebracht, dass man Bedingungen zur Feststoff-Flüssigkeits-Trennung vorliegen hat. Es ist somit nicht zweckmässig, ein zu niedriges Verhältnis anzuwenden. Geeignete Mengen der sauren wässrigen Lösung liegen im Bereich von 1,5 bis 50 Gewichtsteile, vorzugsweise 2 bis 10 Gewichtsteile, jeweils pro 1 Gewichtsteil der Additionsverbindung (I).

Die Temperatur zur Umsetzung der Additionsverbindung (I) mit der sauren wässrigen Lösung liegt im allgemeinen im Bereich von 0 bis 100°C, vorzugsweise 5 bis 80°C. Wenn man das Gemisch ausreichend rührt, ist die Zersetzung der Additionsverbindung (I) in etwa 10 Minuten beendet.

Handelt es sich bei R_1 um eine Schutzgruppe, die leicht hydrolysiert werden kann, z.B. um eine p-Methoxybenzylloxycarbonylgruppe, so ist es zweckmässig, Reaktionszeit und -temperatur sorgfältig zu überwachen, um eine Abspaltung der Schutzgruppe zu verhindern.

Vorzugsweise erfolgt die Zersetzung der Additionsverbindung unter Bildung des Dipeptidesters (VI) und eines Salzes des Aminosäureesters (V) mit einer Säurekomponente der wässrigen Säurelösung. Ein erheblicher Teil des Dipeptidesters (VI) liegt nach der Zersetzungsreaktion meist in festem Zustand vor, da er in der wässrigen Säurelösung nur eine geringe Löslichkeit besitzt, wie vorstehend dargelegt. Da sich das Salz in der Lösung gut löst, entsteht als Reaktionssystem ein Gemisch aus dem festen Dipeptidester und der Salzlösung, die einen Überschuss der Säurekomponente enthalten kann. Der erhaltene feste Dipeptidester kann in üblicher Weise, z.B. durch Filtration oder Zentrifugieren, abgetrennt werden. Aus der abgetrennten Salzlösung kann der Aminosäureester in üblicher Weise isoliert werden, z.B. durch Auskristallisieren oder durch Lösungsmittelextraktion nach der Freisetzung des Aminosäureesters.

Erfindungsgemäss kann der Dipeptidester (VI) in einfacher Weise hergestellt und abgetrennt werden durch Zersetzung der Additionsverbindung (I), und zwar ohne komplizierte Stufen, wie Extraktion und Ionenaustauscherharzbehandlung. Ausbeute und Reinheit des Dipeptidesters (VI) sind meist bemerkenswert hoch. Die Herstellung von α -L-

-Asparaginyll-L-phenylalanin-alkylestern, die als Süßmittel Verwendung finden, ist weiter unten beschrieben.

Eine andere Möglichkeit zur Zersetzung der Additionsverbindung besteht darin, dass man die Additionsverbindung, in der R_1 z.B. eine p-Methoxybenzylloxycarbonylgruppe darstellt, vorzugsweise die Additionsverbindung aus einem N-p-Methoxybenzylloxycarbonyl- α -asparaginyll-phenylalanin-alkylester und einem Phenylalaninalkylester (1 : 1), in einem flüssigen Medium auflöst und in diesem mit einer Säure unter Bildung des Dipeptidesters mit einer freien Aminogruppe der Formel (VII) zersetzt.

Geeignete flüssige Medien zur Lösung der Additionsverbindung (I) sind organische Lösungsmittel, insbesondere Ketone, wie Aceton; Sauerstoff enthaltende organische Lösungsmittel, wie Dioxan und Tetrahydrofuran; chlorierte niedere Kohlenwasserstoffe, wie Chloroform, Methylendichlorid und Äthylendichlorid; nicht-protonische polare organische Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, und flüssige Carbonsäuren, wie Essigsäure und Ameisensäure. Auch Gemische aus zwei oder mehr der vorgenannten Lösungsmittel können verwendet werden.

Des weiteren kann man auch Ester, wie Äthylacetat, und Alkohol wie Methanol, Äthanol oder Propanol, verwenden. Bei Verwendung solcher Lösungsmittel ist die Produktausbeute normalerweise erniedrigt, und zwar wegen unerwünschter Nebenreaktionen, z.B. Umesterungsreaktionen oder Veresterung der Carboxylgruppe.

Die Additionsverbindung besitzt meist eine geringe Löslichkeit in Wasser. Demgemäss ist Wasser allein meist nicht als flüssiges Medium geeignet, obwohl es möglich ist, Wasser zu dem flüssigen Medium in solchem Umfang hinzuzusetzen, dass eine ausreichende Löslichkeit der Additionsverbindung in dem flüssigen Medium gewährleistet bleibt.

Die Menge des flüssigen Mediums richtet sich nach der Art des flüssigen Mediums und dem Lösevermögen für die Additionsverbindung. Die Menge ist im allgemeinen grösser als 10 Gewichtsteile und beträgt vorzugsweise 20 bis 100 Gewichtsteile, pro 1 Gewichtsteil der Additionsverbindung.

Bei den für die Zersetzung der Additionsverbindung verwendeten Säuren handelt es sich vorzugsweise um Brønsted-Säuren, vorzugsweise anorganische Säuren, wie Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Perchlorsäure, und organische Säuren, wie Trifluoressigsäure oder p-Toluolsulfonsäure.

Das Verhältnis der Säure zur Additionsverbindung ist vorzugsweise mindestens stöchiometrisch; vorzugsweise finden 2 Äquivalent oder mehr Säure, pro 1 Mol der Additionsverbindung, Anwendung.

Die Konzentration der Säure in dem flüssigen Medium liegt im allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 10 n, vorzugsweise 1 bis 5 n. Vorzugsweise wird die genaue Konzentration nach Massgabe der anderen Reaktionsbedingungen festgelegt, da die Reaktion unter anderem von der Reaktionszeit, der Reaktionstemperatur und der Art der Säure abhängt. Hohe Konzentrationen, die den vorgenannten Bereich übersteigen und zu unerwünschten Nebenreaktionen, z.B. der Hydrolyse der Ester führen könnten, sollten jedoch vermieden werden.

Bei der Säure kann es sich um wässrige oder wasserfreie Säure handeln. Wenn es sich bei dem flüssigen Medium um ein mit Wasser nicht mischbares Medium, z.B. einen chlorierten Kohlenwasserstoff handelt, wird die Verwendung wasserfreier Säuren bevorzugt, da die Verwendung wässriger Säuren zur Ausbildung von zwei Phasen führen würde, was eine sehr langsame Reaktion zur Folge hätte.

Reaktionstemperatur und -zeit unterliegen an sich keinen besonderen Beschränkungen. Die Reaktion erfolgt im allgemeinen bei 20 bis 100°C für eine Dauer von 10 Minuten bis 6 Stunden.

Bei Anwendung der Säure in geringerer Konzentration dauert die Reaktionszeit länger oder die Reaktionstemperatur ist höher. Bei höherer Säurekonzentration ist es von Vorteil, eine kürzere Reaktionszeit und eine niedrigere Reaktionsstemperatur zu wählen.

Nach der Zersetzung der Additionsverbindung können der erhaltene Dipeptidester mit der freien Aminogruppe (VII), Anisalkohol und der Aminosäureester (V) nach nachfolgend beschriebenen Methoden getrennt werden. So kann man z.B. nach der Reaktion den Anisalkohol in eine Lösungsmittelphase extrahieren. Hierbei geht man so vor, dass man geeignete Mengen Wasser und Lösungsmittel, das eine separate Phase mit Wasser zu bilden vermag, wie Chloroform oder Diäthyläther, der Reaktionslösung zusetzt, anschließend schüttelt und dann absitzen lässt, wobei eine Phasentrennung in eine Lösungsmittelphase und eine wässrige Phase erfolgt. Andererseits wird der pH-Wert der wässrigen Phase durch Zugabe einer Base, wie NaOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, Ammoniak oder Triäthylamin, auf einen Wert von 5 bis 6 eingestellt, worauf der abgeschiedene Dipeptidester mit der freien Aminogruppe (VII) durch Filtration oder dgl. abgetrennt wird. Der pH-Wert des Filtrats wird dann mit der Base auf einen pH-Wert von 8 bis 10 eingestellt, worauf der freie Phenylalaninalkylester mit einem Lösungsmittel, wie Chloroform, Diäthyläther oder Äthylacetat, extrahiert wird. Der Dipeptidester mit der freien Aminogruppe und der Aminosäureester können auch in einfacher Weise durch die übliche Methode unter Anwendung eines Kationenaustauscherharzes isoliert werden.

Die oben beschriebenen Methoden zur optischen Spaltung können auch in diesem Fall Anwendung finden.

Dieses Verfahren ist höchst vorteilhaft anwendbar auf die Herstellung von α -L-Asparaginyphenylalanin-niederalkylestern aus der Additionsverbindung von N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl- α -L-asparaginyphenylalanin-niederalkylestern mit Phenylalanin-niederalkylestern, wobei R₁, R₂, R₃ und n eine N-p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe bzw. Niederalkylgruppe, vorzugsweise eine Methyl- oder Äthylgruppe, bedeuten und n den Wert 1 hat.

Erfindungsgemäss können die Abspaltung des Aminocarbonsäurebausteins und der N-ständigen Schutzgruppe der p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe von dem Dipeptidester gleichzeitig erfolgen. Der abgetrennte Anisalkohol kann wiedergewonnen und durch Umsetzung mit Phosgen in ein p-Methoxybenzyloxycarbonylierungsmittel überführt werden.

Die Beispiele erläutern die Herstellung der Additionsverbindung und deren Zerlegung zur Gewinnung der Dipeptidester.

Beispiel 1

1335 mg (5 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 1078 mg (5 mMol) L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 20 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin vermischt und dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mit 40 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 1145 mg feine, nadelartige Kristalle vom F. 117 bis 120°C (eine Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester [1 : 1]); Ausbeute 75,5%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid.

Das Reaktionsprodukt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend zusammengestellt.

F. 120-124°C.

$[\alpha]_D^{25}$: + 7,1 (C=1, Methanol).

Elementaranalyse: C₂₂H₂₄N₂O₇

ber. (%) C 63,24 H 6,13 N 6,97

gef. (%) C 63,15 H 6,15 N 7,00

Die IR- und NMR-Spektren des Produkts bestätigen die Struktur.

1145 mg des Reaktionsprodukts werden in 40 ml 1N-HCl gelöst und dann 3mal mit 30 ml Äthylacetat extrahiert. Hierauf werden die Extrakte vermischt, mit jeweils 20 ml Wasser (3mal) gewaschen und dann mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen der Lösung führt man durch Zugabe von n-Hexan Kristallisation herbei. Hierbei erhält man 640 mg eines kristallinen Produkts. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 115-125°C

$[\alpha]_D^{25}$: -15,3 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: C₂₂H₂₄N₂O₇

ber. (%) C 61,67 H 5,65 N 6,54

gef. (%) C 61,52 H 5,65 N 6,57

Die IR- und NMR-Spektren zeigen die für N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester erwarteten Eigenschaften.

Die Ergebnisse stimmen mit denjenigen überein, die man bei Benzoyloxycarbonylierung der Aminogruppe des L-Asparaginyphenylalaninmethylesters erhält.

Der L-Phenylalaninmethylester wird aus einem Gemisch der Salzsäurephase und der Waschwasserfraktion, die von der Äthylacetatextraktion herrühren, gewonnen.

Es bestätigt sich somit, dass die durch die vorgenannte Reaktion erhaltene Verbindung eine Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester darstellt. Gleichzeitig bestätigt das NMR-Spektrum, dass das Molverhältnis 1 : 1 beträgt.

Beispiel 2

1335 mg (5 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 1078 mg (5 mMol) L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 10 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin vermischt und dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird gesammelt, aus der Lösung abgetrennt und getrocknet. Hierbei erhält man 1504 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1). Ausbeute: 99,1%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid; F. 104 bis 113°C.

Beispiel 3

Gemäss Beispiel 2, wobei jedoch die Mengen an N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und L-Phenylalaninmethylester auf 534 mg (2 mMol) bzw. 863 mg (4 mMol) verändert werden, erhält man 1068 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 116 bis 119°C. Ausbeute 70,4%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Beispiel 4

534 mg (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 863 mg (4 mMol) L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit

8 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6,2 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin vermischt und dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird gesammelt, aus der Lösung abgetrennt und getrocknet. Hierbei erhält man 1099 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1). Ausbeute 90,5%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Beispiel 5

267,2 mg (1 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 537,6 mg (3 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in 5 ml Pufferlösung (McIlvain's Puffer, pH 7,0) gelöst.

Die erhaltene Lösung wird mit 100 mg Thermoase und 100 mg Potato-Inhibitor versetzt und dann 20 Stunden bei 38°C geschüttelt. Der Niederschlag wird gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 580 mg einer rohen kristallinen Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 123 bis 125°C. Ausbeute 95,5%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Nachdem man das Reaktionsprodukt in 40 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Dimethylformamid und Wasser (1 : 1- gelöst hat, wird die Lösung unter gründlichen Rühren mit einem stark sauren Kationenaustauscherharz in der H-Form versetzt. Nach Abtrennung des Harzes wird das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Nachdem man den Rückstand in Dimethylformamid gelöst hat, wird die Lösung mit Wasser versetzt. Hierbei erhält man einen Niederschlag aus 330 mg N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester vom F. 123 bis 125°C. Ausbeute 77,0%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Beispiel 6

267,2 mg (1 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 358,4 mg (2 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in 5 ml Pufferlösung (McIlvain's Puffer, pH 7,0) gelöst. Die Lösung wird mit 100 mg Tacynase N und 100 mg Potato-Inhibitor versetzt und dann 6 Stunden bei 38°C geschüttelt. Der Niederschlag wird gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 120 mg einer rohen kristallinen Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 119 bis 123°C. Ausbeute 19,7%.

Das erhaltene Reaktionsprodukt wird gemäss Beispiel 5 der Behandlung mit dem stark sauren Kationenaustauscherharz in H-Form unterworfen. Hierbei erhält man 50 mg N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester vom F. 95 bis 105°C. Ausbeute 11,7%.

Beispiel 7

1335 mg (5 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 1078 mg (5 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 4 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit Triäthylamin auf einen Wert von 6,8 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 20 mg Thermolysin versetzt und dann 2 Tage bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 40 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 475 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1).

Ausbeute 31,3%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid.

Das erhaltene Reaktionsprodukt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert.

Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 120 bis 124°C

$[\alpha]_D^{25}$: + 7,2 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse:

ber.:	(%)	C 63,24	H 6,13	N 6,97
gef.:	(%)	C 63,52	H 6,22	N 7,04

Beispiel 8

Gemäss Beispiel 7, wobei jedoch der pH auf einen Wert von 5,2 eingestellt wird, erhält man 753 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1). Ausbeute 49,5%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylester.

Beispiel 9

133,6 mg (0,5 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 89,6 mg (0,5 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in 2,5 ml Pufferlösung (McIlvain's Puffer, pH 7,0) mit 0,07 ml Triäthylamin gelöst.

Die erhaltene Lösung, die einen pH-Wert von 6,7 besitzt, wird mit 50 mg Thermoase und 50 mg Potato-Inhibitor versetzt und dann 20 Stunden bei 38°C geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Hierbei erhält man 130 mg einer rohen Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 115 bis 124°C. Ausbeute 85,5%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylester.

Das Reaktionsprodukt wird in 20 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Dimethylformamid und Wasser (1 : 1) gelöst und hierauf gemäss Beispiel 5 der Behandlung mit dem stark sauren Kationenaustauscherharz in H-Form unterworfen. Hierbei erhält man 75 mg N-Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalaninmethylester. Gesamtausbeute 70%, bezogen auf eine 50%ige Ausnutzung der Menge an Ausgangs-L-Phenylalaninmethylester.

Beispiel 10

Gemäss Beispiel 9, wobei jedoch 0,05 ml N-Methylmorpholin anstelle von 0,07 ml Triäthylamin Verwendung finden, wird die Umsetzung mit einem pH-Wert von 6,4 zu Beginn durchgeführt. Hierbei erhält man 120 mg einer rohen kristallinen Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 118 bis 124°C. Ausbeute 78,9%, bezogen auf L-Phenylalaninmethylester.

Das Reaktionsprodukt wird gemäss Beispiel 9 der Behandlung mit dem stark sauren Kationenaustauscherharz in H-Form unterworfen. Hierbei erhält man 70 mg kristallinen N-Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalaninmethylester. Gesamtausbeute 66%, bezogen auf eine 50%ige Nutzung der Menge des Ausgangs-L-Phenylalaninmethylesters.

Beispiel 11

Gemäss Beispiel 4, wobei jedoch die Umsetzung bei einem pH-Wert von 6,5 unter Schütteln für eine Dauer von 1 Stunde erfolgt, erhält man 920 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1), Ausbeute 75,8%.

Beispiel 12

534 mg (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 863 mg (4 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH durch Zugabe von 5,5 ml 1 n-NaOH auf einen Wert von 7 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und dann 2 Stunden bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der erhaltene Niederschlag wird abgetrennt und getrocknet. Hierbei erhält man 734 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 106 bis 118°C. Ausbeute 60,5%.

Beispiel 13

540 mg (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 863 mg (4 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 7 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 100 mg Thermoase versetzt und über Nacht bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der erhaltene Niederschlag wird mit 70 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 550 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 113 bis 116°C. Ausbeute 45,3%.

Beispiel 14

270 mg (1 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 432 mg (2 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 4 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermoase versetzt und dann 40 Stunden bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der erhaltene Niederschlag wird abfiltriert, vom Wasser abgetrennt und getrocknet. Hierbei erhält man 177 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 103 bis 112°C. Ausbeute 29,1%.

Beispiel 15

Gemäss Beispiel 14, wobei jedoch der Reaktionslösung zusätzlich 50 mg Potato-Inhibitor zugesetzt werden, erhält man 381 mg des gleichen Produkts vom F. 105 bis 117°C. Ausbeute 62,7%.

Beispiel 16

534 mg (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 863 mg (4 mMol) DL-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 7 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6,2 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, vom Wasser getrennt und getrocknet. Hierbei erhält man 1045 mg Kristalle einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 104 bis 108°C. Ausbeute 86,1%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Nach dem Umkristallisieren aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan erhält man eine Substanz mit den nachfolgend angegebenen Daten.

F. 127-135°C

$[\alpha]_D^{25}$: -4,6 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{32}H_{37}N_3O_9$

ber.: (%) C 63,24 H 6,13 N 6,97

gef.: (%) C 63,52 H 6,19 N 6,92

Es handelt sich vermutlich um die Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und D-Phenylalaninmethylester (1 : 1), und zwar deshalb, weil das IR-Spektrum und das NMR-Spektrum der Substanz die gleichen Eigenheiten wie diejenigen von Beispiel 1 aufweisen.

800 mg des Reaktionsprodukts werden in 40 ml 1 n HCl gelöst und dann mit 30 ml Methylendichlorid 3mal extrahiert. Hierauf wird die Methylendichloridphase mit Wasser gewaschen und dann mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nachdem man das Methylendichlorid abdestilliert hat, wird der freie feste Rückstand aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert. Hierbei erhält man 450 mg Kristalle mit den nachfolgend angegebenen Eigenschaften.

F. 124-132°C

$[\alpha]_D^{25}$: -15,3 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{22}H_{24}N_2O_7$

ber.: (%) C 61,67 H 5,65 N 6,54

gef.: (%) C 61,38 H 5,58 N 6,29

Bei dem Reaktionsprodukt handelt es sich um N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester.

Die rückständige wässrige Phase aus der Extraktion mit Methylenchlorid wird zur Einstellung des pH auf einen Wert von 8,7 mit Natriumhydrogencarbonat vermischt. Hierauf wird das Produkt mit 30 ml Methylenchlorid 3mal extrahiert. Nachdem man den Extrakt mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet hat, wird Chlorwasserstoffgas in den Extrakt für eine Dauer von etwa 10 Minuten eingeleitet.

Nach dem Einengen wird die Methylenchloridlösung mit Äthyläther versetzt. Hierbei rekristallisiert das Produkt, und man erhält 29,0 mg D-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid vom F. 149 bis 151°C.

$[\alpha]_D^{25}$: -15,1 (C=1, Methanol).

Das IR- und NMR-Spektrum stimmt mit demjenigen der L-Form überein.

Die Annahme über die Additionsverbindung ist somit zutreffend. Bei dem durch die Umsetzung erhaltenen Produkt handelt es sich um die Additionsverbindung aus dem N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und dem D-Phenylalaninmethylester (1 : 1).

Beispiel 17

1069 mg (4 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-DL-asparaginsäure und 863 mg (4 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser versetzt. Hierauf wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und dann 2 Stunden bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 20 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 787 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 105 bis 110°C. Ausbeute 64,8%, bezogen auf N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Das Produkt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert. Hierbei erhält man das gewünschte Produkt vom F. 121 bis 125°C.

$[\alpha]_D^{25}$: 7,2 (C=1, Methanol).

Die n-Benzoyloxycarbonyl-asparaginsäure (hauptsächlich in D-Form) wird aus der restlichen Reaktionslösung isoliert.

Beispiel 18

Beispiel 17 wird wiederholt, wobei jedoch DL-Phenylalaninmethylester anstelle von L-Phenylalaninmethylester Verwendung findet. Hierbei erhält man 765 mg einer Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und D-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 105 bis 111°C. Ausbeute 62,3 %, bezogen auf N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginsäure.

Beim Umkristallisieren aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan erhält man das gewünschte Produkt vom F. 126 bis 134°C.

$[\alpha]_D^{25}$: -6,5 (C=1, Methanol).

Die N-Benzylloxycarbonylasparaginsäure (hauptsächlich in D-Form) wird aus der verbleibenden Reaktionslösung isoliert.

Beispiel 19

5,34 g (20 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 7,53 g (42 mMol) L-Phenylalaninmethylester werden in einem 100 ml fassenden Kolben mit 70 ml Wasser versetzt. Hierbei erhält man eine Lösung mit einem pH von 6,2 bis 6,3.

Die erhaltene Lösung wird mit 200 mg Thermolysin versetzt und 4 Stunden bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der Niederschlag wird durch Filtration abgetrennt, mit 70 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 10,11 g Kristalle vom F. 117 bis 120°C. Bei diesem Produkt handelt es sich um eine Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1), und zwar aufgrund der nachfolgend angegebenen Eigenschaften (nach Umkristallisieren aus Äthylacetat/n-Hexan).

F. 120-124°C

$[\alpha]_D^{25}$: + 7,2 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{32}H_{37}N_3O_9$

ber.: (%) C 63,24 H 6,13 N 6,97

gef.: (%) C 63,16 H 6,14 N 6,99

Die IR- und NMR-Spektren zeigen die gleichen Eigenschaften, die vorstehend für die 1:1-Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester beschrieben sind.

Beim Behandeln mit starker Säure und Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, erhält man nach Abdestillieren des organischen Lösungsmittels den N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester.

1,00 g (1,65 mMol) der erhaltenen Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser und 2,0 ml 1-n HCl unter Rühren bei Raumtemperatur während 10 Minuten versetzt. Nachdem man die erhaltene Aufschlämmung filtriert hat, wird der Niederschlag mit 4 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,72 g Kristalle des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylesters mit einer Ausbeute von 98,8 %.

Nachdem man die erhaltenen Kristalle in Äthylacetat gelöst hat, versetzt man mit n-Hexan zur Rekristallisation des Produkts. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse des Endprodukts sind nachfolgend angegeben.

F. 121-124°C

$[\alpha]_D^{25}$: -15,4 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{22}H_{24}N_2O_7$

ber.: (%) C 61,67 H 5,65 N 6,54

gef.: (%) C 61,58 H 5,64 N 6,56

Das IR-Spektrum des Produkts stimmt mit demjenigen der Standardverbindung überein.

Darüberhinaus wird die Identität des Produkts durch Vergleich einer wässrigen Lösung des Produkts mit derjenigen der Standardverbindung mittels Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie bestätigt.

Beispiel 20

1,00 g (1,65 mMol) der Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester, hergestellt in Beispiel 19, werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser und 1,32 ml 1 n HCl versetzt. Nachdem man das Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt hat, wird gemäß Beispiel 19 aufgearbeitet. Hierbei erhält man 0,70 g feine prismatische Kristalle vom F. 100 bis 126°C mit einem Gehalt an N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester von 96,8 %.

Beispiel 21

0,534 g (2 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 0,863 g (4 mMol) DL-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 10 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung wird der pH mit 7%igem Ammoniakwasser auf einen Wert von 6,0 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,90 g Kristalle vom F. 120 bis 126°C.

Ein Teil der Kristalle wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert. Hierbei erhält man das gewünschte Produkt vom F. 128 bis 134°C; $[\alpha]_D^{25}$ = -6,3 (C=1, Methanol). Die mit diesem Produkt erhaltenen IR- und NMR-Spektren sind im wesentlichen die gleichen wie diejenigen der Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1).

Elementaranalyse: $C_{32}H_{37}N_3O_9$

ber.: (%) C 63,24 H 6,13 N 6,97

gef.: (%) C 63,42 H 6,17 N 6,95

Bei Behandlung mit Säure erhält man hieraus den N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und den D-Phenylalaninmethylester im Molverhältnis 1 : 1.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die erhaltenen Kristalle die Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und D-Phenylalaninmethylester (1 : 1) darstellen.

0,50 g (0,82 mMol) der Additionsverbindung werden mit 4 ml Wasser und 0,26 g Citronensäure vermischt. Nachdem man das Gemisch bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt hat, erfolgt die Aufarbeitung gemäß Beispiel 19. Hierbei erhält man 0,35 g Kristalle des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylesters mit einer Reinheit von 100 % und einer Ausbeute von 99,3 %.

Beispiel 22

0,50 g (0,82 mMol) der Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester, hergestellt gemäß Beispiel 19, werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 4 ml Wasser und 0,24 g (1,2 mMol) p-Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt. Bei der Aufarbeitung gemäß Beispiel 19 erhält man 0,33 g Kristalle des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylesters mit einer Reinheit von 100 % und einer Ausbeute von 93,6 %.

Beispiel 23

0,45 g (8,2 mMol) 85%ige Ameisensäure und 8 ml Wasser werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 0,50 g (0,82 mMol) der Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester, hergestellt in Beispiel 19, versetzt. Nachdem man das Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt hat, wird das Reaktionsprodukt abfiltriert, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,312 g weisse Kristalle des N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylesters mit einer Reinheit von 100% und einer Ausbeute von 88,6%.

Beispiel 24

0,47 g (8,2 mMol) Eisessig und 8 ml Wasser werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 0,50 g (0,82 mMol) der Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester versetzt. Nachdem man das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt hat, wird das Reaktionsprodukt abfiltriert, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,308 g weisse Kristalle des N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylesters mit einer Reinheit von 100% und einer Ausbeute von 87,2%.

Beispiel 25

1,00 g (1,65 mMol) der Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester, hergestellt in Beispiel 19, werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser und 2,0 ml 1 n HCl versetzt. Nachdem man das Gemisch 3 Minuten bei 60°C gerührt hat, erfolgt die Aufarbeitung gemäss Beispiel 19. Hierbei erhält man 0,35 g Kristalle des N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylesters mit einer Reinheit von 100% und einer Ausbeute von 100%.

Beispiel 26

0,594 g (2 mMol) N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 0,860 g (4 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 1 n NaOH versetzt. Hierbei wird der pH auf einen Wert von 6,0 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und hierauf bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,928 g Kristalle vom F. 68 bis 74°C.

Die nachfolgenden Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um die Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) handelt.

Beim Umkristallisieren aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan erhält man das gewünschte Produkt mit den nachfolgend angegebenen Eigenschaften.

F. 72-76°C

$[\alpha]_D^{25}$: +6,5 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{33}H_{39}N_3O_{10}$

ber.: (%) C 62,15 H 6,16 N 6,59

gef.: (%) C 61,85 H 6,04 N 6,46

Die IR- und NMR-Spektren zeigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um die Additionsverbindung der Formel I handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Methoxygruppe bzw. den Wert 1 bedeuten.

0,500 g (0,78 mMol) der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester, die in vorgenannter Weise hergestellt worden ist, werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 2 ml Wasser und 0,94 ml (0,94 mMol) 1 n HCl versetzt. Hierauf wird das Reaktionsgemisch 3 Minuten bei 60°C gerührt.

Nach Filtrieren der erhaltenen Aufschlämmung, Waschen mit 6 ml Wasser und Trocknen erhält man 0,32 g Kristalle.

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester (Reinheit 100%, Ausbeute 89,1%) handelt.

Nachdem man die Kristalle in Äthylacetat gelöst hat, versetzt man mit n-Hexan zur Rekristallisation des Produkts. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 128 bis 130°C

$[\alpha]_D^{25}$: -15,1 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{23}H_{26}N_2O_8$

ber.: (%) C 60,25 H 5,72 N 6,11

gef.: (%) C 60,30 H 5,74 N 5,99

IR- und NMR-Daten zeigen, dass es sich um ein Endprodukt der Formel VI handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Methoxygruppe bzw. den Wert 1 bedeuten.

0,2 Gewichtsteile des erhaltenen N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylesters werden in 2 Gewichtsteilen Aceton gelöst. Nachdem man die erhaltene Lösung mit 1 Gewichtsteil 4 n HCl versetzt hat, wird das Gemisch auf dem Wasserbad 1,5 Stunden unter schwachem Rückfluss erhitzt. Hierbei findet vollständige Zersetzung unter Bildung einer Lösung statt, die als Hauptkomponenten L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester, L-Phenylalaninmethylester und Anisalkohol enthält. Aus dieser Lösung erhält man den L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester.

Beispiel 27

0,562 g (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminsäure und 0,860 g (4 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben mit 1 n NaOH versetzt. Bei der Auflösung wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt und hierauf bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Nach dem Abtrennen wird der Niederschlag mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,510 g Kristalle vom F. 80 bis 85°C.

Die nachfolgend angegebenen Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um eine Additionsverbindung aus N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) handelt.

Beim Umkristallisieren aus Äthylacetat/n-Hexan erhält man das gewünschte Produkt. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend zusammengestellt.

F. 92-97°C

$[\alpha]_D^{25}$: 0,1 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{33}H_{39}N_3O_9$

ber.: (%) C 63,75 H 6,32 N 6,76

gef.: (%) C 63,61 H 6,31 N 6,65

IR- und NMR-Daten zeigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um die Additionsverbindung der Formel I handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine Benzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Methoxygruppe bzw. den Wert 2 bedeuten.

0,001 g der Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester werden in einem 15 ml fassenden Reagenzglas unter Rühren zu 2,3 ml (0,32 mMol) 0,14 n HCl hinzugefügt. Hierauf wird das Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Der erhaltene weisse Niederschlag wird abfiltriert, mit 3 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,683 g Kristalle.

Die nachfolgend angegebenen Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um den N-Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-phenylalaninmethylester (Reinheit 100%, Ausbeute 95,8%) handelt.

Nachdem man die Kristalle in Äthylacetat gelöst hat, versetzt man zur Rekristallisation mit n-Hexan.

Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 97-99°C

$[\alpha]_D^{25}$: -11,0 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{23}H_{26}N_2O_7$

ber.: (%) C 62,43 H 5,92 N 6,33

gef.: (%) C 62,63 H 5,94 N 6,24

IR- und NMR-Daten zeigen, dass es sich bei dem Endprodukt um die Verbindung der Formel VI handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine Benzylloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Methoxygruppe bzw. den Wert 2 bedeuten.

Der erhaltene N-Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-phenylalaninmethylester kann durch Reduktion bzw. Hydrierung mit Wasserstoff in den L-Glutamyl-L-phenylalaninmethylester, und durch Hydrolyse bzw. Verseifung in das N-Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-phenylalanin überführt werden.

Beispiel 28

0,686 g (3,12 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 100 ml fassenden Kolben mit 25 ml Wasser versetzt. Bei der Auflösung versetzt man unter Kühlen mit Eis und unter Rühren mit wässrigem 2 n NaOH bis zum pH 7,5. Hierauf versetzt man die Lösung unter Rühren allmählich mit 0,360 g (1,44 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginsäureanhydrid, wobei man den pH-Wert durch Zugabe von wässrigem 2 n NaOH auf 7,0 bis 7,5 hält. Nach beendeter Zugabe rührt man das Gemisch noch 2 Stunden und versetzt dann mit wässrigem 1 n HCl bis zum pH 6. Der erhaltene Niederschlag wird abfiltriert, mit 50 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,416 g einer Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginyphenylalaninmethylester (Gemisch aus 86% N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-(C_α)-L-phenylalaninmethylester und 14% N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-(C_β)-L-phenylalaninmethylester) und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1) vom F. 108 bis 115°C. Durch die Reaktion entsteht eine erhebliche Menge N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-(C_β)-L-phenylalaninmethylester, der grösste Teil der Verbindung verbleibt jedoch im Filtrat und im Waschwasser.

In einem 12 ml fassenden Becherglas werden 0,200 g (0,329 mMol) der erhaltenen Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-(C_α und C_β)-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester zu 1,7 ml (0,7 mMol) wässrigem 0,4 n HCl unter Rühren hinzugefügt. Hierauf wird das Reaktionsgemisch weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Der erhaltene weisse Niederschlag wird abfiltriert, mit 3 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,136 g (Ausbeute 96,3%) Kristalle des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-L-phenylalaninmethylesters (enthaltend

17% N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-(C_β)-L-phenylalaninmethylester) vom F. 110 bis 118°C.

Beispiel 29

In einem 30 ml fassenden Kolben werden 0,543 g (2 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 0,918 g (4 mMol) L-Phenylalaninäthylester-hydrochlorid in 5 ml Wasser gelöst. Hierauf versetzt man mit wässriger Lösung 4 n NaOH bis zum pH 6.

Die erhaltene Lösung wird mit 50 mg Thermolysin versetzt. Das erhaltene Gemisch wird dann bei 38 bis 40°C über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 30 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,913 g Kristalle vom F. 85 bis 90°C.

Bei dem Produkt handelt es sich um die Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-L-phenylalaninäthylester und L-Phenylalaninäthylester (1 : 1).

Das Produkt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 93-95°C

$[\alpha]_D^{25}$: +6,0 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{34}H_{41}N_3O_9$

ber.: (%) C 64,23 H 6,50 N 6,61

gef.: (%) C 64,50 H 6,56 N 6,63

IR- und NMR-Daten zeigen, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt um die Additionsverbindung der Formel I handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine Benzylloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Äthoxygruppe bzw. den Wert 1 bedeuten.

In einem 30 ml fassenden Kolben werden 0,125 g (0,197 mMol) der erhaltenen Additionsverbindung aus N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-L-phenylalaninäthylester und L-Phenylalaninäthylester mit 2 ml Wasser und 0,24 ml 1 n HCl (0,24 mMol) vermischt. Das erhaltene Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtrieren der erhaltenen Aufschlämmung wird das Produkt mit 5 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,0807 g Kristalle des N-Benzylloxycarbonyl-L-asparaginy-L-phenylalaninäthylesters mit einer Reinheit von 100% und einer Ausbeute von 92,6%. Diese Kristalle werden aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse des erhaltenen Produkts sind nachfolgend angegeben.

F. 128-135°C

$[\alpha]_D^{25}$: -17,3 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{23}H_{26}N_2O_7$

ber.: (%) C 62,43 H 5,92 N 6,33

gef.: (%) C 62,82 H 5,96 N 6,40

Beispiel 30

5,00 g (16,82 mMol) N-p-Methoxybenzylloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 7,26 g (33,64 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 100 ml fassenden Kolben durch Zugabe von wässrigem 1 n NaOH gelöst. Der pH wird auf einen Wert von 6,0 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit 2,0 g Thermolysin und 0,4 g Potato-Inhibitor vermischt und dann 5 Stunden bei 38 bis 40°C geschüttelt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 100 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 8,11 g Kristalle vom F. 88 bis 92°C. Die Ausbeute beträgt 75,6% als Additionsverbindung von N-p-Methoxybenzylloxycarbonylasparaginyphenylalaninmethylester und Phenylalaninmethylester (1 : 1).

Das Produkt wird aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse der erhaltenen Kristalle sind im we-

sentlichen identisch mit denjenigen der in Beispiel 26 hergestellten Additionsverbindung.

0,3 g der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester werden in einem 20 ml fassenden Kolben in 3 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe von 2 ml 2,4 n HCl lässt man 1 Stunde bei 60°C reagieren.

Ein Teil des Reaktionsgemisches wird mit Wasser, wässrigem 1,2 n NaHCO₃ und Cyclohexanon als innerem Standard zu einer Probe vermischt. Die Umwandlung zu α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester wird durch Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie bestätigt. Die Ausbeute beträgt 72,7%.

Beispiel 31

0,3 g der in Beispiel 30 erhaltenen Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester werden in einem 20 ml fassenden Kolben vorgelegt.

Gemäss Beispiel 30, jedoch unter Verwendung von Dioxan anstelle von Aceton, werden die Zersetzung der Additionsverbindung und die Analyse des Produkts durchgeführt.

Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 73,0%.

Beispiel 32

Beispiel 31 wird unter Verwendung von Methanol anstelle von Dioxan wiederholt. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 63,3%.

Beispiel 33

Beispiel 31 wird unter Verwendung von N,N-Dimethylformamid anstelle von Dioxan wiederholt. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 28,1%.

Beispiel 34

Beispiel 31 wird wiederholt, wobei jedoch 4 ml Dioxan, 1 ml einer HCl-Dioxan-Lösung (5,3 n) und Triäthylamin als Neutralisationsmittel, anstelle von 3 ml Dioxan, 2 ml 2,4 n HCl bzw. wässrigem 1,2 n NaHCO₃ Verwendung finden. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 98,6%.

Beispiel 35

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch die Reaktionsbedingungen 20 Minuten bei 90°C anstelle von 1 Stunde bei 60°C betragen. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 88,5%.

Beispiel 36

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch 4,5 ml Dioxan und 0,5 ml HCl-Dioxan-Lösung (5,3 n) anstelle von 4 ml bzw. 1 ml verwendet werden, und wobei man die Umsetzung bei 90°C anstelle von 60°C durchführt. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 84,4%.

Beispiel 37

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch 3 ml Dioxan und 2 ml HCl-Dioxan-Lösung (5,3 n) anstelle von 4 ml bzw. 1 ml verwendet werden, und wobei die Reaktionsbedingungen 120 Minuten bei 30°C anstelle von 1 Stunde bei 60°C betragen. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 98,6%.

Beispiel 38

Das Verfahren von Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch 4,5 ml Dioxan und 0,5 ml 60%ige Perchlorsäure anstelle von 4 ml Dioxan bzw. 1 ml der HCl-Dioxan-Lösung

(5,3 n) Verwendung finden. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 65,5%.

Beispiel 39

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch 4,85 ml Dioxan und 0,15 ml konzentrierte Schwefelsäure anstelle von 4 ml Dioxan und 1 ml der HCl-Dioxan-Lösung (5,3 n) verwendet werden. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester beträgt 89,9%.

Beispiel 40

0,3 g der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1), hergestellt in Beispiel 30, werden in 2 ml Dioxan gelöst. Nachdem man mit 3 ml Trifluoressigsäure versetzt hat, lässt man 1 Stunde bei 60°C reagieren.

Nachdem man das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingedampft hat, versetzt man einen Teil hiervon mit Wasser, Triäthylamin und Cyclohexanon als innerem Standard. Die erhaltene Probe wird der Analyse mittels Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie unterworfen. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-L-Phenylalaninmethylester beträgt 96,4%.

Beispiel 41

1,000 g der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-L-asparaginyll-L-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1), erhalten in Beispiel 30, 14 ml Dioxan und 4 ml HCl-Dioxan-Lösung (5,3 n) werden in einem 50 ml fassenden Kolben 1 Stunde bei 60°C gerührt. Nachdem man das Dioxan aus dem Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck abdestilliert hat, versetzt man den öligen Rückstand mit 6 ml Wasser und 20 ml Diäthyläther unter Rühren. Anschliessend werden die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird zusätzlich mit 10 ml Diäthyläther versetzt, um das Produkt in ähnlicher Weise, wie vorstehend beschrieben, zu extrahieren. Die letzte Extraktion wird 3mal wiederholt.

Die Diäthylätherphasen werden gesammelt, hierauf 2mal mit 5 ml einer 5%igen wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und dann mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Diäthyläthers unter vermindertem Druck erhält man 0,176 g (Ausbeute 81,2%) an rohem Anisalkohol.

Die wässrige Phase wird mit 7%igem wässrigem Natriumhydroxid bis pH 6 neutralisiert und dann bei etwa 5°C über Nacht gehalten. Die erhaltenen ausgeschiedenen Kristalle werden abfiltriert, mit 2 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 0,136 g (Ausbeute 68,5%) rohen L-Asparaginyll-L-phenylalaninmethylester.

Des Filtrat mit der Waschwasserfraktion wird mit 7%igem wässrigem NaOH bis zum pH 9 versetzt; das Produkt wird hierauf mit 15 ml Dichlormethan 3mal extrahiert. Die Dichlormethanphasen werden gesammelt, mit 5 ml Wasser gewaschen und dann mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet.

Nach dem Abdestillieren des Dichloräthans unter vermindertem Druck erhält man 0,234 g (Ausbeute 83,4%) rohen L-Phenylalaninmethylester.

Beispiel 42

1,189 g (4 mMol) N-p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-L-Asparaginsäure und 1,837 g (8 mMol) L-Phenylalaninäthylesterhydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben

durch Zugabe von wässrigem 1 n NaOH bis zum pH-Wert 6,0 gelöst.

Hierauf versetzt man mit Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 15 ml. Nachdem man die erhaltene Lösung mit 0,1 g Thermolysin versetzt hat, wird das Gemisch 7 Stunden bei 38 bis 40°C gerührt.

Der erhaltene Niederschlag wird abfiltriert, mit 30 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 2,401 g (Ausbeute 90,2%) der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninäthylester und L-Phenylalaninäthylester (1 : 1). Dies wird durch die nachfolgend angegebenen Analysendaten bestätigt.

Das Produkt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Diäthyläther umkristallisiert. Die physikalischen Eigenschaften und die Ergebnisse der Elementaranalyse sind nachfolgend angegeben.

F. 82-87°C

$[\alpha]_D^{25}$: +6,0 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $C_{35}H_{43}N_3O_{10}$

ber.: (%) C 63,14 H 6,51 N 6,31

gef.: (%) C 63,52 H 6,57 N 6,54

Diese IR- und NMR-Daten zeigen, dass es sich bei dem Produkt um die Additionsverbindung der Formel I handelt, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Äthoxygruppe bzw. den Wert 1 bedeuten.

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch die erhaltene Additionsverbindung anstelle der Additionsverbindung aus N-p-Methoxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester mit L-Phenylalaninmethylester verwendet wird. Hierbei erhält man den L-Asparaginyll-phenylalaninäthylester. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-phenylalaninäthylester beträgt 95,5%.

Beispiel 43

1,189 g (4 mMol) N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 1,725 g (8 mMol) DL-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid werden in einem 30 ml fassenden Kolben durch Zugabe von wässrigem 1 n NaOH bis zum pH-Wert 6,0 gelöst. Hierauf versetzt man mit Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 15 ml. Nachdem man die erhaltene Lösung mit 0,1 g Thermolysin vermischt hat, wird das Gemisch 50 Minuten bei 38 bis 40°C gerührt.

Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 30 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Hierbei erhält man 2,109 g Kristalle vom F. 119 bis 128°C. Das Produkt wird aus einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und n-Hexan umkristallisiert und dann 7 Stunden unter vermindertem Druck bei 80°C getrocknet. Bei dem Produkt handelt es sich um die Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und D-Phenylalaninmethylester (1 : 1) in Form des Halbhydrats. Dies wird durch die nachfolgend angegebenen Analysendaten bestätigt.

F. 131 bis 133°C

$[\alpha]_D^{25}$: -4,2 (C=1, Methanol)

Elementaranalyse: $(C_{33}H_{39}N_3O_{10} \cdot \frac{1}{2}H_2O)$

ber.: (%) C 61,29 H 6,23 N 6,50

gef.: (%) C 61,50 H 6,12 N 6,49

Das IR- und NMR-Spektrum zeigen die gleichen charakteristischen Merkmale wie bei der Additionsverbindung der Formel I, hergestellt in Beispiel 26, in der R_1 , R_2 , R_3 und n eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, Benzylgruppe, Methoxygruppe bzw. den Wert 1 bedeuten, wobei jedoch die Absorptionen infolge der Protonen des Wassers und infolge der Protonen der -NH- und NH_3^+ -Gruppen nach 4,1 ppm verschoben sind, und zwar wegen der durch die Anwesenheit von Wasser verursachten Störungen, weil das Produkt Kristallwasser enthält, wie nachfolgend dargelegt. 1,5024 g des Produkts werden zur Trocknung dieser Probe 12 Minuten in einem Mikrowellenerhitzer mit einer Frequenz von 2,45 GHz und einer Leistung von 1,2 kW bestrahlt. Hierdurch vermindert sich das Gewicht der Probe auf 1,48152 g. Der Trocknungsverlust beträgt somit 0,02091 g.

Die Elementaranalyse der bestrahlten Probe bringt folgendes Ergebnis:

25 für: $C_{33}H_{39}N_3O_{10}$

ber.: (%) C 62,15 H 6,16 N 6,69

gef.: (%) C 62,07 H 6,17 N 6,69

Das IR- und NMR-Spektrum der bestrahlten Probe besitzt die gleichen charakteristischen Merkmale wie bei der Additionsverbindung der Formel I, hergestellt in Beispiel 26.

1,0 g der bestrahlten Probe werden mit 4 ml Wasser und 2 ml 1 n HCl vermischt. Das erhaltene Gemisch wird hierauf 3 Minuten bei 60°C gemischt. Nach der Fest-Flüssig-Trennung der erhaltenen Aufschlämmung isoliert man den N-p-Methoxycarbonyl-L-phenylalaninmethylester und den D-Phenylalaninmethylester im Molverhältnis 1 : 1 aus der festen bzw. der flüssigen Phase.

Beispiel 34 wird wiederholt, wobei jedoch 0,3 g der erhaltenen Additionsverbindung (Halbhydrat anstelle der in Beispiel 30 erhaltenen Verbindung) verwendet werden. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-phenylalaninmethylester und D-Phenylalaninmethylester beträgt 95,9%.

Beispiel 44

0,3 g der Additionsverbindung aus N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-phenylalaninmethylester und L-Phenylalaninmethylester (1 : 1), hergestellt in Beispiel 30, werden in 10 ml HCl-Chloroform-Lösung (0,31 n) gelöst. Hierauf lässt man 2 Stunden bei 60°C reagieren. Nach Abdestillieren der flüssigen Bestandteile unter vermindertem Druck versetzt man den Rückstand mit Wasser, Triäthylamin und Cyclohexanon als innerem Standard. Die erhaltene Probe wird der Analyse mittels Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie unterworfen. Die Ausbeute an α -L-Asparaginyll-phenylalaninmethylester beträgt 94,3%.