



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 232 499 A5

4(51) C 07 K 5/06  
C 07 K 1/14

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

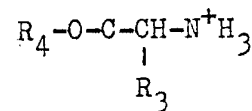
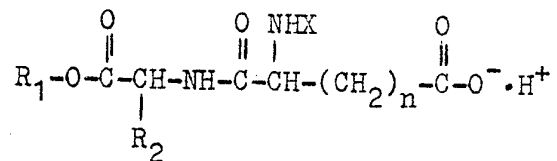
(21)	AP C 07 K / 272 585 6	(22)	21. 09. 82	(44)	29. 01. 86
(31)	147974/1981	(32)	21. 09. 81	(33)	JP
	148754/1981		22. 09. 81		
	148755/1981		22. 09. 81		
	148756/1981		22. 09. 81		

- (71) siehe (73)  
 (72) Oyama, Kiyotaka; Irino, Shigeaki; Hagi, Norio, JP  
 (73) Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Yamaguchi-ken; Sagami Chemical Research Center, Tokyo, JP

## (54) Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats

(57) Die Erfindung betrifft die Gewinnung eines Dipeptidderivats. Ziel der Erfindung ist es, die normalerweise bei der Abtrennung auftretenden Schwierigkeiten zu vermeiden. Erfindungsaufgabe ist die Abtrennung des Dipeptidderivats aus organischer Phase, wobei zugleich eine wäßrige Phase vorliegt.

Erfindungsgemäß erfolgt dies durch Zugabe von Wasser und einer Brönsted-Säure zur abgetrennten organischen Lösungsmittelphase und dieses Gemisch einer weiteren Phasentrennung unterzogen wird, wobei man eine zweite organische Lösungsmittelphase mit dem Dipeptidderivat der Formel erhält, worin  $R_1$  = Niederalkyl,  $R_2$  = Seitenkettengruppe einer Aminosäure,  $n = 1$  oder  $2$ ,  $X$  = Benzyloxycarbonyl mit gegebenenfalls Kernsubstituenten, sowie eine zweite wäßrige Phase mit einem Aminosäureesterion der Formel, worin  $R_4 = R_1$  und  $R_3 = R_2$  ist, worauf die resultierenden Phasen getrennt und das endgültige Dipeptidderivat aus der zweiten organischen Lösungsmittelphase gewonnen wird. Formeln



64 760 12

Berlin, 19. 12. 1984

Ausscheidung aus

AP C 07 C/243 407

(61 437 12)

- 4 -

Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats.

Eine Additionsverbindung eines Dipeptidesters, wie eines N-Benzoyloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanin-niedrigalkylesters mit einem Aminosäureester, wie einem Phenylalanin-niedrigalkylester oder Valinniedrigalkylester, ist geeignet als Zwischenprodukt für einen  $\alpha$ -L-Aspartyl-L-phenylalanin-niedrigalkylester, der ein Süßstoff ist oder als ein Zwischenprodukt für die optische Trennung einer racemischen Aminosäuremodifikation.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine derartige Additionsverbindung ist beispielsweise erhältlich durch Reaktion einer N-geschützten Aminodicarbonsäure mit einem Aminosäureester in einem wäßrigen Medium in Anwesenheit einer Protease (US-PS 4 165 311 und 4 256 836) oder durch Reaktion eines Dipeptidesters mit einem Aminosäureester in einem Lösungsmittel, wie Wasser (JA-OS 19234/80 und 72644/80). Bei diesen Reaktionen scheidet sich die Additionsverbindung als eine feste Komponente in dem wäßrigen Medium ab. Darüber hinaus verbleibt eine wesentliche Menge von noch aktiver Protease, wie gelöst im ersteren Falle im wäßrigen Medium. Dementsprechend ist es sehr wichtig, die Zusatzverbindung sowie die Protease aus dem wäßrigen Medium wirksam wiederzugewinnen.

15.JAN.1985-225061

Bei den vorstehend genannten üblichen Methoden erfolgt die Wiedergewinnung der Additionsverbindung durch Filtrieren, wobei keine Wiedergewinnung der Protease durchgeführt wird.

Es ist auch bekannt, ein organisches Lösungsmittel, das zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist, zu dem Reaktionsgemisch zuzusetzen, wodurch die Additionsverbindung gelöst und in das Lösungsmittel extrahiert wird und in der Form einer gleichmäßigen Lösung in dem organischen Lösungsmittel abgetrennt werden kann (US-PS 4 212 946). Um die Extraktion wirksam durchzuführen, sollte das organische Lösungsmittel geeignet sein, nicht nur ein binäres Phasensystem zu bilden, sondern auch ein gutes Lösungsvermögen für die Additionsverbindung aufzuweisen. Es gibt jedoch nur eine begrenzte Anzahl organischer Lösungsmittel, die diesen Erfordernissen entsprechen. Typische Beispiele sind Ester, wie Äthylacetat oder Alkylhalogenide, wie 1,2-Dichloräthan. Jedoch ergeben Ester das Problem, daß sie der Hydrolyse unterliegen, während Alkylhalogenide in der letzten Zeit als Carcinogen angesehen werden und deren Verwendung zur Behandlung der Additionsverbindung, die als Ausgangsmaterial für Nahrungsmittel verwendet wird, vermieden werden sollte.

Darüber hinaus ist es, wenn das organische Lösungsmittel weniger wirksam zur Auflösung der Additionsverbindung ist, erforderlich, es in einer größeren Menge zu verwenden, was zu wirtschaftlichen Nachteilen führt.

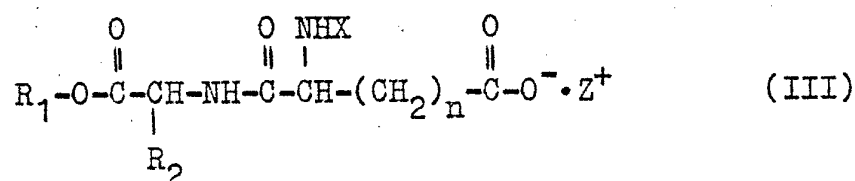
#### Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, die vorstehend genannten Schwierigkeiten zu überwinden.

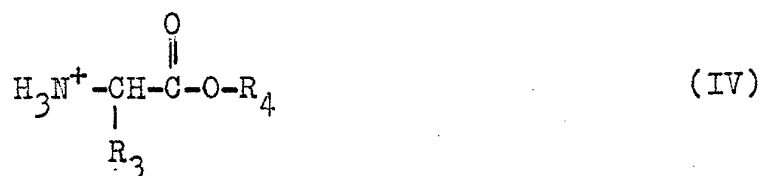
### Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Gewinnungsverfahren eines Dipeptids zu entwickeln, das in einem Gemisch von organischer und wäßriger Phase vorliegt.

Erfindungsgemäß wird eine organische Lösungsmittelphase, die im festen Zustand eine wesentliche Menge eines Dipeptidderivats der Formel

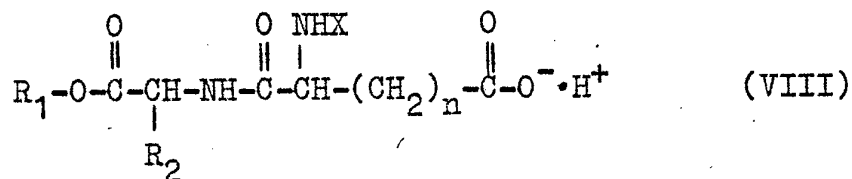


enthält, worin  $\text{R}_1$  Niederalkyl,  $\text{R}_2$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist,  $n = 1$  oder  $2$  ist und X eine Benzyl-oxycarbonylgruppe mit gegebenenfalls einem Kernsubstituenten ist, und Z ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivat der Formel



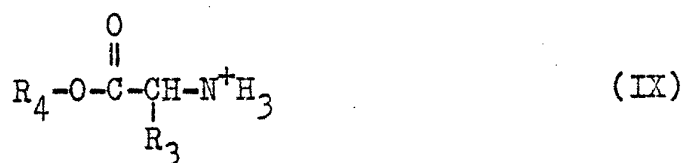
darstellt, worin  $\text{R}_3$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure und  $\text{R}_4$  eine Niederalkylgruppe ist, von einer wäßrigen Phase getrennt wird und anschließend eine Brönsted-Säure zu der abgetrennten organischen Lösungsmittelphase zugesetzt und damit vermischt, und das so erhaltene Gemisch einer Phasentrennung unterzogen wird, unter Bildung von

1. einer zweiten organischen Lösungsmittelphase, die ein Dipeptidesterderivat der Formel



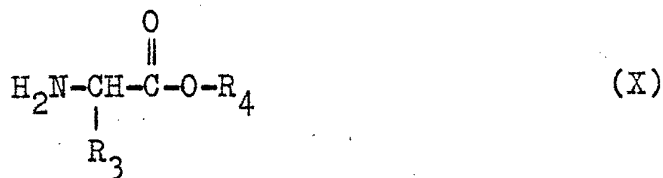
enthält, worin  $R_1$ ,  $R_2$ , X und n wie vorstehend definiert sind, und

2. einer zweiten wäßrigen Phase, die ein Aminosäureesterion enthält, mit der Formel



worin  $R_3$  und  $R_4$  wie vorstehend definiert sind.

Die beiden Phasen werden voneinander getrennt und das endgültige Dipeptidderivat wird aus der zweiten organischen Lösungsmittelphase gewonnen, während ein Aminosäureester der Formel



worin  $R_3$  und  $R_4$  wie vorstehend definiert sind, aus der zweiten wäßrigen Phase gewonnen wird.

Falls X in dem Dipeptidester eine Benzyloxycarbonylgruppe ist, so ist es vorteilhaft, Toluol als organisches Lösungsmittel zu verwenden, da Toluol leicht, wie nachstehend beschrieben, wiedergewonnen und erneut verwendet werden kann.

Die Menge an Wasser, die zu der ersten von der ersten wäßrigen

Phase abgetrennten organischen Lösungsmittelphase gefügt wird, liegt gewöhnlich bei etwa 0,5 bis etwa 15 Gew.-Teilen, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 10 Gew.-Teilen, basierend auf 1 Gew.-Teil der Additionsverbindung, unter Einbeziehung von Wasser, das von der Säure stammt. Wenn die Säure in der Form einer wäßrigen Lösung verwendet wird, so kann die erforderliche Wassermenge in der Form der wäßrigen Lösung der Säure zugesetzt werden.

Die zusammen mit dem Wasser zu der Reaktion mit der Additionsverbindung zuzusetzende Säure ist eine anorganische oder organische Brönsted-Säure. Als anorganische Brönsted-Säure können genannt werden Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure. Als organische Brönsted-Säure können Ameisensäure, Essigsäure, Zitronensäure oder Toluolsulfonsäure genannt werden. Diese Säuren können in der Form einer wäßrigen Lösung verwendet werden. Die Konzentration der Säure in der wäßrigen Lösung ist nicht kritisch und kann wahlfrei derart bestimmt werden, daß die Wassermenge in den vorstehend angegebenen Bereich fällt.

Darüber hinaus kann auch eine feste Säure, wie ein Kationenaustauscherharz vom H-Typ verwendet werden. In diesem Falle setzt sich eine derartige feste Säure am Boden des Systems ab.

Die wesentliche Funktion der Säure liegt in der elektrolytischen Dissoziation des Aminosäureesterteils der Additionsverbindung und dadurch der Bildung einer wäßrigen Lösung eines Salzes des Aminosäureesters. (Jedoch wird im Falle der Verwendung einer festen Säure der Aminosäureester mit den Wasserstoffionen der festen Säure ionenausgetauscht und aus dem wäßrigen Phasensystem abgezogen.) Daher ist die Menge der Säure, bezogen auf die Additionsverbindung in dem wäßrigen

Gemisch als Ausgangsmaterial eine stöchiometrische Menge oder mehr, d. h. von etwa 1 bis etwa 100 Äquivalente, vorzugsweise etwa 1 bis 20 Äquivalente, besonders bevorzugt etwa 1 bis etwa 10 Äquivalente, basierend auf 1 Mol der Additionsverbindung. Jedoch muß in einigen Fällen der Dipeptidester nicht notwendigerweise so rein, je nach seinem speziellen Zweck, sein. In einem derartigen Falle kann die Säure in einer Menge von weniger als der stöchiometrischen Menge verwendet werden.

Die Abtrennung des Dipeptids nach der elektrolytischen Dissoziation von der Additionsverbindung wird gewöhnlich durchgeführt durch Übertragen in das organische Lösungsmittel in der Form einer Aufschlämmung. Wird jedoch ein Keton, das zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist, verwendet, so kann die Abtrennung in der Form seiner Lösung erfolgen.

Die Temperatur zum Zeitpunkt der Behandlung der Additionsverbindung bei dieser Ausführungsform liegt gewöhnlich bei etwa 0 bis etwa 100 °C, vorzugsweise bei etwa 5 bis etwa 80 °C. Die Dissoziationsreaktion der Additionsverbindung ist gewöhnlich innerhalb von 10 min vollständig, vorausgesetzt, daß in entsprechender Weise gerührt wird.

Ist jedoch die Schutzgruppe X eine Gruppe, die relativ gut hydrolysierbar ist, wie eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, so sollte in entsprechender Weise darauf geachtet werden, die Reaktionszeit und die Reaktionstemperatur zu steuern, um eine Freisetzung der Gruppe zu vermeiden, mit Ausnahme des Falles, daß die Freisetzung der Gruppe gewünscht oder zulässig ist.

Beim Kontakt mit der Säure wird die feste Additionsverbindung in einen Dipeptidester und ein Salz eines Aminosäureesters mit der Säure dissoziiert. Der Dipeptidester weist eine geringe Löslichkeit in der wäßrigsauren Lösung auf, und der

wesentliche Anteil davon liegt in der organischen Lösungsmittelphase in der Form einer Aufschlammung oder eines gelösten Materials vor. Andererseits ist das Salz des Aminosäureesters in der wäßrigsauren Lösung sehr gut löslich und löst sich in der wäßrigen Phase. Wenn eine feste Säure verwendet wird, so fällt der Aminosäureester als ihr Salz aus. Somit führt das Reaktionssystem zu einem binären Phasensystem, das eine organische Phase, die den Dipeptidester in der Form einer Aufschlammung oder eines gelösten Materials enthält, und eine wäßrige Lösung des Salzes des Aminosäureesters aufweist. Die Trennung des binären Phasensystems kann nach einer üblichen Flüssigkeits-Flüssigkeits-Trennmethode erfolgen. Die Gewinnung des Aminosäureesters aus dem festen Säuresalz kann auch leicht in üblicher Weise durchgeführt werden.

#### Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele dienen zur weiteren Erläuterung der Erfindung.

#### Beispiel 1

In einen 2-l-Kolben wurden 53,45 g N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 107,84 g D,L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid beschickt, und 400 ml destilliertes Wasser, 100 ml einer wäßrigen 5n-Natriumhydroxidlösung, 7,2 g rohes Thermolysin (Thermoase PS-160, Warenzeichen) und 1,3 g Calciumacetatmonohydrat wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 40 °C unter Rühren umgesetzt. Nach 8 h wurde das Reaktionsgemisch zu einem wäßrigen Gemisch, das das Reaktionsprodukt im suspendierten Zustand enthielt, gefügt. Zu diesem wäßrigen Gemisch wurden 700 ml Toluol gefügt, und es wurde 20 min bei 40 °C gerührt. Beim Beenden des Rührens trennten

sich eine Toluolphase, die eine feste Komponente im suspendierten Zustand enthielt, und eine homogene transparente wäßrige Phase.

Ein Teil der festen Komponente wurde gesammelt, aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert und durch NMR, IR, Elementaranalyse und optische Drehung analysiert, wodurch sich bestätigte, daß es sich um eine 1:1-Additionsverbindung von Z-APM und hauptsächlich D-PM handelte.

Die Toluolphase wurde von der wäßrigen Phase abgetrennt und 500 ml einer wäßrigen 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Stehenlassen des Gemischs während etwa 20 min wurde die die feste Komponente enthaltende Toluolphase von der homogenen transparenten wäßrigen Phase abgetrennt.

Die abgetrennte Toluolphase wurde zweimal mit 200 ml destilliertem Wasser bei 60 °C gewaschen und auf Raumtemperatur gekühlt. Die Kristalle in der Toluolphase wurden durch Filtern unter verringertem Druck mittels eines Glasfilters gesammelt und getrocknet, wodurch man 73,42 g Z-APM erhielt (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial, 85,2 %; Reinheit 99,4 %).

### Beispiel 2

In einen 2-l-Kolben wurden 53,45 g N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 86,27 g L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid eingeführt, und 350 ml destilliertes Wasser, 90 ml einer wäßrigen 5n-Natriumhydroxidlösung, 4,8 g rohes Thermolysin (Thermoase PS-160, Warenzeichen) und 0,9 g Calciumacetatmonohydrat wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Rühren bei 40 °C umgesetzt. Nach 5 h wurden 600 ml Toluol zu

dem Reaktionsgemisch gefügt, und das Gemisch wurde 20 min bei 40 °C gerührt. Beim Beenden des Rührens trennten sich eine Toluolphase, die eine feste Komponente im suspendierten Zustand enthielt, und eine homogene transparente wäßrige Phase.

Ein Teil der festen Komponente wurde als Probe entnommen, aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert und in gleicher Weise wie im Beispiel 1 analysiert, wodurch sich eine 1:1-Additionsverbindung von Z-APM und L-PM bestätigte.

Die Toluolphase wurde von der wäßrigen Phase abgetrennt, und es wurden 500 ml einer 1n wäßrigen Chlorwasserstoffsäurelösung zugesetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Stehenlassen des Gemischs während 20 min wurde die Toluolphase, die die feste Komponente enthielt, von der homogenen transparenten wäßrigen Phase abgetrennt. Nach dem Kühlen der abgetrennten Toluolphase wurden die darin enthaltenen Kristalle durch Filtrieren unter verringertem Druck mittels eines Glasfilters gesammelt und getrocknet, wobei man 73,27 g Z-APM erhielt (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial, 85,3 %, Reinheit 99,7 %).

### Beispiel 3

Zu einer Suspension, hergestellt durch Suspendieren von 4,25 g einer 1:1-Additionsverbindung von Z-APM und D-PM in 35 ml Toluol, wurden 10 ml 1n-Chlorwasserstoffsäure und 20 ml destilliertes Wasser gefügt. Das Gemisch wurde 30 min bei 60 °C gerührt. Nach dem Stehenlassen des Gemischs während 20 min wurde die Toluolphase, die die feste Komponente enthielt, von der transparenten homogenen wäßrigen Phase abgetrennt. Die Toluolphase wurde zweimal mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen und das Lösungsmittel wurde durch Verdampfen mit-

tels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 2,92 g Z-APM (Reinheit 99,7 %) erhielt.

#### Beispiel 4

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 gearbeitet, wobei jedoch anstelle von Toluol Diisopropyläther verwendet wurde. Das Lösungsmittel wurde aus der Isopropylätherphase, die die feste Komponente enthielt, durch Verdampfen mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 2,96 g Z-APM (Reinheit 98,0 %) erhielt.

#### Beispiel 5

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 gearbeitet, wobei jedoch die Temperatur und die Zeit für das Vermischen der Toluolsuspension der Additionsverbindung und der wässrigen Chlorwasserstoffsäurelösung auf 25 °C bzw. 60 min geändert wurden, wodurch man 2,96 g Z-APM (Reinheit 98,1 %) erhielt.

#### Beispiel 6

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 vorgegangen, wobei jedoch 0,715 ml einer 95 % Schwefelsäure anstelle der Chlorwasserstoffsäure verwendet wurden, und 26,3 ml destilliertes Wasser anstelle von 20 ml verwendet wurden, wobei man 2,96 g Z-APM (Reinheit 99,6 %) erhielt.

#### Beispiel 7

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 6 gearbeitet, wobei jedoch 0,733 ml Essigsäure anstelle der 95 % Schwefelsäure verwendet wurden, wobei man 3,06 g Z-APM (Reinheit 91,7 %) erhielt.

### Beispiel 8

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 gearbeitet, wobei man jedoch n-Heptan anstelle von Toluol verwendete, wodurch man 3,12 g Z-APM (Reinheit 89,6 %) erhielt.

### Beispiel 9

In 20 ml Wasser wurden 5,0 g eines Natriumsalzes von N-Benzylloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester gelöst, und diese Lösung wurde tropfenweise zu 20 ml einer wäßrigen Lösung gefügt, die 5,0 g D,L-Valinmethylesterhydrochlorid enthielt, wobei gerührt wurde, worauf das Reaktionsprodukt ausfiel und das Reaktionsgemisch zu einer Suspension wurde. Nach dem Stehenlassen dieser Suspension bei Raumtemperatur während 2 h wurden 50 ml Methylisobutylketon zugesetzt, es wurde gerührt und anschließend stehengelassen, wobei sich eine Methylisobutylketon-Suspensionsphase, die das Reaktionsprodukt enthielt, und eine homogene transparente wäßrige Phase trennten. Die Methylisobutylketonsuspensionsphase wurde von der wäßrigen Phase abgetrennt und 10 ml einer wäßrigen 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung und 20 ml Wasser wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde 30 min bei 60 °C gerührt und anschließend ruhig stehengelassen, wobei sich eine homogene Methylisobutylketonphase und eine homogene wäßrige Phase trennten.

Methylisobutylketon wurde aus der Methylisobutylketonphase durch Verdampfen mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 4,5 g Z-APM (Reinheit 99,5 %) erhielt.

Außerdem wurde die wäßrige Phase durch Zusatz von Natriumcarbonat auf den pH-Wert 8 gebracht und anschließend mit

Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und nach dem Einblasen von Chlorwasserstoffgas wurde sie konzentriert. Diäthyläther wurde darüber hinaus zugesetzt, um eine Ausfällung der Kristalle zu bewirken, und die Kristalle wurden gesammelt. Man erhielt 1,6 g Kristalle von D-Valinmethylesterhydrochlorid (optische Reinheit 69 %).

### Beispiele 10 bis 13

Es wurde in gleicher Weise gearbeitet wie im Beispiel 3, wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM 5,00 g der 1:1 Additionsverbindungen von Z-APM und Aminosäureester, die sich von Phenylalaninmethylester unterschieden, verwendet wurden. Die so erhaltenen Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt:

Beispiele	Additionsverbindungen	gewonnene Z-APM	Reinheit
10	D-Valinmethylester	3,76 g	98,3 %
11	L-Alaninäthylester	3,82 g	99,4 %
12	D-Leucinmethylester	3,71 g	99,1 %
13	L-Tyrosinäthylester	3,11 g	98,4 %

### Beispiel 14

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 gearbeitet, wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-Benzyl-oxy-carbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanin-äthylester (Z-APE) und D-PM verwendet wurden, wodurch man 3,42 g Z-APE (Reinheit 98,8 %) erhielt.

Beispiel 15

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 3 gearbeitet, wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalaninmethylester (PMZ-APM) und D-PM verwendet wurden, und die Kontakttemperatur der Toluollösung mit der wäßrigen Chlorwasserstoffsäurelösung 20 °C betrug, wobei man 3,45 g PMZ-APM (Reinheit 97,2 %) erhielt.

Beispiel 16

In einem 2-l-Kolben wurden 53,45 g N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure und 107,84 g D,L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid eingeführt, und 400 ml destilliertes Wasser, 100 ml einer wäßrigen 5n-Natriumhydroxidlösung, 7,2 g rohes Thermolysin (Thermoase PS-160, Warenzeichen) und 1,3 g Calciumacetatmonohydrat wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 40 °C unter Rühren umgesetzt. Nach 8 h wurde ein Teil des festen Bestandteils in dem wäßrigen Gemisch in der Form einer Suspension als Probe entnommen, sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und in gleicher Weise wie im Beispiel 1 analysiert, wobei sich die feste Komponente als 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und hauptsächlich DMP bestätigte.

Zu dem wäßrigen Gemisch, d. h. dem Reaktionsgemisch, wurden 600 ml Toluol und 100 ml konzentrierte Chlorwasserstoffsäure gefügt, und das Gemisch wurde bei 60 °C 1 h gerührt und anschließend während etwa 20 min still stehengelassen, wobei sich eine Toluolphase, die einen festen Bestandteil enthielt, von der homogenen transparenten Phase abtrennte. Die abgetrennte Toluolphase wurde zweimal mit 200 ml destilliertem Wasser bei 60 °C gewaschen und anschließend auf Raumtempera-

tur gekühlt, und die Kristalle in der Toluolphase wurden durch Filtrieren unter verringertem Druck gesammelt, mittels eines Glasfilters getrocknet, wobei man 74,75 g Z-APM erhielt (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial, 86,3 %; Reinheit 99,3 %).

#### Beispiel 17

Die Reaktion wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 durchgeführt, wobei jedoch L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid anstelle von D,L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid verwendet wurde, 3,6 g rohes Thermolysin anstelle von 7,2 g eingesetzt wurden und 0,6 g Calciumacetat-monohydrat anstelle von 1,3 g verwendet wurden. Nach 8 h wurde ein Teil der festen Komponente aus dem wäßrigen Gemisch in Form einer Suspension als Probe entnommen, sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und anschließend in gleicher Weise wie im Beispiel 1 analysiert, wodurch die feste Komponente als eine 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und L-PM bestätigt wurde.

Das wäßrige Gemisch, d. h. das Reaktionsgemisch wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 behandelt und man erhielt Z-APM durch Filtrieren der Toluolphase in einer Menge von 74,56 g, getrocknet (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial 86,4 %, Reinheit 99,3 %).

#### Beispiel 18

In eine Suspension, erhalten durch Suspendieren von 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM in 20 ml destilliertem Wasser wurden 35 ml Toluol und 10 ml einer wäßrigen 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung gefügt, und das Gemisch wurde 30 min bei 60 °C gerührt und anschließend etwa

20 min stehengelassen, wobei sich die eine feste Komponente enthaltende Toluolphase von der homogenen transparenten wäßrigen Phase trennte. Die abgetrennte Toluolphase wurde zweimal mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen, und das Lösungsmittel wurde durch Verdampfen mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 3,49 g Z-APM (Reinheit 99,5 %) erhielt.

#### Beispiel 19

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch anstelle von Toluol Diisopropyläther verwendet wurde, wodurch man 3,36 g Z-APM (Reinheit 97,4 %) erhielt.

#### Beispiel 20

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch die Temperatur und die Mischzeit der wäßrigen Suspension der Additionsverbindung mit Toluol und der wäßrigen Chlorwasserstoffsäurelösung auf 25 °C bzw. 60 min geändert wurden, wobei man 3,45 g Z-APM (Reinheit 99,7 %) erhielt.

#### Beispiel 21

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch 10 ml 95 % Schwefelsäure anstelle von Chlorwasserstoffsäure verwendet wurden und 30 ml destilliertes Wasser anstelle von 20 ml verwendet wurden, wobei man 3,42 g Z-APM (Reinheit 99,5 %) erhielt.

#### Beispiel 22

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 21 gearbeitet, wobei jedoch 1,0 ml Essigsäure anstelle von 95 % Schwefel-

säure verwendet wurden, wodurch man 3,21 g Z-APM (Reinheit 91,8 %) erhielt.

#### Beispiel 23

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch anstelle von Toluol n-Heptan verwendet wurde, wodurch man 3,21 g Z-APM (Reinheit 91,8 %) erhielt.

#### Beispiel 24

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-Benzoyloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalaninäthylester (Z-APE) und D-PM verwendet wurde anstelle der 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM, wodurch man 3,38 g Z-APE (Reinheit 99,1 %) erhielt.

#### Beispiel 25

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch eine Suspension von 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester (PMZ-APM) und D-PM anstelle der Suspension von 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM verwendet wurden, und die Kontakttemperatur der wäßrigen Suspension mit Toluol und der wäßrigen Chlorwasserstoffsäure 20 °C betrug, wobei man 3,41 g PMZ-APM (Reinheit 98,4 %) erhielt.

#### Beispiel 26

80 ml einer heißen Äthylacetatlösung, enthaltend 6,66 g D,L-Phenylalaninmethylester und 200 ml einer heißen Äthyl-

acetatlösung, enthaltend 7,72 g N-Benzyloxycarbonyl- $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalaninmethylester wurden vermischt, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen, worauf die gebildete Additionsverbindung durch Filtrieren abgetrennt und getrocknet wurde. 5,00 g der so erhaltenen Additionsverbindung wurden in 20 ml destilliertem Wasser zur Erzielung eines wäßrigen Gemischs suspendiert. Zu diesem wäßrigen Gemisch wurden 35 ml Toluol und 10 ml einer wäßrigen 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung gefügt, und das Gemisch wurde 30 min bei 60 °C gerührt und anschließend 20 min ruhig stehengelassen. Die eine feste Komponente enthaltende Toluolphase wurde von der homogenen transparenten wäßrigen Phase abgetrennt. Die abgetrennte Toluolphase wurde zweimal mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen, und anschließend wurde das Lösungsmittel durch Verdampfen mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 3,47 g Z-APM (Reinheit 99,6 %) erhielt.

Außerdem wurden die wäßrige Phase von der Toluolphase abgetrennt und die Waschlösung von der Wäsche der Toluolphase vereint, und Natriumcarbonat wurde zugesetzt, um den pH-Wert der vereinten Lösung auf 8 einzustellen. Die Lösung wurde anschließend mit Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und nach dem Einblasen von Chlorwasserstoffsäuregas konzentriert. Diäthyläther wurde weiter zu der Kristallausfällung gefügt, und die Kristalle wurden durch Filtrieren gewonnen. Man erhielt 1,58 g Kristalle von D-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid (optische Reinheit 97 %).

#### Beispiele 27 bis 30

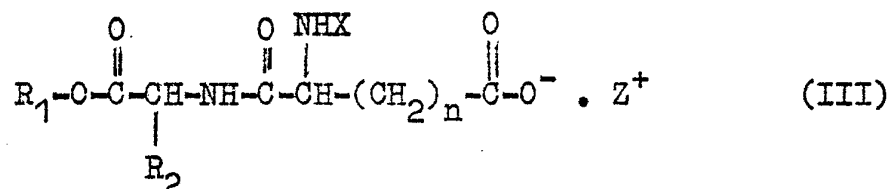
Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 18 gearbeitet, wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von

Z-APM und D-PM 5,00 g der 1:1 Additionsverbindungen von Z-APM und Aminosäureestern, die sich von Phenylalaninmethylester unterschieden, verwendet wurden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt:

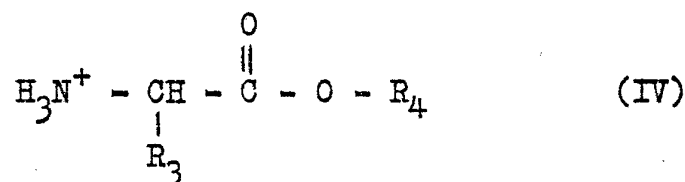
Beispiele	Additionsverbindungen	gewonnenes Z-APM	Reinheit
27	L-Valinäthylester	3,58 g	99,2 %
28	L-Alaninmethylester	3,92 g	99,3 %
29	L-Leucinäthylester	3,41 g	99,1 %
30	D-Tyrosinmethylester	3,13 g	98,8 %

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats, gekennzeichnet dadurch, daß eine organische Lösungsmittelphase, die im festen Zustand eine wesentliche Menge eines Dipeptidderivats der Formel

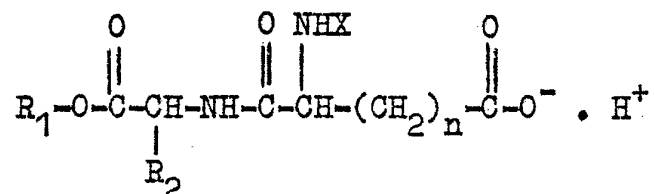


enthält, worin  $\text{R}_1$  Niederalkyl,  $\text{R}_2$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist,  $n = 1$  oder  $2$  ist und  $\text{X}$  eine Benzyloxycarbonylgruppe mit gegebenenfalls einen Kernsubstituenten ist, und  $\text{Z}$  ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivat der Formel



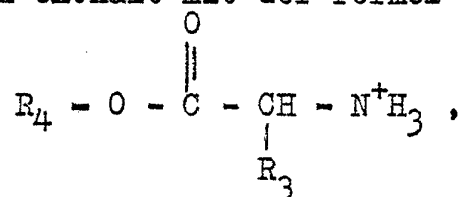
darstellt, worin  $\text{R}_3$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure und  $\text{R}_4$  eine Niederalkylgruppe ist, von einer wäßrigen Phase getrennt wird und anschließend Wasser und eine Brönsted-Säure zu der abgetrennten organischen Lösungsmittel-Phase gefügt und damit vermischt werden und das Gemisch der Phasentrennung unterzogen wird, unter Bildung von

- 1) einer zweiten organischen Lösungsmittelphase, die ein Dipeptidesterderivat der Formel



enthält, worin  $R_1$  eine Niedrigalkylgruppe ist,  $R_2$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist,  $n$  1 oder 2 ist,  $X$  eine Benzyloxycarbonylgruppe ist, die einen Kernsubstituenten haben kann, und

- 2) einer zweiten wäßrigen Phase, die ein Aminosäure-esterion enthält mit der Formel



worin  $R_4$  eine Niedrigalkylgruppe ist und eine  $R_3$  eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist, worauf die resultierenden Phasen getrennt und das endgültige Dipeptidderivat aus der zweiten organischen Lösungsmittelphase gewonnen wird.

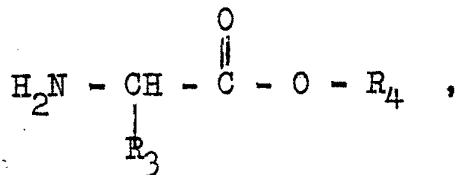
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel ein Keton, das ein binäres Phasensystem mit Wasser bilden kann, ein aliphatischer oder aromatischer Kohlenwasserstoff, ein Äther oder ein Gemisch davon ist, wobei das

Lösungsmittel in einer Menge von weniger als 10 Gew.-Teilen und nicht weniger als 1 Gew.-Teil, basierend auf der Menge des Dipeptidesterderivates verwendet wird.

3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Menge an Wasser in dem wäßrigen Gemisch bei etwa 1 bis etwa 10 Gew.-Teilen, basierend auf der Menge des Dipeptidesterderivates liegt.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Brönsted-Säure in einer Menge im Bereich von etwa 1 bis etwa 1 bis etwa 10 Äquivalenten, basierend auf der Molarität des Dipeptidesterderivates verwendet wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 oder 4, gekennzeichnet dadurch, daß das Wasser, das mit der Brönsted-Säure zu der ersten organischen Lösungsmittelphase gefügt wird, in einer Menge im Bereich von etwa 1 bis etwa 10 Gew.-Teilen, basierend auf der Menge des Dipeptidderivats verwendet wird.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4 oder 5, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_1$  und  $R_4$  Methylgruppen sind,  $R_2$  eine Benzylgruppe ist,  $R_3$  eine Methyl-, Isopropyl-, Isobutyl-, Benzyl- oder p-Hydroxybenzylgruppe ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe oder eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe ist und n 1 ist.

7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel Toluol, Methylisobutylketon oder Diisopropyläther ist und die Brönsted-Säure Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure ist.

8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6 oder 7, gekennzeichnet dadurch, daß ein Aminosäureester der Formel



worin  $\text{R}_3$  eine Benzylgruppe ist und  $\text{R}_4$  eine Methylgruppe ist, aus der zweiten wäßrigen Phase gewonnen wird.