

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 551 059**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **84 13225**

⑤1 Int Cl^e : C 07 C 101/22 // A 23 L 1/236.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 24 août 1984.

③0 Priorité : US, 26 août 1983, n° 526,579.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 9 du 1^{er} mars 1985.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite : HATCO CHEMICAL COR-
PORATION.* — US.

⑦2 Inventeur(s) : Clay Tzu-Chih Chen, K. Ming Wan et Mary
Shui-Chu Chen.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Z. Weinstein.

⑤4 Procédé de synthèse d'acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique et acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique obtenu
par ledit procédé.

⑤7 L'invention concerne un procédé de préparation d'acide
N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique (Z-asp).

Ce procédé comprend la condensation de chloroformate de
benzyle et d'un sel de métal dialcalin d'acide L-aspartique et
d'une solution aqueuse alcaline, et est caractérisé en ce qu'il
comprend l'addition du chloroformate de benzyle et d'une
solution d'hydroxyde de métal alcalin à un mélange aqueux
alcalin contenant l'acide L-aspartique en présence d'au moins
l'un parmi un tampon et un agent tensio-actif et ensuite
l'acidification du mélange réactionnel jusqu'à réalisation com-
plète de la réaction.

Le procédé de l'invention permet de réduire la durée du
cycle, tout en maintenant un rendement élevé avec une teneur
faible en sous-produits. Le tampon empêche de vastes fluctua-
tions de pH et minimise une réaction localisée. Ces conditions
sont souhaitables lorsque la vitesse réactionnelle a été accrue
par addition d'un agent tensio-actif ou une augmentation en
température du mélange réactionnel.

La présente invention concerne un procédé de synthèse d'acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique et l'acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique obtenu par ledit procédé.

5 D'autre part, l'invention concerne aussi la production d'acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique de grande pureté (Z-asp) approprié pour la production du L-aspartyl-L-phénylalanine méthyl ester (aspartame), un produit sucrant artificiel, et plus particulièrement un
10 procédé amélioré pour la préparation de Z-asp de pureté élevée à partir d'acide L-aspartique (L-AA) et de benzylchloroformate (BCF) en présence d'un agent tensio-actif et/ou d'un tampon.

Comme l'aspartame est connu pour être environ
15 100 fois plus sucrant que le sucrose en solution aqueuse, son emploi comme produit sucrant de faibles calories est hautement souhaitable dans de nombreuses applications alimentaires. L'aspartame est généralement produit en utilisant du Z-asp comme intermédiaire. En vue de l'emploi
20 final de l'aspartame dans les produits alimentaires comme substitut pour le sucre et d'autres produits sucrants artificiels, le Z-asp doit être aussi pur que possible et sensiblement dépourvu de sous-produits tels que le dipeptide, l'acide N-benzyloxycarbonyl-aspartyl-aspartique
25 (Z-asp-asp), le chlorure de benzyle, le benzaldéhyde, le dibenzyl carbonate et le chlorure de sodium qui sont généralement formés avant ou pendant la formation de Z-asp.

La réaction de condensation de BCF avec L-AA dans un milieu alcalin pour obtenir le Z-asp est bien
30 décrit dans la littérature. Avant 1981, les procédés décrits dans la littérature ne mentionnent pas les conditions de réaction et ne suggèrent pas d'additifs nécessaires pour produire Z-asp en un rendement élevé avec des quantités relativement faibles de sous-produits.

35 Le brevet américain N° 4 293 706 qui a été délivré le 6 Octobre 1981 à Gorman, et al enseigne que Z-asp peut être préparé sensiblement dépourvu de Z-asp-asp

par la réaction de BCF avec le sel disodique de L-AA dans un système aqueux avec un domaine de pH étroit d'environ 10,75 à 11,75. Les brevetés enseignent de manière large que la température réactionnelle peut être maintenue entre
5 10 et 45°C, bien que chacun des exemples de réalisation soit réalisé à la température ambiante qu'ils préfèrent. Les réactions sont réalisées sans l'emploi d'additifs qui pourraient améliorer le rendement et la pureté de ces produits et la vitesse des réactions. Les brevetés
10 cautionnent à la colonne 2, lignes 17-25 que lorsque les conditions réactionnelles varient, telles qu'un pH au delà de 12, une hydrolyse significative du chloroformate de benzyle se produit et le produit Z-asp contient plus que des quantités de traces d'impuretés et le rendement
15 est réduit. A la colonne 3, lignes 15-22, Gorman et al notent également que au fur et à mesure que la température de la réaction augmente, la quantité d'impuretés trouvées dans le produit Z-asp tend à augmenter.

Le brevet américain N° 4 354 091 délivré le 17
20 Août 1982 à Sugiyama , et al qui enseigne de manière similaire que Z-asp de pureté élevée peut être préparé par la réaction de BCF avec un sel de métal dialcalin de L-AA en réalisant la réaction avec le pH maintenu dans un domaine étroit de 12,0 à 13,5 pendant la réaction.
25 Sugiyama et al enseignent le maintien de la température de la réaction entre 0° et 30°C. Le seul exemple de réalisation maintient la température de la réaction entre 10° et 30°C pendant 3 heures. Les exemples comparatifs montrent une quantité accrue de Z-asp-asp lorsque le pH tombe
30 au-dessous de 12,0 simultanément avec une diminution en rendement. Encore, ces brevetés ne suggèrent pas l'emploi d'additifs pour promouvoir la réaction.

A la fois le brevet de Gorman et celui de Sugiyama sont capables de fournir des conditions de pH
35 et de température de réaction plutôt strictes pour préparer un produit Z-asp relativement pur avec des quantités relativement faibles de sous-produits Z-asp-asp, il reste

souhaitable d'accroître encore le rendement et la pureté ainsi que de fournir d'autres améliorations dans la synthèse de Z-asp. Ainsi, il est souhaitable de fournir un procédé de préparation de produit Z-asp en rendement supérieur et de pureté plus élevée avec des quantités inférieures Z-asp-asp, de chlorure de sodium et d'autres impuretés que cela était possible jusqu'à présent.

De manière générale, selon la présente invention, du Z-asp est synthétisé par la réaction de BCF avec un sel de métal dialcalin de L-AA. La réaction est réalisée dans un mélange réactionnel aqueux alcalin dans un domaine vaste de températures d'environ 5°C et 55°C en présence d'un agent tensio-actif et/ou d'un tampon. L'agent tensio-actif améliore la vitesse de la réaction à des températures modérées. Ainsi, il est préférable de réaliser une réaction en présence de tampon lorsque l'on utilise un agent tensio-actif. Le tampon, même en l'absence d'un agent tensio-actif, tend à empêcher une large fluctuation en pH aux sites réactionnels et résulte en un produit Z-asp ayant du Z-asp-asp réduit. A des températures supérieures, par exemple au-dessus de la température ambiante, qui résultent en des vitesses réactionnelles plus élevées et en l'absence d'agent tensio-actif, un tampon est utilisé pour contrôler le pH.

De préférence, la température du mélange réactionnel est maintenue entre environ 20° et 50°C avec le pH dans un domaine vaste d'environ 9,3 à 13,8. Lorsque la température est entre environ 31° et 35°C, le pH est de préférence maintenu entre environ 11,8 et 12,2.

Les additifs et les conditions réactionnelles obtiennent du Z-asp en des rendements élevés égaux ou supérieurs à 90% et des puretés égales ou supérieures à 99% avec seulement de faibles quantités du dipeptide, Z-asp-asp, de chlorure de sodium et de l'alcool de benzyle. En contrôlant la concentration d'acide aspartique, du solvant et du mode d'addition des réactifs, le rendement de Z-asp est accru et la formation d'impuretés et de dipeptide

peut être contrôlée de manière satisfaisante.

Ainsi, c'est un but de la présente invention de fournir un procédé amélioré de synthèse de Z-asp.

5 Un autre but de la présente invention est de fournir du Z-asp de pureté élevée.

Un autre but de la présente invention est de fournir du Z-asp de pureté élevée approprié pour la production de L-aspartyl-L-phénylalanine méthyl ester (aspartame) , un produit sucrant artificiel.

10 Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la préparation de Z-asp en conduisant la condensation de BCF et d'un sel de métal dialcalin de L-AA en présence d'un agent tensio-actif.

15 Encore un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la synthèse de Z-asp en réalisant la condensation de L-AA et de BCF en présence d'un système tampon.

20 Encore un autre but de la présente invention est d'améliorer le rendement du produit Z-asp en réduisant la quantité d'eau utilisée dans le lavage du produit brut.

Encore un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la synthèse de Z-asp à une vitesse réactionnelle plus rapide, en diminuant la durée du cycle de la réaction.

25 Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré de synthèse de Z-asp selon lequel la production du sous-produit Z-asp-asp est diminuée.

30 Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la préparation de Z-asp de pureté élevée contenant des quantités inférieures d'impuretés, telles que l'alcool de benzyle, du dibenzyl carbonate et des impuretés polaires et non polaires.

35 Encore un autre but de la présente invention est de fournir un procédé pour la synthèse de Z-asp sur un domaine vaste de températures.

Encore un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la synthèse de Z-asp

selon lequel la réaction est réalisée sur un domaine de pH vaste et un domaine de températures vaste qui fournit un rendement et une pureté améliorés.

5 Encore un autre but de la présente invention est de fournir un procédé amélioré pour la synthèse de Z-asp dans lequel la condensation de BCF et de L-AA peut être réalisée en présence d'un solvant organique.

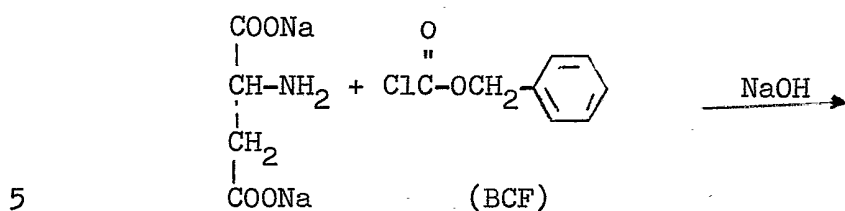
10 Encore d'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à des exemples donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

15 L'invention ainsi comprend les diverses étapes et la relation de l'une ou plusieurs de telles étapes l'une relativement à l'autre, et le produit possédant les caractéristiques et propriétés qui sont exemplifiées dans la description suivante, sans limiter la portée de l'invention, et en référence également aux dessins annexés
20 dans lesquels :

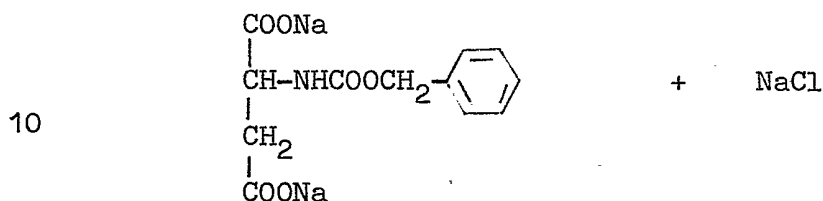
- la figure unique est un graphique montrant la concentration de Z-asp-asp dans le mélange réactionnel pendant la synthèse de Z-asp. On indique ainsi en ordonnées le pourcentage de dipeptide dans le mélange réactionnel
25 tandis qu'en abscisses on indique un pourcentage de BCF ajouté. La courbe A est obtenue sans l'addition de tampon, la courbe B est obtenue avec l'addition de carbonate de sodium comme tampon et la courbe C est obtenue avec l'addition de phosphate trisodique comme tampon.

30 Le Z-asp est le produit de la condensation de BCF et d'un sel de métal dialcalin de L-AA qui est ensuite acidifié pour convertir le produit de sel de métal dialcalin de Z-asp en acide libre. La condensation est réalisée selon l'équation suivante :

35



(acide L-aspartique , sel disodique)



(acide L-benzyloxycarbonyl-L-aspartique, sel disodique)

15 Selon l'invention, la synthèse est réalisée en chargeant le L-AA et de l'eau dans un récipient réactionnel qui a été équipé avec un condenseur de reflux, deux entonnoirs de goutte à goutte, un thermomètre, un mesureur de pH et un agitateur mécanique. Un hydroxyde de métal

20 alcalin aqueux, tel qu'un hydroxyde de sodium ou de potassium est ajouté pendant l'agitation jusqu'à ce que tout l'acide soit dissous. Un agent tensio-actif et/ou un tampon sont ensuite ajoutés.

25 Du benzyl chloroformate et de la soude caustique diluée additionnelle sont ajoutés simultanément au pH désiré entre environ 9,2 et 13,8 tout en maintenant la température entre environ 5° et 55°C. La température du mélange réactionnel est de préférence maintenue entre environ 20° et 45°C avec le pH entre environ 11,0 et 12,5.

30 De préférence la température est maintenue entre environ 31° et 35°C et le pH entre environ 11,8 et 12,2. Un léger excès de BCF peut être ajouté. La réaction est considérée comme étant complète lorsqu'il y a peu ou aucun L-AA non réagi détecté dans le système. La présence de L-AA n'ayant

35 pas réagi dans le mélange réactionnel est contrôlée par la méthode de la Ninhydrine. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi. Après ajustement du système aqueux à

un pH compris entre environ 6 et 7 avec de l'acide chlorhydrique, on enlève la couche organique.

5 La couche aqueuse est ensuite acidifiée avec de l'HCl concentré. Le mélange réactionnel est maintenu à 20° à 45°C jusqu'à ce que la croissance des cristaux soit complète, et il est ensuite graduellement refroidi à 5° à 10°C pendant plusieurs heures. Les cristaux de Z-asp sont recueillis par centrifugation, lavés avec de l'eau glacée et séchés.

10 La réaction du L-AA et de BCF peut être réalisée en présence d'un solvant organique qui peut avoir une densité supérieure ou inférieure à l'eau, tel que 1,1,1-trichloroéthane, du chlorure de méthylène, du toluène, du chlorobenzène et analogues. Les solvants
15 organiques peuvent être ajoutés au mélange réactionnel avant l'addition de BCF ou mélangés avec le BCF. Les solvants organiques suppriment l'hydrolyse de BCF et également aident à enlever les impuretés, telles que l'alcool de benzyle, le chlorure de benzyle, le dibenzyl
20 carbonate et analogues et qui peuvent être formées pendant ou avant la réaction. Le rapport du solvant organique au BCF n'est pas critique. Généralement, on utilise entre environ 0,02 et 2,0 parties en volume de solvant pour 1,0 partie de BCF.

25 Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la réaction est réalisée en présence d'un tampon. Des tampons appropriés incluent du carbonate de sodium, du bicarbonate de sodium, du phosphate trisodique, du phosphate disodique et de l'hexamétaphosphate de sodium.
30 Le tampon tend à empêcher de vastes fluctuations de pH et minimise des réactions localisées dans le récipient réactionnel. La quantité de tampon peut varier entre environ 4% et 40% en poids du L-AA selon la nature du tampon utilisé. Le tampon peut être ajouté avant l'addition
35 de BCF, ou pendant le cours de la réaction. L'addition de tampon minimise les fluctuations de pH et supprime la formation de Z-asp-asp. Ceci est important lorsque la

vitesse de la réaction est augmentée en réalisant la réaction à des températures élevées ou par addition d'un agent tensio-actif comme ceci sera discuté plus en détail ci-dessous.

- 5 La signification de la présence d'un tampon est démontrée par les résultats des essais A, B et C de l'exemple 1 comme représenté à la figure annexée.

EXEMPLE 1

- 10 Chaque essai a été réalisé dans un réacteur en verre de 113,5 litres environ équipé avec un agitateur mécanique, une pompe de circulation, un dispositif de mesure de pH et un dispositif de mesure de température. Une charge de 15,0 litres d'eau, de 5,0 kg de L-AA, d'environ 11,1 kg d'une solution de NaOH à 25% et de tampon de 15 Na_2CO_3 ou de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a été placée dans le réacteur comme indiqué au tableau I. Après l'ajustement du mélange réactionnel à un pH de 10,5 à 10,7, on chauffe à 45°-46°C comme indiqué au tableau I. On ajoute le benzyl chloro- 20 formate à une vitesse d'environ 4,5 kg/h au mélange réactionnel avec assez de solution de NaOH diluée pour maintenir le domaine de pH. Les températures sont maintenues entre 45° et 48°C pendant la réaction comme indiqué.

- 25 Pendant chaque essai un petit échantillon a été pris périodiquement et la teneur en dipeptide du mélange réactionnel est déterminée et celle-ci est représentée à la figure.

- 30 Après le refroidissement du mélange réactionnel à la température ambiante, on sépare la couche organique. La solution aqueuse est acidifiée avec le HCl concentré et du Z-asp est cristallisé, initialement à 30°-35°C, ensuite à 10°C pendant 2 heures. Le produit brut est centrifugé et lavé avec une quantité d'eau glacée égale au poids du produit et séché. Le produit de l'essai A qui 35 est préparé en l'absence d'un tampon, est obtenu à un rendement de 88% et une pureté de 99,5%. Les produits des essais B et C sont obtenus en des rendements de 92,7% et

93,6% et des puretés de 100,1% et 99,8%. En particulier la quantité du dipeptide présent dans l'essai A est d'environ 75% supérieure à celle des essais B et C et la teneur en alcool de benzyle est significativement supérieure dans l'essai A que dans l'essai B et l'essai C. Les résultats sont résumés au tableau I.

Le mode d'action des tampons n'est pas clair, mais on pense que la présence d'un tampon minimise de larges fluctuations de pH pendant le cours de la réaction. Comme l'acidité localisée est diminuée, la chance de formation de dipeptide est également diminuée. En réalisant la synthèse de Z-asp en présence d'un tampon, le tampon est ajouté au mélange réactionnel après que le L-AA est dissous.

TABLEAU I

REACTIFS	ESSAI A	ESSAI B	ESSAI C
L-AA (mole)	5000 (37,57)	5000 (37,57)	5000 (37,57)
BCF 95% (mole)	7050 (41,28)	7070 (41,44)	7210 (42,26)
Na ₂ CO ₃ g	-	1000	-
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O g	-	-	1000
<u>CONDITIONS DE REACTION</u>			
Temp., °C-initiale	46,2	46,4	47,6
-réaction	46,0-47,9	46,0-47,6	45,0-48,0
Domaine de pH	10,7-11,0	10,7-11,0	10,5-11,0
<u>ANALYSE DU PRODUIT</u>			
Rendement g (%)	8800 (88,0)	9305 (92,7)	9396 (93,6)
Essai %	99,5	100,1	99,8
*Dipeptides %	0,25	0,12	0,15
*BZOH %	0,33	0,01	0,01

* Analyse par HPLC en aire %

Selon un second mode de réalisation de l'invention, la réaction de condensation de BCF et de L-AA est réalisée en présence d'un agent tensio-actif. La présence de l'agent tensio-actif tend à minimiser des réactions localisées, et aide à promouvoir une dispersion. Dans ces conditions les réactions procèdent doucement et à une vitesse réactionnelle supérieure qui diminue la durée du cycle de réaction.

La structure et le type de l'agent tensio-actif n'est également pas critique.

Des chlorures d'ammonium quaternaire, des sulfonates, des sels d'ammonium quaternaire polyéthoxylé et de l'oxyde d'amine peuvent être utilisés. Des exemples de sels d'ammonium quaternaire incluent du chlorure de triméthylhexadécylammonium, du chlorure de diméthyltallow-décylammonium, du chlorure de triméthyltallow-ammonium et analogues. Des agents tensio-actifs cationiques, anioniques et amphotères peuvent être utilisés. La concentration d'agent tensio-actif n'est également pas critique et peut varier d'une quantité minimale efficace d'environ 0,01% à 5,00% en poids du L-AA utilisé.

Dans les exemples 2 et 3 on réalise des essais comparatifs pour montrer l'augmentation en vitesse de réaction due à la présence d'un agent tensio-actif. Dans les deux cas, les réactions étaient réalisées en utilisant le même équipement que celui utilisé à l'exemple 1.

EXEMPLE 2

Dans un réacteur en verre de 113,5 litres environ équipé avec un agitateur mécanique, une pompe de circulation, un dispositif de mesure de pH et un dispositif de mesure de température on place 24,0 litres d'eau, 8,0 kg de L-AA, environ 17,8 kg de solution de NaOH à 25%, 8 g de Arquad 16-50(une solution à 50% de chlorure de triméthylhexadécylammonium de Armak Co, Chicago, Illinois) comme agent tensio-actif et 1,6 kg de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ comme tampon. Après ajustement du mélange réactionnel à un pH de 11,8 à 11,9, on chauffe à 32°-34°C. Le chloroformate

de benzyle (environ 11,3 kg, 95% de pureté) mélangé avec les 4 kg de 1,1,1-trichloroéthane est ajouté à une vitesse d'environ 6 kg/h au mélange réactionnel avec assez de solution de NaOH dilué pour maintenir le pH dans le domaine. La température est maintenue entre 32° et 34°C pendant la réaction. La réaction est complète après 200 minutes à partir du début de l'addition de BCF. A ce moment on détecte peu ou pas de L-AA n'ayant pas réagi.

Après le refroidissement du mélange réactionnel à la température ambiante, on sépare la couche organique. La solution aqueuse est acidifiée avec du HCl concentré et on cristallise du Z-asp, initialement à 30°-35°C, ensuite à 10°C pendant 2 heures. Le produit brut est centrifugé, lavé avec environ 10 litres d'eau glacée et séché. La pureté du produit final est supérieure à 99,9% et elle contient une quantité égale ou inférieure à 0,08% de dipeptide, 0,1% d'alcool de benzyle, 0,2% du L-AA n'ayant pas réagi et 0,16% de chlorure de sodium. Les matériaux de départ et les résultats sont résumés au tableau II.

EXEMPLE III

De façon à comparer l'effet de l'agent tensio-actif sur la vitesse de la réaction, un essai de duplication est réalisé en utilisant les mêmes quantités de réactifs et l'équipement de l'exemple 2. Les conditions de réaction sont identiques à l'exemple 2 sauf que la température est accrue quelque peu à 35°-38°C. Malgré la température accrue, la réaction prend 360 minutes pour être complète. Le produit brut est lavé avec 15 litres d'eau glacée. La qualité du produit est environ la même que celle de l'exemple 1. Les matériaux de départ et les résultats pour les exemples 2 et 3 sont résumés au tableau II.

TABLEAU II

<u>REACTIFS</u>	<u>EXEMPLE 2</u>	<u>EXEMPLE 3</u>
L-AA g (mole)	8.000 (60,1)	8.000 (60,1)
BCF 95% g, (mole)	11.300 (66,2)	11.300 (66,2)
Arquad 16-50, g	8	-
Solvant, g	TCA 4000	TCE 4000
Na ₂ CO ₃ , g	-	-
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O, g	1.600	1.600
<u>CONDITIONS DE REACTION</u>		
Temp., °C - initiale	31,9	35,1
-réaction	32-34	35-38
Domaine de pH	11,8-11,9	11,8-11,9
Durée de la réaction (mn)	200	360
<u>ANALYSE DU PRODUIT</u>		
Rendement g, (%)	15.208 (94,7)	15.143 (94,3)
Essai %	99,9	100,1
*Dipeptides %	0,08	0,08
L-AA%	0,2	0,2
NaCl %	0,16	0,14
*BZOH %	0,1	0,1

* Analyse par HPLC en aire %

L'agent tensio-actif sert plusieurs buts. Dans une réaction hétérogène comme le présent procédé, le BCF seul ou combiné avec un solvant organique n'est pas miscible avec l'eau. Lorsqu'il est ajouté à une solution aqueuse contenant le sel de métal dialcalin du L-AA, la réaction a lieu pour la plupart à l'interface entre les deux faces. La réaction localisée peut générer un excès de HCl aux sites réactionnels et le pH peut être inférieur dans le mélange réactionnel dans l'ensemble. L'acidité localisée peut conduire à la formation de Z-asp-asp.

L'agent tensio-actif aide les deux phases à se mélanger plus uniformément, et ainsi la réaction a lieu dans le milieu réactionnel. En réalisant cela, toutes réactions localisées sont non seulement grandement minimisées, mais
5 la vitesse de réaction est beaucoup plus rapide et la durée de la réaction est réduite sensiblement comme montré à l'exemple 2 dans le tableau II.

Un autre avantage atteint par l'emploi de l'agent tensio-actif est une réduction en quantité d'eau nécessaire
10 pour laver le produit brut. Dans les essais sans agent tensio-actif, la quantité d'eau glacée requise est égale à environ le poids du produit de sorte que les produits secs contiendront moins de 0,2% de chlorure de sodium. Avec l'aide de l'agent tensio-actif, la quantité d'eau
15 glacée de lavage peut être réduite. Dans l'exemple 3 si l'on n'utilise pas d'agent tensio-actif le produit anhydre pèse environ 15.143 grammes et il a été lavé avec 15 litres d'eau glacée. La teneur en sodium du produit sec est de 0,14%. Dans les exemples 4, 5, 6 et 7 où des agents
20 tensio-actifs sont utilisés le poids de l'eau glacée de lavage est réduit à environ 40% du poids des produits, même si chaque produit contient 0,1% ou moins de chlorure de sodium. Les résultats sont résumés aux tableaux II et III.

25 Encore un autre avantage de l'emploi de l'agent tensio-actif est la capacité d'enlever d'autres impuretés, telles que l'alcool de benzyle à partir du produit pendant le lavage. Dans les essais sans agent tensio-actif, les cristaux de Z-asp généralement contiennent des quantités
30 de traces d'alcool de benzyle comme analysées par chromatographie liquide sous pression élevée (HPLC). Dans les cas où l'agent tensio-actif est utilisé, la présence d'alcool de benzyle est négligeable.

35 Comme décrit ci-dessus, un agent tensio-actif sert plusieurs buts, en conséquence, il peut être ajouté à différentes étapes de la réaction selon le résultat désiré. L'agent tensio-actif peut être ajouté avant

l'addition de BCF pour faciliter la réaction et l'enlèvement des impuretés. Ou, si l'enlèvement des impuretés est l'objectif principal ou essentiel, il peut être ajouté après que la réaction soit complète ou pendant le lavage du produit brut.

Il est bien connu que les vitesses réactionnelles sont plus rapides à des températures plus élevées, cependant, le BCF tend à s'hydrolyser plus rapidement à des températures plus élevées avec des rendements inférieurs et une augmentation de la pureté. A des températures inférieures, les vitesses réactionnelles sont plus faibles et l'excès de BCF s'accumule dans le mélange réactionnel qui également favorise l'hydrolyse. Avec l'addition de l'agent tensio-actif, la réaction peut être réalisée à une température modérée, mais à une vitesse réactionnelle presque aussi rapide qu'avec un procédé à température élevée sans hydrolyse de BCF significative accompagnante. En vue de cette augmentation de la vitesse réactionnelle il est préférable d'inclure un tampon dans le mélange réactionnel lorsque la réaction est réalisée avec un agent tensio-actif.

Les exemples suivants 4 à 8 illustrent la synthèse de Z-asp en accord avec les modes de réalisation préférés de l'invention selon lesquels la condensation de BCF et de L-AA est réalisée en présence à la fois d'un tampon et d'un agent tensio-actif ou à une température élevée en présence d'un tampon. Ils sont présentés à titre d'illustration seulement et non pas dans un sens limitatif. L'équipement utilisé et la procédure suivie sont mentionnés dans la description de l'exemple 4.

EXEMPLE 4

Dans un flacon multicol de 2 litres équipé avec un condenseur de reflux, deux entonnoirs de goutte à goutte, un thermomètre, un dispositif de mesure de pH et un agitateur mécanique, on place 133,1 grammes (1,00 mole) de L-AA et 400 ml d'eau. On ajoute une solution de NaOH à 25% sous agitation jusqu'à ce que le L-AA soit

complètement dissous et 0,15 gramme d'Arquad 16-50 comme agent tensio-actif. Environ 185 grammes (1,03 moles) de BCF pur à 95% mélangés avec 8 grammes de chlorobenzène comme solvant sont ajoutés au mélange réactionnel avec
5 une solution de NaOH dilué suffisante sous agitation pour maintenir le pH du mélange réactionnel à un pH entre 13,0-13,3. La température est initialement de 10°C et elle est maintenue entre environ 8°-10°C pendant l'addition du BCF. La présence de L-AA n'ayant pas réagi dans le mélange
10 réactionnel est contrôlée par la méthode à la Ninhydrine. La réaction est complète après un temps additionnel de 112 minutes et on détecte peu ou pas de L-AA n'ayant pas réagi dans le mélange réactionnel. On ajoute davantage de TCE au mélange réactionnel pour faciliter la séparation
15 de phase.

Après la séparation de la couche organique à partir du mélange réactionnel la solution aqueuse est acidifiée avec de l'HCl concentré et on cristallise le
20 Z-asp, initialement à 30-35°C, ensuite à 10°C pendant 2 heures. Le produit brut est centrifugé et lavé avec environ 40% de son poids d'eau glacée, et séché. La pureté du produit final est d'environ 100% et elle contient
25 0,03% de peptide, une quantité négligeable d'alcool de benzyle, moins de 0,2% de L-AA n'ayant pas réagi et 0,1% de chlorure de sodium. Les réactifs, conditions réactionnelles et les analyses de produit sont mentionnés au
tableau III.

Les conditions réactionnelles (température et pH) s'approchent des conditions* préférées enseignées dans le
30 brevet américain N° 4 345 091 (Sugiyama et al). Selon l'exemple de ce brevet, le temps de réaction pour 0,6 mole de L-AA à 10-30°C, un pH de 12,5-13,5 est de 180 minutes. Au contraire, l'exemple 4 incluant un agent tensio-actif selon l'invention à moins de 10°C nécessite seulement
35 112 minutes pour 1,0 mole de L-AA. Les autres résultats également se comparent favorablement comme suit :

	<u>U.S. 4 345 095</u>	<u>Exemple 4</u>
BCF, excès %	10	3
Rendement, %	86,2	91,2
L-AA	1,0	0,2

5

EXEMPLE 5

De manière à montrer l'effet de l'agent tensio-actif sur la vitesse de la réaction à un pH extrêmement élevé, un essai de duplication de l'exemple 4 est réalisé en utilisant les mêmes quantités de réactifs et équipement. Les conditions réactionnelles sont identiques à l'exemple 4, sauf que la température est maintenue à 4°-5°C avec le pH à 13,8-14,1 (principalement 14,0). Le rendement du produit est réduit et le L-AA et l'alcool de benzyle dans le produit est environ le même qu'à l'exemple 4. Les résultats sont résumés au tableau III.

15

EXEMPLES 6, 7 et 8

Les exemples 6 et 7 suivent la procédure de l'exemple 4. L'exemple 6 est réalisé à une température modérée de 24°-30°C et à un pH de 11,7-12,0. L'exemple 7 est réalisé à une température supérieure de 42°-44°C et un pH quelque peu inférieur de 10,5-11,3. L'exemple 8 illustre une réaction à température élevée à 46°-48°C en présence d'un tampon, mais en l'absence d'un solvant organique ou d'un agent tensio-actif. Les réactifs, les conditions réactionnelles et les analyses des produits sont mentionnés au tableau III.

25

TABLEAU III

<u>REACTIFS</u>	<u>EXEMPLE 4</u>	<u>EXEMPLE 5</u>	<u>EXEMPLE 6</u>	<u>EXEMPLE 7</u>	<u>EXEMPLE 8</u>
L-AA g (mole)	133,1 (1,00)	133,1 (1,00)	133,1 (1,00)	133,1 (1,00)	39,9 (0,30)
BCF 95%, g (mole)	185 (1,03)	188 (1,05)	184 (1,03)	182 (1,01)	54 (0,30)
Arquad 16-50, g	0,15	0,15	0,15	0,15	-
Solvant, g	Chloro- benzène, 8	chloro- benzène, 9	TCE, 80	Chloro- benzène, 10	-
Na ₂ CO ₃ g	-	-	-	10	-
Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O g	-	-	26	-	8
<u>CONDITIONS DE REACTION</u>					
Temp., °C	10	5	24	34	40
-initiale	8-10	4-5	24-30	42-44	46-48
-réaction	13,0-13,3	13,8-14,1	11,7-12,0	10,5-11,3	10,50-11,10
Domaine de pH					

TABLEAU III (suite)

<u>ANALYSE DU PRODUIT</u>	<u>EXEMPLE 4</u>	<u>EXEMPLE 5</u>	<u>EXEMPLE 6</u>	<u>EXEMPLE 7</u>	<u>EXEMPLE 8</u>
Rendement g, (%)	2435 (91,2)	222 (83,17)	245,7 (92)	222,5 (94,6)	76,5 (95,5)
*Essai %	100,0	99,4	99,8	100,0	99,80
**Dipeptides %	0,03	0,02	0,06	0,10	0,10
L-AA %	0,2	0,2	0,2	0,2	trace
*NaCl %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,20
*BZOH %	négligeable	négligeable	négligeable	négligeable	négligeable

* Analysé par titrage

** Analysé par chromatographie liquide haute pression en aire %

Z-asp est synthétisé selon l'invention par la condensation de BCF avec un sel de métal dialcalin de L-AA à des températures entre 5°-55°C et à un domaine de pH vaste compris entre 9,2 et 13,8 en présence d'un agent tensio-actif ou d'un tampon, ou à la fois d'un agent tensio-actif et d'un tampon. Dans le mode de réalisation davantage préféré de l'invention, la température du mélange réactionnel est maintenue entre environ 31°-35°C avec le pH du mélange réactionnel maintenu entre environ 11,8-12,2 en présence à la fois d'un tampon et d'un agent tensio-actif. En réalisant la réaction dans ces conditions selon l'invention, une qualité supérieure de Z-asp en rendement supérieur peut être obtenue avec la durée du cycle de la réaction sensiblement réduite.

On verra ainsi que les buts mentionnés précédemment, parmi lesquels ceux rendus apparents à partir de la description précédente, sont efficacement atteints et, puisque certaines modifications peuvent être réalisées dans la réalisation du procédé et dans le produit décrit, mentionnées sans s'écarter de l'esprit et de la portée de l'invention, il est bien entendu que toute la matière ou les moyens contenus dans la description précédente devront être interprétés comme étant donnés à titre d'illustration et non pas dans un sens limitatif.

L'invention comprend donc tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs diverses combinaisons. En particulier on doit comprendre que dans les revendications les ingrédients ou les composés mentionnés au singulier incluent également des mélanges compatibles de tels ingrédients lorsque le sens le permet.

R E V E N D I C A T I O N S

1.- Procédé de synthèse à une vitesse accrue de réaction et à une pureté supérieure d'acide N-benzyloxy-carbonyl-L-aspartique par condensation de chloroformate de benzyle et d'un sel de métal dialcalin d'acide L-aspartique dans une solution aqueuse alcaline , caractérisé en ce qu'il comprend l'addition de chloroformate de benzyle et d'une solution d'hydroxyde de métal alcalin à un mélange aqueux alcalin contenant l'acide L-aspartique en présence d'au moins l'un parmi un tampon et un agent tensio-actif et ensuite l'acidification du mélange réactionnel jusqu'à réalisation complète de la réaction.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction de condensation est réalisée en présence d'un tampon.

3.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la température du mélange réactionnel est maintenue entre environ 31°-55°C.

4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le pH du mélange réactionnel est maintenu entre environ 11,0-12,5.

5.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le pH du mélange réactionnel est maintenu entre environ 11,8-12,2 et la température est maintenue entre environ 31°-35°C.

6.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le tampon est présent en quantités comprises entre environ 4 à 40% en poids par rapport au poids de l'acide L-aspartique.

7.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le tampon est choisi parmi le groupe consistant de carbonate de sodium, de bicarbonate de sodium, de phosphate trisodique, d'hydrogénophosphate disodique et d'hexamétaphosphate de sodium.

8.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction de condensation est réalisée en présence d'un agent tensio-actif.

5 9.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la température du mélange réactionnel est maintenue entre environ 31°-35°C.

10 10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le pH du mélange réactionnel est maintenu entre environ 11,0-12,5.

11.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le pH du mélange réactionnel est maintenu entre environ 11,8-12,2 et la température est maintenue entre environ 31°-35°C.

15 12.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'agent tensio-actif est présent en quantités comprises entre environ 0,01 et 5,00% en poids par rapport au poids de l'acide L-aspartique.

20 13.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'agent tensio-actif est choisi parmi le groupe consistant de sulfonates de chlorures d'ammonium quaternaire, de sels d'ammonium quaternaire polyéthoxylé et d'oxydes d'amine.

25 14.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction de condensation est réalisée en présence à la fois d'un tampon et d'un agent tensio-actif.

30 15.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le pH du mélange réactionnel est maintenu entre environ 11,8-12,2 et la température est maintenue entre environ 31°-35°C.

35 16.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape de mélanger le chloroformate de benzyle avec un solvant organique avant l'addition de chloroformate de benzyle au mélange réactionnel contenant l'acide L-aspartique.

17.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal alcalin est

l'hydroxyde de sodium.

18.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mélange réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique.

5 19.- Procédé de synthèse à une vitesse accrue de réaction à une pureté supérieure d'acide L-benzyloxy-carbonyl-L-aspartique par condensation de chloroformate de benzyle et d'un sel de métal dialcalin d'acide L-aspartique dans une solution aqueuse alcaline,
10 caractérisé en ce qu'il comprend l'addition de chloroformate de benzyle et d'une solution d'hydroxyde de métal alcalin à un mélange aqueux alcalin contenant l'acide L-aspartique en présence d'un tampon et d'un agent tensio-actif tout en maintenant le pH du mélange réactionnel entre environ 11,8-12,2 et la température entre
15 environ 31°-35°C et en acidifiant le mélange réactionnel jusqu'à réalisation de la réaction.

20.- Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape de
20 mélanger le chloroformate de benzyle avec un solvant organique avant l'addition du chloroformate de benzyle au mélange réactionnel l'acide L-aspartique.

21.- Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal alcalin est
25 l'hydroxyde de sodium.

22.- Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le mélange réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique.

23.- Acide N-benzyloxycarbonyl-L-aspartique ayant
30 une teneur réduite en impuretés, caractérisé en ce qu'il comprend le produit de réaction de chloroformate de benzyle et d'un mélange réactionnel aqueux alcalin d'acide L-aspartique et d'hydroxyde de sodium en présence d'un tampon et d'un agent tensio-actif, le mélange réactionnel
35 étant maintenu à un pH entre environ 11,8 et 12,2 et à une température entre environ 31° et 35°C qui a été acidifié avec de l'acide chlorhydrique.

