



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 216 451 A5

3(51) C 07 C 103/52

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

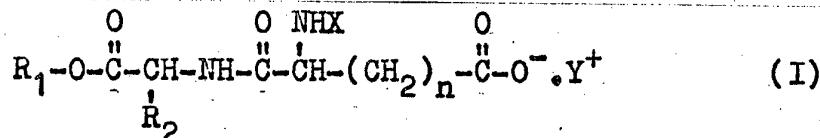
In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 07 C 243 407 5	(22)	21.09.82	(44)	12.12.84
(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, Chioda-ku, Tokyo, JP

(54) Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivates. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen und industriell vorteilhaften Verfahrens zur Abtrennung der Additionsverbindung. Erfindungsgemäß wird ein organisches Lösungsmittel, das geeignet ist zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser, mit einem wäßrigen Gemisch vermischt, das als eine feste Komponente ein Dipeptidesterderivat der Formel I



enthält, worin R₁ eine Niedrigalkylgruppe ist, R₂ eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist, n 1 oder 2 ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe, die einen Kernsubstituenten haben kann, und Y ein Wasserstoffion u. a. Danach läßt man das resultierende Gemisch absetzen unter Bildung einer organischen Lösungsmittelphase, die eine wesentliche Menge des Dipeptidderivates im festen Zustand enthält, und einer wäßrigen Phase. Die organische Lösungsmittelphase wird von der wäßrigen Phase getrennt und das Dipeptidderivat aus der organischen Lösungsmittelphase gewonnen.

Berlin, den 21.3.1983

AP C 07 C/243 407

(61 437/12)

Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats. Insbesondere betrifft sie ein Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats aus einer wässrigen Suspension davon mit einem organischen Lösungsmittel.

Eine Additionsverbindung eines Dipeptidesters, wie eines N-Benzoyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-niedrigalkylesters mit einem Aminosäureester, wie einem Phenylalanin-niedrigalkylester oder Valinniedrigalkylester, ist geeignet als Zwischenprodukt für einen α -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-PSen 4 165 311 und 4 256 836) oder durch Reaktion eines Dipeptidesters mit einem Aminosäureester in einem Lösungsmittel, wie Wasser (JA-Ösen Nr. 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 Zusatz-

verbindung sowie die Protease aus dem wässrigen Medium wirksam wiederzugewinnen.

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

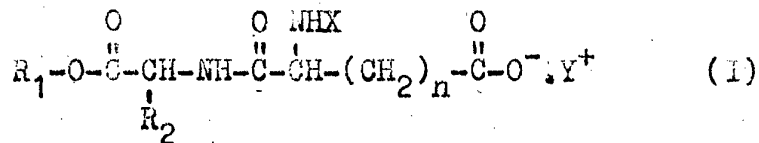
Es ist das Ziel der Erfindung, die vorstehenden Schwierigkeiten zu überwinden und ein industriell vorteilhaftes Verfahren zur Abtrennung der Additionsverbindung bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Abtrennung der Additionsverbindung in einem binären Phasensystem vorzunehmen.

Erfindungsgemäß, hat sich überraschenderweise gezeigt, daß in einem binären Phasensystem, das eine wäßrige Phase und eine organische Lösungsmittelphase enthält, Kristalle der Additionsverbindung in die organische Lösungsmittelphase im festen Zustand aufgenommen werden und dadurch wirksam von der wäßrigen Phase, die das nichtreagierte Material und Protease enthält, abgetrennt werden kann. Dies stellt den Gegenstand der Erfindung dar.

Durch die Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt zur Gewinnung eines Dipeptidderivats, das darin besteht, ein organisches Lösungsmittel, das zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist, mit einem wäßrigen Gemisch zu vermischen, das als eine feste Komponente ein Dipeptidesterderivat mit der Formel



enthält, worin R₁ eine Niedrigalkylgruppe ist, R₂ eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist, n 1 oder 2 ist, X eine Benzylloxycarbonylgruppe ist, die einen Kernsubstituenten aufweisen kann, und Y ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivat der Formel

1



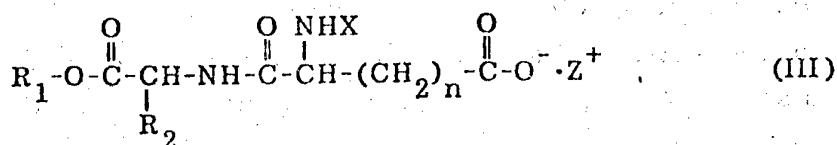
5

ist, worin R_3 eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure darstellt und R_4 eine Niedrigalkylgruppe ist, daß man das Reaktionsgemisch absetzen läßt, unter Bildung von

10

1. einer organischen Lösungsmittelphase, die im festen Zustand eine wesentliche Menge des Dipeptidderivats der Formel

15



20

enthält, worin R_1 , R_2 , n und X wie vorstehend definiert sind und Z ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivat der Formel

25



ist, worin R_3 und R_4 wie vorstehend definiert sind, und

30

2. einer wässrigen Phase,

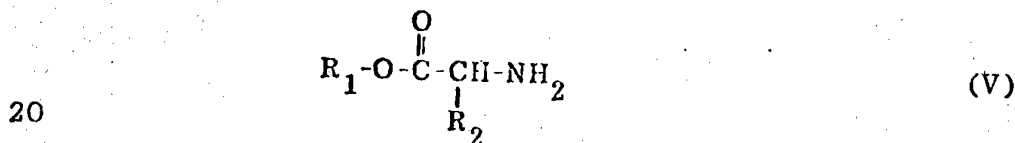
daß man die organische Lösungsmittelphase von der wässrigen Phase abtrennt und das Dipeptidderivat aus der organischen Lösungsmittelphase gewinnt.

35

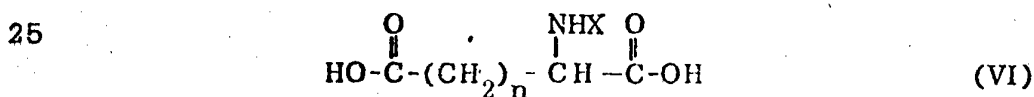
Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der

1 Erfindung beschrieben. In den vorstehenden Formeln be-
deuten R_1 und R_4 jeweils eine Niedrigalkylgruppe, wie
eine Methylgruppe, eine Äthylgruppe, eine Propylgruppe
oder eine Butylgruppe, und jedes von R_2 und R_3 ist eine
5 Seitenkettengruppe einer Aminosäure, wie eine Methyl-
gruppe, eine Isopropylgruppe, eine Isobutylgruppe, eine
Isoamylgruppe, eine Benzylgruppe oder eine p-Hydroxy-
benzylgruppe. Besonders bevorzugt als R_2 ist eine
Benzylgruppe. X kann eine Benzyloxycarbonylgruppe sein,
10 die einen Substituenten an ihrem Kern aufweisen kann,
wie eine Benzyloxycarbonylgruppe oder eine p-Methoxy-
benzyloxycarbonylgruppe.

Das wässrige Gemisch, das die Additionsverbindung der
15 allgemeinen Formel I im festen Zustand enthält, kann er-
halten werden durch Reaktion eines Aminosäureesters
mit der Formel



worin R_1 und R_2 wie vorstehend definiert sind, mit
einer N-geschützten Aminodicarbonsäure mit der Formel



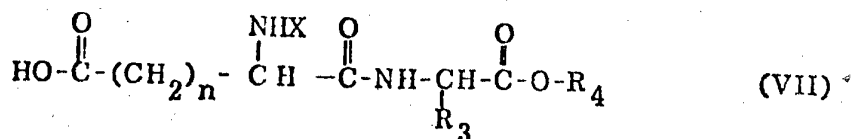
worin n und X wie vorstehend definiert sind, in An-
wesenheit einer Protease, vorzugsweise einer Metallo-
30 protease, in einem wässrigen Medium, wodurch die
Additionsverbindung der Formel I, worin R_3 gleich wie
 R_2 ist und R_4 gleich ist wie R_1 , ausfällt.

Die Additionsverbindung der Formel I, der Aminosäureester
35 der Formel V und die N-geschützte Aminodicarbonsäure der

- 1 Formel VI werden im folgenden einfach als Additionsver-
bindung, Aminosäureester bzw. N-geschützte Aminodicarbon-
säure bezeichnet.
- 5 Das vorstehend erwähnte Verfahren zur Herstellung der
Additionsverbindung kann durchgeführt werden unter den
Bedingungen, wie sie beschrieben werden in den US-PSen
4 165 311 und 4 256 836. Beispielsweise können folgende
Bedingungen angewendet werden.
- 10 Konzentrationen des Amino- von etwa 0,1 bis etwa 5 m,
säureesters und der N-ge- vorzugsweise von etwa 0,2
geschützten Aminodicarbon- bis etwa 2 m
säure in dem wässrigen
15 Medium
- Molverhältnis des Amino- von etwa 5:1 bis etwa 1:5,
säureesters zu der N-ge- vorzugsweise von 2:1 bis etwa
geschützten Aminodicarbon- 1:4
20 säure
- Enzyme Proteasen wie saure Protea-
sen, Thiolproteasen, Metallo-
25 proteasen und Serinproteasen,
vorzugsweise Metalloprotea-
sen, wie Prolisin, Thermoly-
sin, Tasinase und PS-Protease.
Ein rohes Enzym von z.B.
Thermoase kann ebenfalls
30 verwendet werden.
- Enzymkonzentration Gewöhnlich etwa 2 bis etwa
400 mg pro Mol des Substrats
(d.h. etwa 5×10^{-5} bis
05 etwa 1×10^{-2} mMol), vorzugs-

- 1 weise etwa 5 bis etwa 100 mg
pro Mol des Substrats (d.h.
etwa 1×10^{-4} bis 3×10^{-3}
mMol).
- 5 pH-Wert der Lösung zum
Zeitpunkt der Reaktion Im Bereich, in dem das
Enzym seine proteolytische
Wirksamkeit ausübt, gewöhn-
lich bei einem pH-Wert von
10 etwa 4 bis etwa 9, vorzugs-
weise von 4 bis 8.
- 15 Reaktionstemperatur Innerhalb des Temperatur-
bereichs, bei dem das Enzym
seine enzymatische Aktivi-
tät beibehalten kann, vor-
zugsweise etwa 20 bis etwa
50°C.
- 20 Bei diesem Verfahren werden der Aminosäureester bzw.
die N-geschützte Aminodicarbonsäure in der L-Form oder
in Form eines Gemischs der L- und D-Formen verwendet.
Wenn ein L-Aminosäureester verwendet wird, so erhält
man eine Additionsverbindung eines L,L-Dipeptidesters
25 mit einem L-Aminosäureester. Wenn ein Gemisch eines
L-Aminosäureesters und eines D-Aminosäureesters ver-
wendet wird, so erhält man eine Additionsverbindung
eines L,L-Dipeptidesters mit einem D-Aminosäureester
oder ein Gemisch von D- und L-Aminosäureestern.
- 30 Das erfindungsgemäße wässrige Gemisch kann auch herge-
stellt werden durch Reaktion des Aminosäureesters mit
einem Dipeptidester, dargestellt durch die allgemeine
Formel

35



1 worin R_3 , R_4 , n und X wie vorstehend definiert sind,
in einem wässrigen Medium. Die dabei erhaltene Addi-
tionsverbindung ist geeignet für die optische Trennung
von D,L-Aminosäureestern, wie beschrieben in den JA-OSen
5 Nr. 19234/80 und 73644/80.

Das erfindungsgemäß zu verwendende wässrige Gemisch ist
nicht auf eines beschränkt, das nach den vorstehenden
Verfahren erhalten wurde, und kann eine wässrige Sus-
10 pension sein, die erhalten wurde durch Suspendieren
einer Additionsverbindung, hergestellt nach den vor-
stehend erwähnten Verfahren oder jeglichen anderen Ver-
fahren in Wasser.

15 Wenn ein organisches Lösungsmittel, das zur Bildung
eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist,
zu dem so erhaltenen wässrigen Gemisch gefügt wird,
werden Kristalle der Additionsverbindung im festen Zu-
stand in die organische Lösungsmittelphase unter Bildung
20 einer Aufschlammung übertragen.

Als geeignetes organisches Lösungsmittel, das zur Bil-
dung eines binären Phasensystems geeignet ist, können
genannt werden, ein aromatischer Kohlenwasserstoff, wie
35 Benzol oder Toluol, ein aliphatischer Kohlenwasserstoff,
wie n-Hexan, n-Heptan oder Cyclohexan, ein Äther, wie
Diäthyläther oder Diisopropyläther, ein Keton, wie
Methylisobutylketon, Dibutylketon oder Diisobutylketon,
oder ein Gemisch davon.

30 Erfindungsgemäß wird das organische Lösungsmittel ver-
wendet, um die Additionsverbindung in der Form einer
Aufschlammung des Lösungsmittels abzutrennen und das
Lösungsmittel wird in einer Menge verwendet, die es
35 ermöglicht, daß ein wesentlicher Teil der Additionsver-
bindung in festem Zustand verbleibt. Die Menge des orga-

1 nischen Lösungsmittels beträgt gewöhnlich etwa 1 bis
etwa 20 Gew.-Teile, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 15
Gew.-Teile, besonders bevorzugt weniger als 10 Gew.-
5 Teile und nicht mehr als 1 Gew.-Teil, basierend auf
1 Gew.-Teil der Additionsverbindung.

Wenn das binäre Phasensystem, das eine organische Lö-
sungsmittelphase und eine wässrige Phase enthält, derart
gebildet wird, daß die Additionsverbindung in der or-
10 ganischen Phase suspendiert ist, so enthält das organi-
sche Lösungsmittel die Additionsverbindung im wesent-
lichen in fester aufgeschlämmter Form, obwohl ein Teil
der Additionsverbindung je nach ihrer Löslichkeit in
dem organischen Lösungsmittel gelöst ist.

15 Die Wassermenge in dem als Ausgangsmaterial gemäß der
Erfindung verwendeten wässrigen Gemisch ist nicht kri-
tisch. Sie liegt jedoch gewöhnlich bei 0,3 bis etwa
20 Gew.-Teilen, vorzugsweise etwa 0,5 bis etwa 15 Gew.-
Teilen, basierend auf 1 Gew.-Teil der Additionsverbindung.

Erfindungsgemäß liegt die Temperatur zum Zeitpunkt des
Kontakts des wässrigen Gemischs, das die Additionsver-
bindung enthält, mit dem organischen Lösungsmittel ge-
25 wöhnlich bei etwa 0 bis etwa 80°C. Jedoch ist es im
Falle, wenn die verbleibende Protease aus der wässrigen
Phase wiedergewonnen werden soll, bevorzugt, das Ver-
mischen bei einer Temperatur von etwa 5 bis etwa 50°C
durchzuführen. Die Zeit für das Vermischen oder die
30 Phasentrennung ist nicht kritisch und liegt gewöhnlich
bei 5 min bis 3 h.

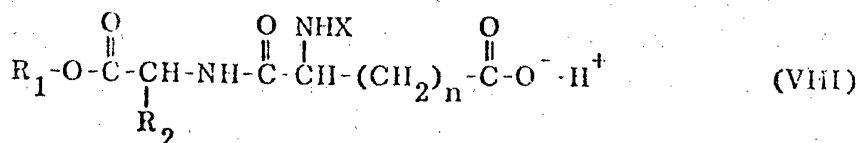
Die organische Lösungsmittelphase, die den wesentlichen
Anteil der Additionsverbindung in Form einer Aufschläm-
35 mung enthält, kann von der wässrigen Phase, die die

1 Protease enthält, in üblicher Weise, wie sie gewöhnlich
für die Flüssigkeits-Flüssigkeits-Trennung verwendet
wird, durchgeführt werden. Der Hauptanteil des Amino-
säureesters, der N-geschützten Aminodicarbonsäure und
5 der nichtumgesetzt und nichtdesaktiviert in der vor-
stehenden Reaktion zur Bildung der Additionsverbindung
verbleibenden Protease, verbleiben in der wässrigen
Phase, und dementsprechend kann die Additionsverbindung
von diesen abgetrennt werden. Die Additionsverbindung
10 kann aus der abgetrennten organischen Phase isoliert
werden in üblicher Weise, wie durch Filtrieren oder Ent-
fernen des organischen Lösungsmittels durch Verdampfen.

Es ist auch möglich, die abgetrennte organische Phase
15 mit einer wässrigen saueren Lösung in Kontakt zu brin-
gen, derart, daß der Aminosäureester als ein Bestand-
teil der Additionsverbindung dadurch in die wässrige
Phase übertragen wird, worauf der Aminosäureester aus
der wässrigen Phase isoliert wird, während der Dipeptid-
20 ester als anderer Bestandteil der Additionsverbindung
aus dem organischen Lösungsmittel isoliert wird.

Tatsächlich werden nach der Trennung der organischen
Lösungsmittelphase von der wässrigen Phase Wasser und
25 eine Brønsted-Säure zu der abgetrennten organischen
Lösungsmittelphase zugesetzt und damit vermischt, und
das so erhaltene Gemisch wird einer Phasentrennung un-
terzogen, unter Bildung von

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



35

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

2. einer zweiten wässrigen Phase, die ein Aminosäure-
5 esterion enthält, mit der Formel



10

worin R_3 und R_4 wie vorstehend definiert sind.

Die beiden Phasen werden voneinander getrennt und das
endgültige Dipeptidderivat wird aus der zweiten orga-
15 nischen Lösungsmittelphase gewonnen, während ein Amino-
säureester der Formel



20

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

25 Falls X in dem Dipeptidester eine Benzyloxycarbonyl-
gruppe ist, so ist es vorteilhaft, Toluol als organi-
sches Lösungsmittel zu verwenden, da Toluol leicht, wie
nachstehend beschrieben, wiedergewonnen und erneut ver-
wendet werden kann.

30

Die Menge an Wasser, die zu der ersten von der ersten
wässrigen Phase abgetrennten organischen Lösungsmittel-
phase gefügt wird, liegt gewöhnlich bei etwa 0,5 bis
etwa 15 Gew.-Teilen, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 10
35 Gew.-Teilen, basierend auf 1 Gew.-Teil der Additions-

1 verbindung, unter Einbeziehung von Wasser, das von der
Säure stammt. Wenn die Säure in der Form einer wässrigen
Lösung verwendet wird, so kann die erforderliche Wasser-
menge in der Form der wässrigen Lösung der Säure zuge-
5 setzt werden.

Die zusammen mit dem Wasser zu der Reaktion mit der
Additionsverbindung zuzusetzende Säure ist eine anorga-
nische oder organische Brønsted-Säure. Als anorganische
10 Brønsted-Säure können genannt werden, Chlorwasserstoff-
säure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder Phosphor-
säure. Als organische Brønsted-Säure können Ameisen-
säure, Essigsäure, Zitronensäure oder Toluolsulfonsäure
genannt werden. Diese Säuren können in der Form einer
15 wässrigen Lösung verwendet werden. Die Konzentration der
Säure in der wässrigen Lösung ist nicht kritisch und
kann wahlfrei derart bestimmt werden, daß die Wasser-
menge in den vorstehend angegebenen Bereich fällt.

20 Darüberhinaus 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.

25 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
30 Säure der Aminosäureester mit den Wasserstoffionen
der festen Säure ionenausgetauscht und aus dem wäss-
rigen Phasensystem abgezogen.) Daher ist die Menge
der Säure, bezogen auf die Additionsverbindung in dem
wässrigen Gemisch als Ausgangsmaterial eine stöchio-
35 metrische Menge oder mehr, d.h. von etwa 1 bis etwa 100

- 1 Äquivalente, vorzugsweise etwa 1 bis 20 Äquivalente,
besonders bevorzugt etwa 1 bis etwa 10 Äquivalente,
basierend auf 1 Mol der Additionsverbindung. Jedoch
5 muß in einigen Fällen der Dipeptidester nicht notwen-
digerweise 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.
- 10 Die Abtrennung des Dipeptids nach der elektrolytischen
Dissoziation von der Additionsverbindung wird gewöhn-
lich durchgeführt durch Übertragen in das organische
Lösungsmittel in der Form einer Aufschlämmung. Wird je-
doch ein Keton, das zur Bildung eines binären Phasen-
15 systems mit Wasser geeignet ist, verwendet, so kann
die Abtrennung in der Form seiner Lösung erfolgen.
- Die Temperatur zum Zeitpunkt der Behandlung der Addi-
tionsverbindung bei dieser Ausführungsform liegt ge-
20 wöhnlich 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.
- 25 Ist jedoch die Schutzgruppe X eine Gruppe, die relativ
gut hydrolysierbar ist, wie eine p-Methoxybenzyloxy-
carbonylgruppe, so sollte in entsprechender Weise darauf
geachtet werden, die Reaktionszeit und die Reaktions-
30 temperatur zu steuern, um eine Freisetzung der Gruppe
zu vermeiden, mit Ausnahme des Falles, daß die Frei-
setzung der Gruppe gewünscht oder zulässig ist.
- 35 Beim Kontakt mit der Säure wird die feste Additionsver-
bindung in einen Dipeptidester und ein Salz eines Amino-

1 säureesters 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 Auf-
5 schlämmung oder eines gelösten Materials vor. Anderer-
seits ist das Salz des Aminosäureesters in der wässrig-
sauren 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
10 führt das Reaktionssystem zu einem binären Phasensystem
das eine organische Phase, die den Dipeptidester in der
Form einer Aufschlämmung oder eines gelösten Materials
enthält, und eine wässrige Lösung des Salzes des
Aminosäureesters aufweist. Die Trennung des binären
15 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.

20 Der Dipeptidester kann aus der organischen Aufschläm-
mungsphase in üblicher Weise gewonnen werden, wie
durch Filtrieren, Zentrifugenabscheidung oder Ent-
fernung des Lösungsmittels durch Verdampfen. Anderer-
seits kann die organische Aufschlämmung direkt der
25 nächsten Reaktionsstufe zur Entfernung der Schutz-
gruppe unterzogen werden. Insbesondere für den Fall,
daß X in der Formel I für den Dipeptidester eine
Benzyloxycarbonylgruppe ist und das organische Lösungs-
mittel Toluol ist, wird, wenn Wasser zu der abge-
30 trennten organischen Aufschlammungsphase gefügt wird
und die Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppe reduktiv
durchgeführt wird, der Dipeptidester mit seiner
Aminogruppe mit entfernter Schutzgruppe in die wäss-
rige Phase übertragen. Es ist daher möglich, nicht nur
35 die Entfernung der N-Schutzgruppen durchzuführen, son-

1 dern auch die entfernten Schutzgruppen in das Toluol,
bei dem es sich um das gleiche wie das Lösungsmittel
handelt, zu übertragen. So führt die Entfernungsreak-
tion nicht zu einer Verunreinigung des Lösungsmittels,
5 und das als Lösungsmittel verwendete Toluol kann leicht
zur Wiederverwendung wiedergewonnen werden.

Dies ist besonders günstig für die industrielle Erzeu-
gung von Aspartam, einem Süßstoff mit geringem Kalorien-
10 gehalt, wenn die Additionsverbindung die allgemeine
Formel I aufweist, worin jedes von R_1 und R_4 eine Methyl-
gruppe ist, und jedes von R_2 und R_3 eine Benzylgruppe
ist und $n = 1$ ist.

15 Darüberhinaus ist es möglich, den Aminosäureester aus
der wässrig-sauren Lösung abgetrennt von der organischen
Phase in üblicher Weise zu gewinnen, z.B. durch Konzen-
trieren der sauren Lösung, um den Aminoester in Form
eines Salzes auskristallisieren zu lassen, oder durch
20 Alkalischemachen der Lösung, gefolgt von der Extraktion
mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel. Die
Wiedergewinnung des Aminosäureesters aus dem Salz
einer festen Säure kann auch leicht in üblicher Weise
durchgeführt werden.

25 Wenn die erfindungsgemäß als Ausgangsmaterial zu ver-
wendende Additionsverbindung nach der vorstehenden Me-
thode der US-PSen 4 165 311 und 4 256 836 hergestellt
wird, so liegt der Dipeptidrest davon in der L,L-Kon-
30 figuration vor, während der Aminosäureesterrest davon
in einer der L-Konfigurationen, D-Konfigurationen oder
einem Gemisch von D- und L-Konfigurationen vorliegt.
Das erfindungsgemäße Verfahren ist auf jegliche dieser
Konfigurations-Variationen durchführbar. Darüberhinaus
35 ist das erfindungsgemäße Verfahren auch auf den Fall

1 anwendbar, wenn der Dipeptidrest in der D,D-Konfiguration
der D,L-Konfiguration oder L,D-Konfiguration vorliegt.

Der durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltene
5 Dipeptidester ist als solcher brauchbar als Zwischen-
produkt für die Peptidsynthese, und ein Dipeptidester,
der erzielbar ist, durch Entfernung der Aminoschutz-
gruppe X daraus, ist ebenfalls eine brauchbare Verbin-
10 dung. Beispielsweise ist ein α -L-Aspartyl-L-phenylalanin-
methylester als Süßstoff brauchbar, wie vorstehend er-
wähnt. Darüberhinaus sind optisch getrennte Aminosäure-
ester aus der Additionsverbindung erhältlich, die durch
Vermischen des Dipeptidesters und eines racemischen
Aminosäureesters gebildet wird. Somit ist das Verfahren
15 als Methode zur optischen Trennung brauchbar.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird
eine Säure, vorzugsweise die vorstehende Brønsted-Säure
zu dem wässrigen Ausgangsgemisch zusammen mit dem orga-
20 nischen Lösungsmittel zum Zeitpunkt des Vermischens
des organischen Lösungsmittels mit dem wässrigen Ge-
misch gefügt, wodurch die Additionsverbindung, d.h.
das Dipeptidesterderivat der vorstehenden Formel I,
worin Y ein Ammoniumderivat der vorstehenden Formel II
25 ist, elektrolytisch durch Säure dissoziiert wird, zu
einem Dipeptidderivat der vorstehenden Formel III, worin Z
Wasserstoffion ist, und einem Aminosäureester der vor-
stehenden Formel X und das Dipeptidderivat wird in die
organische Lösungsmittelphase im wesentlichen im festen
30 Zustand übertragen, während der Aminosäureester in der
wässrigen Phase gelöst wird.

Das Dipeptidderivat und der Aminosäureester können aus
der organischen Lösungsmittel und bzw. der wässrigen
35 Phase in gleicher Weise, wie vorstehend für die Säure-

1 behandlung der abgetrennten organischen Phase beschrieben, wiedergewonnen werden.

5 Die für diese Ausführungsform zu verwendende Säure ist die gleiche anorganische oder organische Brønsted-Säure wie vorstehend in bezug auf die Säurebehandlung der abgetrennten organischen Lösungsmittelphase erwähnt. Die Menge der Säure liegt in gleicher Weise gewöhnlich bei etwa 1 bis etwa 100 Äquivalenten, vorzugsweise etwa 1
10 bis etwa 20 Äquivalenten, besonders bevorzugt etwa 1 bis etwa 10 Äquivalenten, basierend auf 1 Mol der Additionsverbindung. Jedoch kann die Menge geringer sein als die stöchiometrische Menge, falls das Dipeptid nicht in hochreinem Zustand erforderlich ist.

15 Die Wassermenge einschließlich des Wassers, das von der Säure stammt, liegt gewöhnlich bei etwa 0,3 bis etwa 20 Gew.-Teilen, vorzugsweise bei 0,5 bis etwa 15 Gew.-Teilen, besonders bevorzugt bei etwa 1 bis etwa 10 Gew.-
20 Teilen, basierend auf 1 Gew.-Teil der Additionsverbindung.

25 Andere Arbeitsbedingungen dieser Säurebehandlung, einschließlich der Abtrennung der organischen Lösungsmittelphase und der wässrig-sauren Phase, der Entfernung der N-Schutzgruppen und der Wiedergewinnung der gewünschten Produkte und der Lösungsmittel sind grundlegend die gleichen, wie sie vorstehend im Hinblick auf die Säurebehandlung der abgetrennten organischen Phase
30 beschrieben wurden.

35 In der von der organischen Lösungsmittelphase abgetrennten wässrigen Phase liegt noch eine wesentliche Menge der aktiven Protease vor. Diese wässrige Phase kann weiter nach dem Konzentrieren und Wiedergewinnen

1 der Protease mittels beispielsweise Ultrafiltration
erneut verwendet werden. Auch kann die Protease von
der wässrigen Phase in üblicher Weise, wie durch Aus-
salzen abgetrennt und dann wiederverwendet werden.
5 Unter diesen Methoden ist die Methode unter Anwendung
der Ultrafiltration für die industrielle Verfahrensweise
am vorteilhaftesten. Das Material für die Ultrafiltration
ist nicht kritisch und das Ultrafilter kann aus einem
Material hergestellt werden, wie Polyacrylnitril, Poly-
10 amid, Polyimid, Polysulfon oder Celluloseacetat. Es ist
jedoch bevorzugt, ein Filter mit einer geeigneten Frak-
tionierungseigenschaft je nach dem Molekulargewicht der
verwendeten Protease und einer minimalen Absorption der
Protease zu verwenden. Der Filtermodul ist nicht kri-
15 tisch und es kann jeglicher Hohlfasertyp, Spiraltyp,
Zylindertyp oder Rahmen- und Plattentyp verwendet wer-
den.

Die so konzentrierte Proteaselösung kann zusammen mit
20 dem Aminosäureester und der N-geschützten Aminodicar-
bonsäure, die nicht umgesetzt verblieb, als Ausgangs-
material für die anschließende Reaktion zur Bildung
der Additionsverbindung verwendet werden.

25 Alternativ kann eine wässrige Lösung eines Salzes zu
der konzentrierten Proteaselösung gefügt werden, und
es wird erneut filtriert, um die Protease in der Form
einer Lösung des Salzes, das die Protease in im wesent-
lichen reiner Form enthält, zu gewinnen.

30 Die Protease oder ihre Lösung, die so gewonnen wurde,
kann erneut verwendet werden zur Reaktion zur Bildung
der Additionsverbindung oder kann selbstverständlich
für andere Reaktionen, bei denen eine Protease er-
35 forderlich ist, verwendet werden.

Es ist ersichtlich, daß durch die vorliegende Erfindung die Additionsverbindung in dem wäßrigen Gemisch in wirksamer Weise von anderen Komponenten abgetrennt und in das organische Lösungsmittel in Form einer hochkonzentrierten Aufschlammung übertragen werden kann. Darüber hinaus muß die Additionsverbindung nicht vollständig gelöst sein, sondern der wesentliche Anteil davon kann in die organische Lösungsmittelphase im festen Zustand extrahiert werden, wodurch die Menge des erforderlichen Lösungsmittels auf ein Minimum herabgesetzt wird, was industriell von Vorteil ist. Darüber hinaus ist es möglich, ein organisches Lösungsmittel zu verwenden, das stabiler und physiologisch sicherer ist als die Lösungsmittel, die normalerweise bei der Extraktionsmethode, bei der die Additionsverbindung gelöst wird, verwendet werden. Auch ist es möglich, die Protease aus der wäßrigen Phase zu gewinnen und sie wiederzuverwenden, was wirtschaftlich vorteilhaft ist.

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-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid eingeführt und 400 ml destilliertes Wasser, 100 ml einer wäßrigen 5n-Natriumhydroxidlösung, 4,8 g rohes Thermolysin (Thermoase PS-160, Warenzeichen) und 0,9 g Calciumacetatmonohydrat zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 40 °C unter Rühren umgesetzt. Nach 15 h erhielt man ein Reaktionsgemisch in Form einer Suspension. 600 ml Toluol wurden zugesetzt, und das Gemisch wurde 20 min bei 40 °C gerührt. Bei Beendigung des Rührens wurden eine Toluolphase, die eine feste Komponente in suspendiertem Zustand und eine homogene wäßrige Phase getrennt. 10 min wurde die Toluolphase, die die feste Komponente enthielt, von der wäßrigen Phase abgetrennt, und die abgetrennte Toluolphase wurde zweimal mit 200 ml einer 0,5 % wäßrigen Calciumacetatlösung gewaschen, und anschließend wurde die feste Komponente durch Filtrieren unter Anwendung eines Glasfilters abgetrennt. Nach dem Trocknen wurde aus einem Äthylacetat-n-Hexan-Lösungsmittelgemisch umkristallisiert, wodurch 101,1 g (Ausbeute 83,2 %) einer 1 : 1 -Additionsverbindung von N-Benzoyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester (im folgenden als "Z-APM" bezeichnet) und Phenylalaninmethylester, hauptsächlich der D-Form (im folgenden als "D-PM" bezeichnet) erhalten wurden. Diese Kristalle bestätigten sich als 1 : 1 -Additionsverbindung von Z-APM und hauptsächlich D-PM, da NMR, IR, Elementaranalyse und optische Drehung im wesentlichen identisch mit den in der US-PS 4 165 311 angegebenen Daten waren.

1 Beispiel 2

Die Reaktionen zur Bildung des Peptids und zur Bildung
der Additionsverbindung wurden in gleicher Weise wie
5 im Beispiel 1 durchgeführt, wobei jedoch 7,2 g rohes
Thermolysin und 1,3 g Calciumacetat-monohydrat verwen-
det wurden und die Reaktionszeit 8 h betrug.

Nach Beendigung der Reaktionen wurde die gleiche Be-
10 handlung wie im Beispiel 1 durchgeführt, wobei jedoch
1 l Methylisobutylketon anstelle von Toluol verwendet
wurde. Nach der Trennung wurde die Methylisobutylketon-
phase, die die feste Komponente in suspendiertem Zustand
erhielt einer Entfernung des Lösungsmittel durch einen
15 Rotationsverdampfer unterzogen, und der Rückstand wurde
aus einem Äthylacetat/n-Hexan-Lösungsmittelgemisch um-
kristallisiert, unter Bildung von 102,2 g (Ausbeute
84,1 %) einer 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM.

20

Beispiel 3

Die Reaktionen der Peptidbildung und der Bildung der
25 Additionsverbindung wurden in gleicher Weise wie im
Beispiel 2 durchgeführt.

Nach Beendigung der Reaktionen wurde die gleiche Be-
handlung wie im Beispiel 2 durchgeführt, wobei jedoch
30 500 ml Diisopropyläther anstelle von Methylisobutylketon
verwendet wurden. Nach der Trennung wurde die Diisopropyl-
ätherphase, die die feste Komponente im suspendierten
Zustand enthielt, einer Entfernung des Lösungsmittels
durch einen Rotationsverdampfer unterzogen, und der
35 Rückstand wurde aus einem Äthylacetat/n-Hexan-Lösungs-

1 mittelgemisch umkristallisiert, wobei man 96,5 g
(Ausbeute 79,5 %) einer 1:1 Additionsverbindung von
Z-APM und D-PM erhielt.

5

Beispiel 4

Die Reaktionen zur Bildung des Peptids und zur Bildung
10 der Additionsverbindung wurden in gleicher Weise wie
im Beispiel 2 durchgeführt, wobei jedoch L-Phenylalanin-
methylester-hydrochlorid anstelle von D,L-Phenylalanin-
methylester-hydrochlorid verwendet wurde.

15 Nach Beendigung der Reaktionen wurde eine Nachbehandlung
in gleicher Weise wie im Beispiel 2 durchgeführt, wobei
jedoch ein Lösungsmittelgemisch aus 900 ml Methylisobutyl-
keton und 100 ml Toluol anstelle von Methylisobutylketon
verwendet wurde. Nach der Abtrennung von der wässrigen
20 Phase wurde aus der organischen Phase die feste
Komponente in suspendiertem Zustand enthielt, das Lö-
sungsmittel durch einen Rotationsverdampfer entfernt,
und der Rückstand wurde aus einem Äthylacetat/n-Hexan-
Lösungsmittelgemisch umkristallisiert, wobei man 98,68 g
25 (Ausbeute 81,2 %) einer 1:1 Additionsverbindung von
Z-APM und L-Phenylalaninmethylester (im folgenden als
"L-PM" bezeichnet) erhielt.

Die Additionsverbindung erwies sich als eine 1:1 Additions-
30 verbindung von Z-APM und L-PM, da NMR, IR, Elementar-
analyse und optische Drehung identisch mit den in der
US-PS 4 165 311 beschriebenen Daten waren.

35

1 Beispiel 5

In einen 200 ml Kolben wurden 5,345 g N-Benzoyloxycar-
bonyl- α -L-asparaginsäure und 10,784 g D,L-Phenylalanin-
5 methylester-hydrochlorid eingeführt, und 40 ml destillier-
tes Wasser, 10 ml einer wässrigen 5n-Natriumhydroxidlösung
200 mg Thermolysin und 130 mg Calciumacetat-monohydrat
wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 40°C unter Rühren
umgesetzt. Nach 7 h wurden 100 ml Methylisobutylketon
10 zu dem Reaktionsgemisch gefügt, und das Gemisch wurde
20 min bei 40°C gerührt. Nach 10 min nach Beenden des
Rührens wurde die organische Phase, die die feste Kom-
ponente enthielt, von der homogenen wässrigen Phase ab-
getrennt, und die abgetrennte organische Phase wurde
15 zweimal mit 20 ml einer 0,5 % wässrigen Calciumacetat-
lösung gewaschen, und anschließend wurde das Lösungsmittel
durch einen Rotationsverdampfer entfernt, und der Rück-
stand wurde aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert, wobei
man 10,34 g (Ausbeute 85,2 %) einer 1:1-Additionsverbin-
20 dung von Z-APM und hauptsächlich D-PM erhielt.

Beispiel 6

25 Die Peptidbildung, die Bildung der Additionsverbindung
und die Behandlung nach den Reaktionen wurden in glei-
cher Weise wie im Beispiel 5 durchgeführt, wobei jedoch
1 g PS-Protease anstelle von Thermolysin verwendet wurde.
30 Nach dem Umkristallisieren erhielt man 9,87 g (Ausbeute
81,2 %) einer 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und
hauptsächlich D-PM.

Beispiel 7

In 20 ml Wasser wurden 5,0 g eines Natriumsalzes von N-Benzoyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester gelöst, und diese Lösung wurde tropfenweise zu 20 ml einer wässrigen Lösung gefügt, die 5,0 g D,L-Valinmethylester enthielt, wobei gerührt wurde. Nach dem Stehenlassen des Gemischs bei Raumtemperatur während 2 h wurden 50 ml Methylisobutylketon zugesetzt, und es wurde gerührt. Die organische Lösungsmittelphase wurde von der wässrigen Phase abgetrennt, filtriert und getrocknet, wodurch 5,9 g einer Additionsverbindung von N-Benzoyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalaninmethylester und Valinmethylester erhalten wurden.

Diese Additionsverbindung wurde mit einer 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung behandelt, wodurch D-Valinmethylester mit einer optischen Reinheit von 72 % erhalten wurde.

Beispiel 8

In Beispiel 1 wurden die abgetrennte wässrige Phase und die Waschlösungen vereint (Gesamtmenge 840 ml), und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung wurde durch eine Casein-Digestionsmethode gemessen, wobei die Restaktivität als 88 % der beschickten Protease gefunden wurde. Diese wässrige Lösung wurde mittels einer Ultrafiltrationsvorrichtung vom Polysulfon-Hohlfasertyp fraktioniertes Molekulargewicht 5.000; spezifische Filteroberfläche 0,05 m²; Innendurchmesser der Hohlfaser 0,5 mm) konzentriert. Die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 86 % der beschickten Protease.

Unter Verwendung der so erhaltenen Proteaselösung wurde die Reaktion zur Bildung der Reaktionsverbindung wiederholt (diese Proteaselösung wurde zum Ersatz von 200 ml von 400 ml des destillierten Wasser verwendet, und die Menge an zugesetztem rohem Thermolysin betrug 0,6 g). Man erhielt im wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie bei der ersten Bildungsreaktion.

Beispiel 9

Im Beispiel 2 wurden die abgetrennte wässrige Phase und die Waschlösung vereint (Gesamtmenge 840 ml), und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung betrug 90 % der beschickten Protease. Diese Lösung wurde mittels einer Ultrafiltrationsvorrichtung aus Polyacrylnitril-Hohlfasern auf 200 ml konzentriert (Fraktionierungsmolekulargewicht 6.000; spezifische Filteroberfläche 0,2 m²; Innendurchmesser der Hohlfaser 0,8 mm).

Die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 75 % der beschickten Protease.

Beispiel 10

Im Beispiel 3 wurden die wässrige Phase und die Waschlösungen vereint (Gesamtmenge 680 ml), und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung betrug 72 % der beschickten Protease.

Diese Lösung wurde mittels einer Ultrafiltrationsvorrichtung vom Polyimid-Zylindertyp auf 200 ml konzentriert spezifische Filteroberfläche 0,014 m²; Fraktioniermolekulargewicht 20.000).

Die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 70 % der beschickten Protease.

Beispiel 11

Im Beispiel 4 wurden die abgetrennte wässrige Phase und die Waschlösungen vereint (Gesamtmenge 920 ml), und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung betrug 92 % der beschickten Protease.

Diese Lösung wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 8 auf 200 ml konzentriert.

Die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 88 % der beschickten Protease.

Darüber hinaus wurde die Lösung in einer konstanten Menge von 200 ml filtriert, während kontinuierlich 0,5 % wässrige Calciumacetatlösung zugesetzt wurden, um die durch die Filtration verringerte Menge zu ergänzen, wodurch eine 0,5 % wässrige Calciumacetatlösung von rohem Thermolysin, das im wesentlichen keine anderen Bestandteile erhielt, erhalten wurde. Die so erhaltene rohe Thermolysinlösung wies eine enzymatische Aktivität von 85 % der beschickten Protease auf.

Beispiel 12

Im Beispiel 5 wurden die wässrige Phase und die Waschlösungen vereint (Gesamtmenge 70 ml), und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung betrug 82 % der beschickten Protease.

Diese Lösung wurde mittels einer Ultrafiltrationsvorrichtung vom Polyacrylnitril-Hohlfasertyp auf 20 ml konzentriert (Minimodul NH-3 Modell, spezifische Filteroberfläche 25 cm²; Innendurchmesser der Hohlfaser 0,8 mm; Fraktionier-Molekulargewicht 6.000).

Die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 77 % der beschickten Protease.

Beispiel 13

Im Beispiel 6 wurden die abgetrennte wässrige Phase und die Waschlösungen vereint, und die enzymatische Aktivität der vereinten Lösung betrug 84 % der beschickten Protease.

Die Lösung wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 12 konzentriert, und die enzymatische Aktivität der konzentrierten Lösung betrug 78 % der beschickten Protease.

Beispiel 14

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 in gleicher Weise wie im Beispiel 1 analysiert, wodurch sich bestätigte, daß es sich um eine 1 : 1 -Additionsverbindung von Z-AMP 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 Filtrieren unter verringertem Druck mittels eines Glasfilters gesammelt und getrocknet, wodurch man 73,42 g Z-APM erhielt (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangs-

material, 85,2 %; Reinheit 99,4 %).

Beispiel 15

In einen 2-l-Kolben wurden 53,45 g N-Benzoyloxycarbonyl-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 vermindertem Druck mittels eines Glasfilters gesammelt und getrocknet, wobei man 73,27 g Z-APM erhielt (Gesamtaus-

1 beute, bezogen auf das Ausgangsmaterial, 85,3 %, Reinheit
99,7 %).

5

Beispiel 16

Zu einer Suspension, hergestellt durch Suspendieren
von 4,25 g einer 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und
10 D-PM in 35 ml Toluol, wurden 10 ml 1n-Chlorwasserstoff-
säure 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
15 feste Komponente enthielt, von der transparenten homo-
genen wässrigen Phase abgetrennt. Die Toluolphase wurde
zweimal mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen und
das Lösungsmittel wurde durch Verdampfen mittels eines
Rotationsverdampfers entfernt, wobei man 2,92 g Z-APM
(Reinheit 99,7 %) erhielt.

20

Beispiel 17

25 Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 gearbeitet,
wobei jedoch anstelle von Toluol Diisopropyläther verwen-
det wurde. Das Lösungsmittel wurde aus der Isopropyläther-
phase, die die feste Komponente enthielt, durch Verdampfen
mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, wobei man
30 2,96 g Z-APM (Reinheit 98,0 %) erhielt.

35

1 Beispiel 18

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 gearbeitet, wobei jedoch die Temperatur und die Zeit für das Vermischen der Toluolsuspension der Additionsverbindung und
5 der wässrigen Chlorwasserstoffsäurelösung auf 25°C bzw. 60 min geändert wurden, wodurch man 2,96 g Z-APM (Reinheit 98,1 %) erhielt.

10

Beispiel 19

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 vorgegangen, wobei jedoch 0,715 ml einer 95 % Schwefelsäure
15 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.

20

Beispiel 20

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 19 gearbeitet, wobei jedoch 0,733 ml Essigsäure anstelle der 95 % Schwefelsäure verwendet wurden, wobei man 3,06 g Z-APM
25 (Reinheit 91,7 %) erhielt.

30

Beispiel 21

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 gearbeitet, wobei man jedoch n-Heptan anstelle von Toluol verwendete,
35 wodurch man 3,12 g Z-APM (Reinheit 89,6 %) erhielt.

1 B e i s p i e l 2 2

In 20 ml Wasser wurden 5,0 g eines Natriumsalzes von
N-Benzylloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-methyl-
5 ester gelöst, und diese Lösung wurde tropfenweise zu 20 ml
einer wässrigen Lösung gefügt, die 5,0 g D,L-Valinmethyl-
ester-hydrochlorid enthielt, wobei gerührt wurde, worauf
das Reaktionsprodukt ausfiel und das Reaktionsgemisch
zu einer Suspension wurde. Nach dem Stehenlassen dieser
10 Suspension bei Raumtemperatur während 2 h, wurden 50 ml
Methylisobutylketon zugesetzt, es wurde gerührt und an-
schließend stehengelassen, wobei sich eine Methylisobutyl-
keton-Suspensionsphase, die das Reaktionsprodukt enthielt,
und eine homogene transparente wässrige Phase trennten.
15 Die Methylisobutylketonsuspensionsphase wurde von der
wässrigen Phase abgetrennt und 10 ml einer wässrigen 1n-
Chlorwasserstoffsäurelösung und 20 ml Wasser wurden zuge-
setzt. Das Gemisch wurde 30 min bei 60°C gerührt und an-
schließend ruhig stehengelassen, wobei sich eine homogene
20 Methylisobutylketonphase und eine homogene wässrige Phase
trennten.

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

Außerdem wurde die wässrige Phase durch Zusatz von Natrium-
carbonat auf den pH-Wert 8 gebracht und anschließend mit
Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde
30 über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und nach
dem Einblasen von Chlorwasserstoffgas wurde sie konzen-
triert. Diäthyläther wurde darüberhinaus zugesetzt, um
eine Ausfällung der Kristalle zu bewirken, und die Kri-
stalle wurden gesammelt. Man erhielt 1,6 g Kristalle von
35 D-Valinmethylester-hydrochlorid (optische Reinheit 69 %).

1 Beispiele 23 bis 26

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

10	Beispiele	Additions - Verbindungen	gewonnene Z-APM (Reinheit)
	23	D-Valinmethylester	3,76 g (98,3 %)
	24	L-Alaninäthylester	3,82 g (99,4 %)
	25	D-Leucinmethylester	3,71 g (99,1 %)
15	26	L-Tyrosinäthylester	3,11 g (98,4 %)

Beispiel 27

20 Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 gearbeitet,
wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von
Z-APM und D-PM 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von
N-Benzyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-äthyl-
25 ester (Z-APE) und D-PM verwendet wurden, wodurch man
3,42 g Z-APE (Reinheit 98,8 %) erhielt.

30 Beispiel 28

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 16 gearbeitet,
wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von
Z-APM und D-PM 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von
35 N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanin-
methylester (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 29

In einen 2-l-Kolben wurden 53,45 g N-Benzylloxycarbonyl-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 stehen gelassen, 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 Raumtemperatur 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

1 (Gesamtausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial,
86,3 %; Reinheit 99,3 %).

5

B e i s p i e l 3 0

Die Reaktion wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 29
durchgeführt, wobei jedoch L-Phenylalaninmethylester-
10 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 Calcium-
acetat-monohydrat anstelle von 1,3 g verwendet wurden.
Nach 8 h wurde ein Teil der festen Komponente aus dem
15 wässrigen Gemisch in Form einer Suspension als Probe
entnommen, sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen, ge-
trocknet und anschließend in gleicher Weise wie im Bei-
spiel 1 analysiert, wodurch die feste Komponente als
eine 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und L-PM bestätigt
20 wurde.

Das wässrige Gemisch, d.h. das Reaktionsgemisch wurde
in gleicher Weise wie im Beispiel 29 behandelt und man
erhielt Z-APM durch Filtrieren der Toluolphase in einer
25 Menge von 74,56 g, getrocknet (Gesamtausbeute, bezogen
auf das Ausgangsmaterial 86,4 %, Reinheit 99,3 %).

30 B e i s p i e l 3 1

In eine Suspension, erhalten durch Suspendieren von
5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von Z-APM und D-PM
35 in 20 ml destilliertem Wasser wurden 35 ml Toluol und

1 10 ml einer wässrigen 1n-Chlorwasserstoffsäurelösung ge-
fügt, und das Gemisch wurde 30 min bei 60°C gerührt und
anschließend etwa 20 min stengelassen, wobei sich die
eine feste Komponente enthaltende Toluolphase von der
5 homogenen transparenten wässrigen Phase trennte. Die ab-
getrennte Toluolphase wurde zweimal mit 20 ml destillier-
tem Wasser gewaschen, und das Lösungsmittel wurde durch
Verdampfen mittels eines Rotationsverdampfers entfernt,
wobei man 3,49 g Z-APM (Reinheit 99,5 %) erhielt.

10

Beispiel 32

15 Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet,
wobei jedoch anstelle von Toluol Diisopropyläther ver-
wendet wurde, wodurch man 3,36 g Z-APM (Reinheit 97,4 %)
erhielt.

20

Beispiel 33

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet,
25 wobei jedoch die Temperatur und die Mischzeit der wäss-
rigen 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.

30

Beispiel 34

35 Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet,

- 1 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.

5

Beispiel 35

- 10 Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 34 gearbeitet, wobei jedoch 1,0 ml Essigsäure anstelle von 95 % Schwefelsäure verwendet wurden, wodurch man 3,21 g Z-APM (Reinheit 91,8 %) erhielt.

15

Beispiel 36

- Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet, wobei jedoch anstelle von Toluol n-Heptan verwendet wurde, wodurch man 3,21 g Z-APM (Reinheit 91,8 %) erhielt.

25 Beispiel 37

- Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet, wobei jedoch 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-Benzoyloxycarbonyl- α -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.

35

1 Beispiel 38

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet, wobei jedoch eine Suspension von 5,00 g einer 1:1 Additionsverbindung von N-p-Methoxybenzyloxycarbonyl- α -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.

15 Beispiel 39

80 ml einer heißen Äthylacetatlösung, enthaltend 6,66 g D,L-Phenylalaninmethylester und 200 ml einer heißen Äthylacetatlösung, enthaltend 7,72 g N-Benzyloxycarbonyl- α -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.

- 1 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.
- 5 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
- 10 1,58 g Kristalle von D-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid (optische Reinheit 97 %).

15

Beispiele 40 bis 43

Es wurde in gleicher Weise wie im Beispiel 31 gearbeitet, wobei jedoch anstelle der 1:1 Additionsverbindung von

20 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:

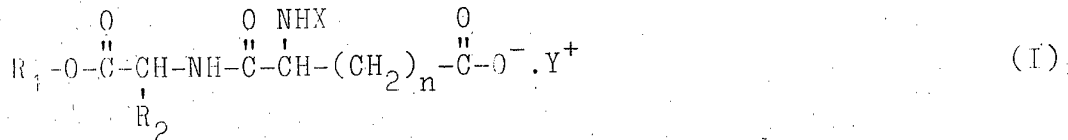
25

Beispiele	Additions - Verbindungen	gewonnenes Z-APM (Reinheit)
40	L-Valinäthylester	3,58 g (99,2 %)
41	L-Alaninmethylester	3,92 g (99,3 %)
42	L-Leucinäthylester	3,41 g (99,1 %)
30 43	D-Tyrosinmethylester	3,13 g (98,8 %)

35

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung eines Dipeptidderivats, gekennzeichnet dadurch, daß man ein organisches Lösungsmittel, das geeignet ist zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser mit einem wäßrigen Gemisch vermischt, das als festen Bestandteil ein Dipeptidesterderivat enthält mit der Formel

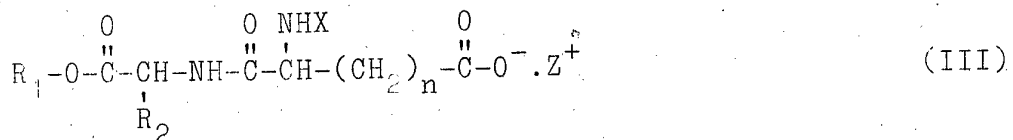


worin R_1 eine Niedrigalkylgruppe ist, R_2 eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist, n 1 oder 2 ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe ist, die einen Kernsubstituenten aufweisen kann, und Y ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivation mit der Formel



ist, worin R_3 eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist und R_4 eine Niedrigalkylgruppe ist, das resultierende Gemisch absetzen läßt, unter Bildung von

1) einer organischen Lösungsmittelphase, enthaltend in festem Zustand eine wesentliche Menge eines Dipeptidderivats der Formel



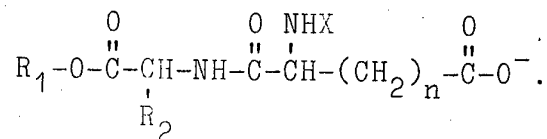
worin R_1 , R_2 , n und X wie vorstehend definiert sind, und Z ein Wasserstoffion oder ein Ammoniumderivation der Formel



worin R_3 und R_4 wie vorstehend definiert sind, und
2) einer wäßrigen Phase,

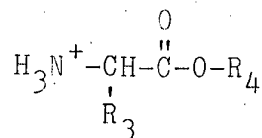
und die organische Lösungsmittelphase von der wäßrigen Phase abtrennt und das Dipeptidderivat aus der organischen Lösungsmittelphase gewinnt.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel in einer derartigen Menge verwendet wird, daß das Peptidderivat im wesentlichen im festen Zustand verbleiben kann.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Rest



in den Formeln I und III in L,L-Konfiguration vorliegt.

4. Verfahren nach Punkt 3, 2 oder 1, gekennzeichnet dadurch, daß Y und Z beide das Ammoniumderivat der Formel

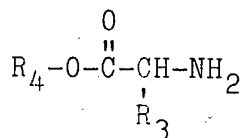


sind, worin R_3 eine Seitenkettengruppe einer Aminosäure ist und R_4 eine Niedrigalkylgruppe ist.

5. Verfahren nach Punkt 4 oder einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel ein Keton, das zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist, ein aliphatischer oder aromatischer Kohlenwasserstoff oder ein Äther ist.
6. Verfahren nach Punkt 5 oder einem der Punkte 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel in einer Menge von weniger als 10 Gew.-Teilen und nicht weniger als 1 Gew.-Teil, bezogen auf das Dipeptidesterderivat, verwendet wird.
7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_4 Methylgruppen sind, R_2 und R_3 Benzylgruppen sind, $n \geq 1$ ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe ist und Y und Z in der L-, L- und D-, oder D-Konfiguration vorliegen.
8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 7 oder 8, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel Toluol, Methylisobutylketon oder Isopropyläther ist.

9. Verfahren nach Punkt 6 oder einem der übrigen vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß das wäßrige Gemisch darüber hinaus eine Protease enthält und daß darüber hinaus die Protease aus der wäßrigen Phase nach der Phasentrennung gewonnen wird.
10. Verfahren nach Punkt 9, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_4 Methylgruppen sind, R_2 und R_3 Benzylgruppen sind, $n \neq 1$ ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe ist und Y und Z in der L-, L- und D-, oder D-Konfiguration vorliegen.
11. Verfahren nach Punkt 9 oder 10, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel Toluol, Methylisobutylketon oder Isopropyläther ist.
12. Verfahren nach Punkt 4 oder einem der übrigen vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß nach der Phasentrennung die wäßrige Phase einer Ultrafiltration unterzogen wird, um eine konzentrierte Proteaselösung zu erzielen und diese zu gewinnen.
13. Verfahren nach Punkt 3 oder einem der übrigen vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß Y das Ammoniumderivat der Formel II ist und Z ein Wasserstoffion ist, bei dem darüber hinaus zum Zeitpunkt des Vermischens des organischen Lösungsmittels mit dem wäßrigen Gemisch eine Brönsted-Säure zu dem wäßrigen Gemisch zusammen mit dem organischen Lösungsmittel gefügt wird.
14. Verfahren nach Punkt 13, gekennzeichnet dadurch, daß das organische Lösungsmittel ein Keton, das zur Bildung eines binären Phasensystems mit Wasser geeignet ist, ein aliphatisch aromatischer Kohlenwasserstoff oder ein Äther 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 Dipeptidesterderivats, verwendet wird.
15. Verfahren nach Punkt 20 oder 21, gekennzeichnet dadurch, daß die Brönsted-Säure in einer Menge im Bereich von etwa 1 bis etwa 10 Äquivalenten, basierend auf der Molarität des Dipeptidesterderivats verwendet wird.

16. Verfahren nach Punkt 20, 21 oder 22, gekennzeichnet dadurch, daß Wasser in dem wäßrigen Gemisch in einer Menge von etwa 1 bis etwa 10 Gew.-Teilen, basierend auf der Menge des Di-peptidesterderivats verwendet wird.
17. Verfahren nach Punkt 20, 21, 22 oder 23, gekennzeichnet dadurch, daß als Brönsted-Säure Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure verwendet wird.
18. Verfahren nach Punkt 20, 21, 22, 23 oder 24, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_4 Methylgruppen sind, R_2 und R_3 Benzylgruppen sind, $n = 1$ ist, X eine Benzyloxycarbonylgruppe ist und Z das Ammoniumderivat der Formel IV ist, das in der L-, L- und D-, oder D-Konfiguration vorliegt.
19. Verfahren nach einem der Punkte 20 bis 24 oder 25, gekennzeichnet dadurch, daß nach der Phasentrennung aus der wäßrigen Phase ein Amminosäureester mit der Formel



gewonnen wird, worin R_4 eine Methylgruppe und R_3 eine Benzylgruppe sind.

20. Verfahren nach Punkt 9 und 12 oder einem der übrigen vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß die Protease eine Metalloprotease ist.