

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 571 365

②① N° d'enregistrement national :

84 15280

⑤① Int Cl* : C 07 C 101/22, 103/34; C 07 K 1/06.

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 5 octobre 1984.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 15 du 11 avril 1986.

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦① Demandeur(s) : ISOICHEM SA. — FR.

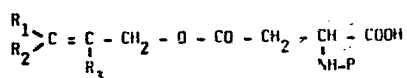
⑦② Inventeur(s) : Didier Wirth, Dominique Gibert et Annie
Boutin.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Office Picard.

⑤④ Nouveaux dérivés de l'acide aspartique utilisables dans la synthèse d'aspartyl peptides.

⑤⑦ L'invention concerne de nouveaux dérivés de l'acide as-
partique représentés par la formule générale I :



dans laquelle R₁, R₂ et R₃, identiques ou différents représen-
tent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, un radical
alcoyle ramifié ou non de 1 à 6 atomes de carbone ou encore
un radical phényle, et P désigne un atome d'hydrogène ou un
groupe protecteur de la fonction amine, ainsi que leurs sels.

Application à la préparation d'aspartyl peptides par conden-
sation avec un amino acide, un amino ester, un amino peptide
ou un peptide, suivie le cas échéant d'une déprotection.

FR 2 571 365 - A1

D

La présente invention se rapporte à de nouveaux dérivés de l'acide aspartique utilisables dans la synthèse industrielle d'aspartyl peptides, tels que certaines hormones ou des édulcorants.

5 Possédant deux fonctions acides différentes, l'acide aspartique peut donner naissance à deux séries, respectivement appelées α et β , d'aspartyl peptides isomères, et l'on est conduit à bloquer au préalable l'une des fonctions acides si l'on désire obtenir un seul de ces isomères à un degré de pureté et dans des conditions de rentabilité satisfaisants.

10

Un mode de blocage classique de l'une des fonctions acides consiste à préparer un mono-ester de l'acide aspartique. Ainsi sont connus et classiquement utilisés les β -aspartates de méthyle, tertiobutyle et benzyle : le premier n'est évidemment pas approprié à la synthèse d'aspartyl peptides esters comme l'aspartame, édulcorant bien connu, puisque la saponification ménagée sélective du diester intermédiaire reste hypothétique; le second présente un grand intérêt du fait du clivage possible de la fonction ester tertiobutylique en présence d'une autre fonction ester, par exemple méthylique, mais sa préparation, d'ailleurs laborieuse, fait
15 appel à l'isobutène, gaz inflammable et polymérisable, donc d'emploi industriel dangereux; quant au troisième, plus facile à obtenir, il présente l'inconvénient d'exiger pour la déprotection finale des peptides auxquels il conduit, l'emploi d'hydrogène très inflammable avec une catalyse hétérogène dans des conditions de milieu telles que l'on observe des
20 pertes en catalyseur par solubilisation du métal noble constitutif.

25

La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de l'acide aspartique utilisables pour la synthèse d'aspartyl peptides.

30

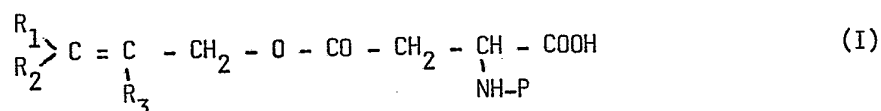
L'invention a également pour objet un nouveau procédé de préparation d'aspartyl peptides utilisant de nouveaux dérivés de l'acide aspartique efficacement protégés au niveau de l'une des fonctions acides, permettant une déprotection finale sélective réalisable dans des conditions satisfaisantes de sécurité et de rentabilité.

35

Les travaux de recherche effectués par la demanderesse ont permis de constater que les nouveaux dérivés de l'acide aspartique décrits ci-après

procurent les résultats recherchés dans d'excellentes conditions, de manière inattendue.

Les nouveaux dérivés de l'acide aspartique conformes à l'invention peuvent être représentés par la formule générale (I) suivante :

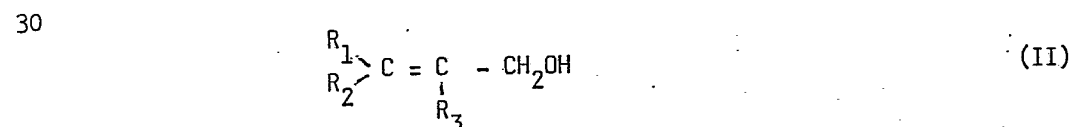


dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, un radical alcoyle ramifié ou non comportant de 1 à 6 atomes de carbone, ou encore un radical phényle; P désigne un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur de la fonction amine utilisable en synthèse peptidique.

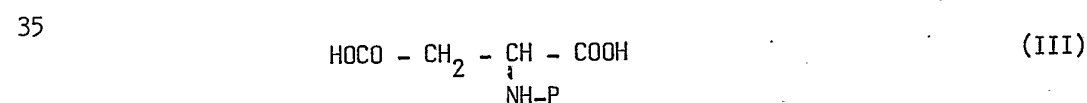
Ces corps sont amphotères, lorsque P est un atome d'hydrogène, ou acides, et donc capables d'exister aussi sous forme de sels. La présente invention s'étend aux dérivés de formule (I) indifféremment sous forme libre ou salifiée.

Lorsque P est un groupe protecteur de la fonction amine, ce groupe est de préférence un groupe formyle, tertibutoxycarbonyle, benzyloxycarbonyle, ou un groupe ènamine dérivé de l'acétyl acétone, de l'acétyl acétate de méthyle ou d'éthyle.

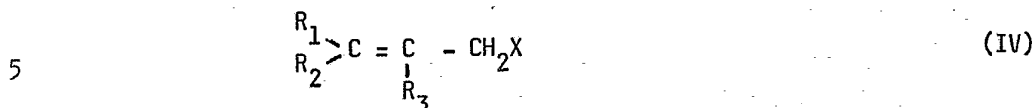
Les dérivés de formule générale (I) peuvent être préparés de plusieurs façons simples et usuelles, par exemple par estérification, à l'aide d'un alcool de formule (II) :



d'un acide de formule (III) :

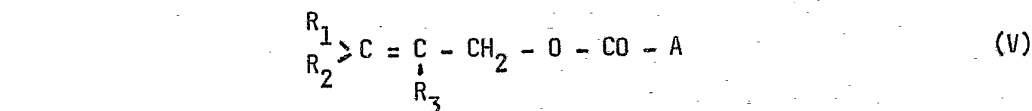


ou par O-alcoylation d'un acide de formule (III) par un agent de formule (IV) :



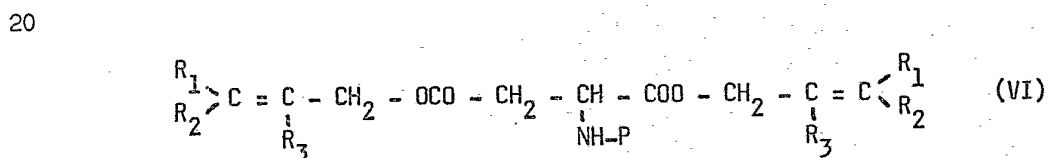
dans laquelle X représente un atome d'halogène ou un groupe alkyl-sulfonyle ou aryl-sulfonyle,

ou par transestérification partielle à l'aide d'un ester de formule (V) :



dans laquelle A désigne un groupe alcoyle ramifié ou non de 1 à 17 atomes de carbone, un radical phényle ou un atome d'hydrogène,

ou encore par hydrolyse ménagée des diesters de formule (VI) :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et P ont les significations indiquées ci-dessous.

Les réactifs mis en oeuvre sont souvent des produits industriels courants, par exemple les alcools allylique, méthallylique, crotylique, cinnamique et l'éthyl-2-héxène-2-ol-1, les chlorures ou bromures d'allyle, méthallyle, prényle ou cinnamyle, le dichloro-1,3-propène, le dichloro-2,3-propène ou le dichloro-1,3-butène-2, les acétate, propionate, hexanoate ou octanoate d'allyle.

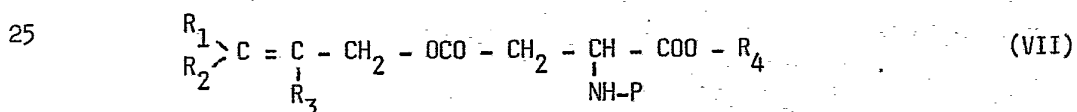
L'interconversion de dérivés de formule (I) est également possible. Ainsi l'on peut passer d'un β -aspartate libre à son dérivé N-acylé, par exemple

formylé, acétylé, chloro-2-acétylé ou benzoylé, ou à son dérivé N-alcoxy-carbonylé, par exemple tertibutoxycarbonylé ou benzyloxycarbonylé, ou à l'énamine d'un composé dicarbonylé (β -dicétone, β -cétoester ou β -cétoamide) ou encore à tout autre dérivé N-protégé selon une méthode connue et décrite par exemple par E. WUNSCH dans Houben-Weyl "Methoden der organischen Chemie" 15/1 (1974) p. 46; de même, on peut N-déprotéger un dérivé de formule (I) protégé pour obtenir le β -aspartate libre correspondant par des méthodes appropriées telle l'hydrolyse acide des énamines ou des composés N-tertibutoxy-carbonylés.

Les dérivés de l'acide aspartique de formule (I) selon l'invention permettent d'obtenir facilement des α -aspartyl peptides β -bloqués par condensation avec des amino acides, des amino esters, des amino amides ou des peptides.

Cette condensation peut être effectuée en une seule étape opératoire avec des méthodes de couplage connues telles les méthodes au dicyclohexyl-carbodiimide, au carbonyl-diimidazole ou aux anhydrides mixtes, comme décrit par P. STELZEL, Houben-Weyl "Methoden der organischen Chemie" 15/2 (1974) p. 169-259.

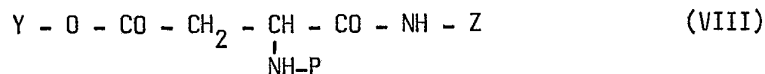
On peut également procéder en deux étapes, dont la première consiste en la préparation d'un nouvel intermédiaire activé isolable comme un α -ester de formule générale (VII) :



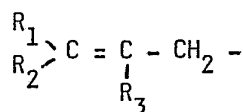
dans laquelle R_4 désigne un radical tel que cyanométhyle, nitro-2 (ou-4) phényle, trichloro-2,4,6 (ou-2,4,5) phényle, phénylazo-4-phényle ou N-succinimido.

On observera que l'acide aspartique existe sous les formes D et L et par conséquent les corps (I), (III) et (VII) aussi; l'invention englobe bien entendu les nouveaux intermédiaires sous les deux formes, pures ou en mélange.

On obtient ainsi facilement les α -aspartyl peptides de formule générale (VIII) :



dans laquelle Y représente un reste de formule :



R_1 , R_2 , R_3 et P ont la même signification que dans la formule I, et Z représente un reste d'acide aminé, d'acide ester, d'acide amide ou de peptide.

Enfin, les α -aspartyl peptides β -bloqués de formule indiquée ci-dessus, obtenus selon l'invention sont aisément convertis en α -aspartyl peptides β -libres représentés par la même formule ou Y est un atome d'hydrogène par simple protolyse en présence d'un catalyseur à base de métal de transition; cette possibilité est l'un des avantages majeurs procurés par les dérivés de formule (I) et leur mise en oeuvre lors de synthèses peptidiques.

Cette β -déprotection peut être effectuée par exemple en milieu protique, aqueux ou non, et entre -30°C et $+100^\circ\text{C}$ environ mais de préférence à température ambiante; dans certains cas l'utilisation d'un solvant non miscible à l'eau peut se révéler favorable. La catalyse peut être hétérogène ou homogène : conviennent ainsi les catalyseurs formés par les métaux de transition en poudre pure ou supportés (par du carbone, de l'alumine ou de la silice par exemple) comme le palladium ou le ruthénium utilisés classiquement pour les hydrogénations, mais aussi des sels ou des complexes solubles de ces métaux comme le complexe de Wilkinson ou les catalyseurs de réduction asymétrique homogène.

Cette possibilité de séparer aisément le groupe protecteur allylique de

la fonction acide en β du reste aspartique est avantageuse et inattendue en raison de l'existence des autres groupes protecteurs qui ne sont pas modifiés.

- 5 Cette nouvelle synthèse d' α -aspartyl peptides β -libres à partir des dérivés de formule (I) utilisés comme intermédiaires de synthèse, conformément à la présente invention, est particulièrement avantageuse car sa mise en pratique apparaîtra simple à l'homme de l'art; les quelques exemples suivants l'illustreront davantage sans pour autant en limiter la portée.

EXEMPLE 1

β -L-aspartate d'allyle

- 15 On chauffe pendant 6 heures à 60°C un mélange de 133 g d'acide L-aspartique, 56 ml d'acide sulfurique à 96% et 400ml d'alcool allylique puis on ajoute lentement environ 500ml de soude aqueuse à 12% et on concentre sous vide jusqu'à obtention d'une pâte épaisse. On ajoute alors 1 litre de butanol et de l'eau jusqu'à solubilisation totale; on décante et extrait la phase aqueuse avec 500ml de butanol.

- 20 Les phases butanoliques réunies sont concentrées sous vide; onessore et rince avec 300ml de butanol froid les cristaux : on obtient après séchage 61g de produit brut soit un rendement de 35%.

- 25 Un traitement par l'éthanol aqueux permet d'obtenir le β -L-aspartate d'allyle pur.

pF = 192°C

Rf = 0,45 (méthyléthyl cétone : 45; eau : 15; acide acétique : 15)

- 30 L'acide L-aspartique et l'alcool allylique n'ayant pas réagi sont récupérés et recyclés.

EXEMPLE 2

β -L-aspartate de crotyle

- 35 Opposé dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1 à l'acide L-aspar-

tique, l'alcool crotylique (butène-2-ol-1) conduit avec un rendement de 25% au β -L-aspartate de crotyle pur.

Rf = 0,56 (méthyléthyl cétone : 45; eau : 15; acide acétique : 15)

5

EXEMPLE 3

N-(carbométhoxy-2 méthyl-1 vinyl) β -L-aspartate d'allyle

On agite pendant 4 jours à température ambiante un mélange de 34,6g de β -L-aspartate d'allyle, 35g d'acétylacétate de méthyle, 25g de diisopropylamine et 175ml d'heptane. On filtre, rince à l'heptane et sèche pour obtenir 53g du produit attendu sous forme de sel de diisopropylamine, soit un rendement de 71%.

10

pF = 83°C

15

EXEMPLE 4

L-(β -allyl aspartyl) L-phénylalaninate de méthyle

A une suspension de 29g de chlorhydrate de L-phénylalaninate de méthyle et 50g du composé précédemment obtenu dans 250ml de chloroforme on ajoute successivement vers -20°C 25ml d'oxychlorure de phosphore et 36ml de triéthylamine; après deux heures d'agitation entre -20°C et 0°C, on hydrolyse avec 200ml d'eau, décante puis concentre sous vide la phase chloroformique. L'huile résiduelle est traitée par l'acide oxalique dans l'isopropanol, on obtient ainsi 27,9g de L-(β -allyl aspartyl) L-phénylalaninate de méthyle sous forme d'oxalate (1:1).

20

25

pF = 152°C

Rf = 0,6 (Toluène : 90; méthanol : 10; diéthylamine : 10)

30

EXEMPLE 5

L- α -aspartyl L-phénylalaninate de méthyle

On procède comme dans l'exemple précédent, et le résidu huileux obtenu est mis en solution dans 500ml de méthanol à 10% d'eau puis agité pendant 12 heures vers 30°C en présence de 3g de charbon palladié à 10%. Un contrôle chromatographique montre que le β -allyl peptide a disparu; après élimination du catalyseur, on ajuste le pH à 5,3 et isole après séchage

35

27g de L- α -aspartyl L-phénylalaninate de méthyle soit un rendement de 70%. Le produit est identique à un échantillon d'aspartame commercial.

EXEMPLE 6

5 N-benzyloxycarbonyl L- β -aspartate d'allyle

A un mélange vigoureusement agité de 800ml d'eau, 138g de carbonate de potassium et 86,5g de L- β -aspartate d'allyle, on ajoute lentement 80ml de chloroformate de benzyle. Après 2 heures on extrait le produit recherché avec 500ml de chloroforme du milieu réactionnel acidifié au préalable à
10 pH=1 à l'aide d'HCl concentré. On élimine le chloroforme par distillation à sec puis dissout le résidu dans 1 litre d'isopropanol et ajoute 90g de dicyclohexylamine. On filtre, rince à l'isopropanol et sèche pour finalement obtenir 105g de sel de dicyclohexylamine du N-benzyloxycarbonyl L- β -aspartate d'allyle.

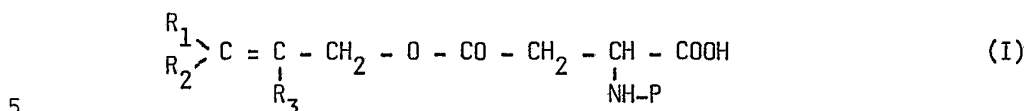
15

pF = 114°C

Par condensation avec le L-phényl-alaninate de méthyle ce corps conduit après addition de ruthénium à 5% sur carbone, puis hydrogénation, à
20 l'aspartame avec un rendement satisfaisant.

REVENDICATIONS

1. Dérivés de l'acide aspartique de formule générale (I) :

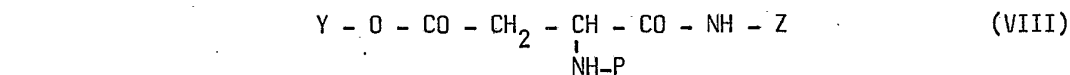


dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, un radical alcoyle ramifié ou non de 1 à 6 atomes de carbone ou encore un radical phényle, et P désigne un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur de la fonction amine, ainsi que leurs sels.

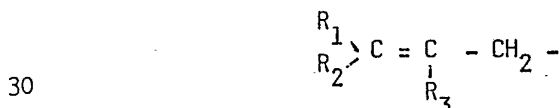
2. Dérivés de l'acide aspartique suivant la revendication 1, caractérisés en ce que P représente un atome d'hydrogène ou un groupe formyle, tertibutoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, ou un groupe ènamine dérivé de l'acétyl acétone, de l'acétyl acétate de méthyle ou d'éthyle.

3. Dérivés de l'acide aspartique suivant l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisés en ce que R_1 , R_2 et R_3 représentent un atome d'hydrogène.

4. Procédé de préparation d' α -aspartyl peptides de formule générale :



dans laquelle Y représente un atome d'hydrogène ou un reste de formule :



R_1 , R_2 , R_3 et P ont la signification indiquée dans la revendication 1, et Z représente un reste d'acide aminé, d'amino ester, d'amino amide ou de peptide, caractérisé en ce qu'on effectue une condensation d'un dérivé de

formule (I) selon la revendication 1 avec un amino acide, un amino ester, un amino amide ou un peptide, suivie le cas échéant d'une déprotection de la fonction en β du reste aspartique.

- 5 5. Procédé de préparation d' α -aspartyl peptides suivant la revendication 4, caractérisé en ce que la déprotection de la fonction en β du reste aspartique est effectuée par protolyse en présence d'un catalyseur à base de métal de transition.
- 10 6. Procédé de préparation d' α -aspartyl peptides suivant la revendication 5, caractérisé en ce que la déprotection est effectuée en milieu protique à une température comprise entre -30°C et $+100^{\circ}\text{C}$.
- 15 7. Procédé de préparation d' α -aspartyl peptides suivant l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que le métal de transition est le palladium ou le ruthénium.