



Nederland

⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8701035**

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor de bereiding van aspartylfenylalaninemethylester uit N-formylaspartylfenylalaninemethylester.**
- ⑤1 Int.Cl.: C07K 5/06, C07K 3/08, A23L 1/236.
- ⑦1 Aanvrager: Stamicarbon B.V. te Geleen.
- ⑦4 Gem.: Drs. W.C.R. Hoogstraten c.s.
Octrooibureau DSM
Postbus 9
6160 MA Geleen.

②1 Aanvraag Nr. 8701035.

②2 Ingediend 1 mei 1987.

③2 --

③3 --

③1 --

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 1 december 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

STAMICARBON B.V.

Uitvinders: Wilhelmus H.J. Boesten te Sittard
Bernardus H.N. Dassen te Heerlen

-1- (10)

PN 5682

WERKWIJZE VOOR DE BEREIDING VAN ASPARTYLFENYLALANINEMETHYLESTER
UIT N-FORMYLASPARTYLFENYLALANINEMETHYLESTER

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van aspartylfenylalaninemethylester uit N-formylaspartylfenylalaninemethylester door behandeling met een zuur. De werkwijze is in het bijzonder geschikt voor de bereiding van α -L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester. Deze stof, die ook wel aspartaam wordt genoemd, is een laagcalorische intense zoetstof met uitstekende zoeteigenschappen. Aspartaam wordt als zoetstof toegepast in voedingsmiddelen en dranken, zoals beschreven in het Amerikaanse octrooi-schrift US 3.492.131.

Aspartaam is een dipeptide, waarbij beide aminozuren in de L-vorm voorkomen en de aminogroep in het aspartyldeel op de α -positie ten opzichte van de peptideband zit. Overeenkomstige verbindingen waarbij een of beide aminozuren in de D-vorm voorkomen, of waarin de aminogroep op de β -positie zit hebben geen zoetkracht en hebben derhalve economisch geen belang. Daarom is het belangrijk de koppeling van asparaginezuur en fenylalanine(methylester) zo uit te voeren dat een maximale opbrengst van α -L-aspartyl-L-fenylalanine (methylester) ontstaat. Zoals bekend wordt bij de peptidesynthese gebruik gemaakt van beschermgroepen voor functionele groepen die niet aan de vorming van de peptidebinding deelnemen. De formylgroep is geschikt als N-beschermende groep, en wordt als zodanig gebruikt bij de synthese van aspartaam (zie bijv. GB-A-8314907).

Verwijdering van de N-beschermende formylgroep uit de gevormde N-formylaspartylfenylalaninemethylester is een essentiële stap in het aspartaamproductieproces die mede het rendement van het proces bepaalt. Deze formylafsplitsing wordt algemeen als een moeilijke stap beschouwd omdat gelijktijdig met de afsplitsing van de

8701035

N-formylgroep ook splitsing van de peptidebinding en/of estergroep en ongewenste nevenreacties zoals vorming van het diketopiperazine of verestering van de vrije carboxylgroep kunnen optreden. Het is derhalve gewenst om bij uitvoering op technische schaal dergelijke
5 nevenreacties tot een minimum te beperken.

Uit de literatuur (Houben Weyl 15-I, p. 167-9) zijn diverse deformyleringsreacties bekend. Bij toepassing op dipeptidederivaten zoals N-formylaspartylfenylalaninemethylester zijn de vorengenoemde nevenreacties niet te vermijden. In GB-A-8314907 wordt een werkwijze
10 beschreven voor de deformylering van α,β -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester, waarbij de uitgangsverbinding in een organisch oplosmiddel en in tegenwoordigheid van azijnzuur wordt behandeld met fosforzuur en een lagere alkylalkohol. Het is aanvraagster bij
15 octrooischrift opgegeven resultaten bij lange na niet konden worden behaald. Uit JP-A-1197593 blijkt dat behandeling van α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalanine met anorganische zuren, zoals zoutzuur en zwavelzuur, of met organische zuren, zoals methaansulfonzuur of p-tolueensulfonzuur, in aanwezigheid van methanol een hoge opbrengst aan
20 α -L-aspartyl-L-fenylalaninedimethylester geeft.

Doel van de uitvinding is het vinden van een economisch aantrekkelijke werkwijze voor de deformylering van N-formylaspartylfenylalaninemethylester onder omstandigheden waarbij vrijwel geen reacties aan de andere functionele groepen in de verbinding optreden
25 en waarbij de vorming van het diketopiperazine tot een minimum is beperkt.

Verrassenderwijze is gevonden dat behandeling van de uitgangsverbinding met oxaalzuur in een bepaalde geschikte oplosmiddelcombinatie een nieuwe en zeer eenvoudige werkwijze levert, waar-
30 bij nauwelijks ongewenste nevenreacties optreden.

De werkwijze volgens de uitvinding voor de bereiding van aspartylfenylalaninemethylester uit N-formylaspartylfenylalaninemethylester door behandeling met een zuur wordt derhalve gekenmerkt doordat N-formylaspartylalaninemethylester bij 30-60°C wordt behandeld
35 met ten minste 0,5 molequivalent oxaalzuur per mol N-formylaspartyl-

8701035

fenylalaninemethylester in een oplosmiddelcombinatie waarin N-formyl-aspartylfenylalaninemethylester goed oplosbaar is en het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester slecht oplosbaar is, waarna het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester afgefiltreerd
5 wordt, opgelost wordt in water en vervolgens geneutraliseerd wordt met behulp van een anorganische base onder vorming van vrij aspartylfenylalaninemethylester.

Meer in het bijzonder verschaft de uitvinding een werkwijze die geschikt is bij de bereiding van aspartaam via N-formyl-L-
10 α -aspartyl-L-fenylalaninemethylester of een mengsel van de α - en β -isomeren van die verbinding. De werkwijze volgens de uitvinding is des te verrassender aangezien met andere organische zuren van vergelijkbare zuursterkte veel slechtere resultaten worden bereikt.

De milde acidolyse van de werkwijze volgens de uitvinding
15 voorkomt het splitsen van de peptidebinding en voorkomt de verzeping van de estergroep en/of verestering van de vrije carboxylgroep. Aangezien het gedeformyleerde produkt meteen na vorming met oxaalzuur neerslaat wordt bovendien voorkomen dat het ongewenste diketopiperazine in aanzienlijke hoeveelheid wordt gevormd. Analytisch blijkt dat
20 het neerslag van aspartylfenylalaninemethylester met oxaalzuur bestaat uit aspartylfenylalaninemethylester en oxaalzuur in een molverhouding van 2 : 1.

Als oplosmiddelcombinatie is een mengsel van methylisobutylketon en methanol in een volumeverhouding van 3 : 1 tot 11 : 1 zeer
25 geschikt. Bij voorkeur worden methylisobutylketon en methanol in een volumeverhouding 6,5 à 7 : 1 gemengd. Bij een lagere verhouding dan 3 : 1 blijft teveel van het gevormde oxalaat in oplossing.

De concentratie van het te deformyleren uitgangsprодукt in de oplosmiddelcombinatie bedraagt 0,1 tot 0,5 mol per liter, bij voorkeur
30 0,3 tot 0,35 mol per liter.

Het oxaalzuur wordt gebruikt in een hoeveelheid van ten minste 0,5 molequivalent per mol N-formylaspartylfenylalaninemethylester. De hoeveelheid oxaalzuur behoeft niet meer dan 2,2 molequivalent ten opzichte van de uitgangsverbinding te bedragen. Bij voorkeur
35 wordt een hoeveelheid van 1,0 tot 1,5 molequivalent oxaalzuur per mol

8701035

N-formylaspartylfenylalaninemethylester toegepast.

De deformyleringsreactie wordt onder roeren uitgevoerd bij een temperatuur van 30-60°C, bij voorkeur bij 40-50°C. Voor een volledige omzetting van het uitgangsmateriaal is een reaktieduur van 50-100
5 uur nodig.

De uitvinding wordt toegelicht door de volgende voorbeelden.

Voorbeeld I

Aan een suspensie van 32,2 gram (= 0,1 mol) α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester in 258 ml methylisobutylketon en
10 37,5 ml methanol werd bij kamertemperatuur 13,86 gram (= 0,11 mol) oxaalzuur . 2 H₂O toegevoegd. Dit reaktiemengsel werd vervolgens onder roeren 66 uur op 50°C gehouden en daarna afgekoeld tot 25°C. Daarbij kristalliseerde vaste stof uit, die achtereenvolgens werd afge-
15 filtreerd, gewassen met resp. 100 ml methylisobutylketon en 100 ml aceton en daarna gedroogd. De opbrengst bedroeg 26,7 gram. Uit HPLC analyse bleek dat het produkt voor 90,1 % bestaat uit het oxaalzure
20 zout van α -aspartaam en voor 9,7 % uit diketopiperazine. Dit komt overeen met een opbrengst van resp. 0,071 mol aspartaam (als oxaalzure zout) en 0,01 mol diketopiperazine op basis van ingezet N-formylaspartaam.

Voorbeeld II

De werkwijze van voorbeeld werd herhaald met dien verstande dat aan 0,1 mol α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester in 258 ml methylisobutylketon in 37,5 ml methanol 0,11 mol oxaalzuur . 2 H₂O
25 werd toegevoegd. Het reaktiemengsel werd onder roeren 66 uur op 40°C gehouden en vervolgens afgekoeld en opgewerkt. De opbrengst bedroeg 20,4 gram, bestaande uit 93,1 % oxalaat van α -aspartaam en 2,5 % diketopiperazine. Dit komt overeen met een opbrengst van resp. 0,056 mol
30 aspartaam (als oxaalzure zout) en 0,002 mol diketopiperazine op basis van ingezet N-formylaspartaam.

8701035

Voorbeeld III + IV

Op gelijke wijze als in voorbeeld I en II werden experimenten uitgevoerd. De reaktietijd bedroeg wederom telkens 66 uur, doch nu bij resp. 45°C (voorbeeld III) en 55°C (voorbeeld IV).

5	opbrengst		bestaande uit (in %)		opbrengst in mol	
	in gram	oxalaat	diketopiperazine	aspartaam ^{x)}	diketopiperazine	
Vb. III	23,7	93,0	3,3	0,065	0,003	
Vb. IV	25,4	85,4	11,2	0,064	0,011	

x) als oxaalzure zout

10 Voorbeeld V

Aan een suspensie van 68 gram (= 0,21 mol)

α, β -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester (verhouding $\alpha : \beta =$

66 : 34) in 516 ml methylisobutylketon en 75 ml methanol werd bij

kamertemperatuur 30 gram oxaalzuur . 2 H₂O toegevoegd. Het mengsel

15 werd vervolgens 90 uur op 40°C verwarmd. Daarna werd het mengsel afge-

koeld, het neerslag afgefiltreerd en achtereenvolgens met 150 ml

methylisobutylketon en 100 ml aceton nagewassen en gedroogd. De

opbrengst bedroeg 42,2 gram.

Deze hoeveelheid werd opgenomen in 300 ml water en vervolgens met

20 behulp van geconcentreerde ammonia van pH = 2,1 op pH = 5,2 gebracht.

Het mengsel werd daarna 3 uur bij kamertemperatuur geroerd, waarna het

neerslag werd afgefiltreerd, gewassen met in totaal 300 ml water en

gedroogd. Het verkregen produkt woog 22 gram en bevatte volgens ana-

lyse

25 72 % α -aspartaam

27,5 % β -aspartaam

< 0,2 % diketopiperazine

< 0,1 % α, β -L-aspartyl-L-fenylalanine

< 0,1 % α, β -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester

30 295 ppm oxaalzuur.

8701035

Vergelijkingsvoorbeeld 1a

(volgens voorbeeld III van GB-A-8314907)

Aan een oplossing van 32,2 gram α,β -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester (verhouding $\alpha : \beta = 66 : 34$) in 123 ml ethylacetaat, 13 ml azijnzuur en 128 ml methanol werd 22,7 ml 85 % waterig fosforzuur toegevoegd bij kamertemperatuur. Het mengsel werd vervolgens 8 uur op 40°C verwarmd en daarna afgekoeld. Het uitgekristalliseerde produkt bleek moeilijk filtreerbaar. Daarom werd het verkregen neerslag volledig opgelost in water (totale gewicht 213,6 gram).

Uit analyse van de verkregen oplossing bleek dat 0,014 mol α -aspartaam als fosfaat in het "neerslag" terechtkomt. Daarnaast bleek het "neerslag" ook β -aspartaam (0,002 mol) te bevatten, alsmede 0,001 mol diketopiperazine.

Het filtraat bevatte volgens analyse 0,01 mol α -aspartaam (als fosfaat), 0,005 mol β -aspartaam (als fosfaat) en 0,002 mol diketopiperazine, alsmede niet-gedeformyleerd produkt. Geconcludeerd kan worden dat de deformyleringsreactie bij 8 uur lang niet volledig is.

Vergelijkingsvoorbeeld 1b

Aan een oplossing van 32,2 gram α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester in 123 ml ethylacetaat, 13 ml azijnzuur en 128 ml methanol werd 22,7 ml 85 % waterig fosforzuur toegevoegd bij kamertemperatuur. Het mengsel werd vervolgens 24 uur op 40°C gehouden en vervolgens afgekoeld tot kamertemperatuur. Nu werd wel goed filtreerbaar neerslag verkregen, totaal 19,9 gram. Uit analyse bleek dit neerslag voor 85,3 % te bestaan uit het fosforzure zout van α -aspartaam, 0,5 % diketopiperazine, 0,8 % L- α -aspartyl-L-fenylalanine en 0,9 % α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester. Dit komt overeen met een opbrengst van 43,3 % α -aspartaam (als fosforzure zout).

Vergelijkingsvoorbeeld 2a

Aan een suspensie van 32,2 gram α -N-formyl-L-aspartyl-L-

- fenylalaninemethylester in 258 ml methylisobutylketon en 37,5 ml methanol werd bij kamertemperatuur 19,75 gram benzeensulfonzuur (0,125 mol) toegevoegd. Dit reaktiemengsel werd vervolgens onder roeren 66 uur op 50°C gehouden en daarna afgekoeld tot 25°C. Er ontstond geen
- 5 neerslag.
- Evenmin kon een neerslag worden verkregen wanneer 12,0 gram maleïnezuur (0,11 mol) i.p.v. benzeensulfonzuur werd gebruikt en het reaktiemengsel 40 uur bij 45°C werd geroerd en vervolgens werd afgekoeld tot 25°C.

10 Vergelijkingsvoorbeeld 2b

- Aan een suspensie van 32,2 gram α -N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester in 258 ml methylisobutylketon en 37,5 ml methanol werd bij kamertemperatuur 29,4 ml dichloorazijnzuur (0,33 mol) en 5 ml water toegevoegd. Dit reaktiemengsel werd vervolgens
- 15 onder roeren 46 uur op 50°C gehouden en daarna afgekoeld tot 25°C. De daarbij uitgekristalliseerde vaste stof werd vervolgens 4x met 25 ml methylisobutylketon gewassen en gedroogd. De opbrengst bedroeg 26,0 gram. Volgens de verrichte analyses bleek dit produkt voor 95 % uit diketopiperazine te bestaan.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor de bereiding van aspartylfenylalaninemethylester uit N-formylaspartylalaninemethylester door behandeling met een zuur, met het kenmerk, dat N-formylaspartylalaninemethylester bij 30-60°C wordt behandeld met ten minste 0,5 molequivalent oxaalzuur per mol N-formylaspartylfenylalaninemethylester in een oplosmiddelcombinatie waarin N-formylaspartylfenylalaninemethylester goed oplosbaar is en het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester slecht oplosbaar is, waarna het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester afgefiltreerd wordt, opgelost wordt in water en vervolgens geneutraliseerd wordt met behulp van een anorganische base onder vorming van vrij aspartylfenylalaninemethylester.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij als N-formylaspartylalaninemethylester N-formyl-L- α -aspartyl-L-fenylalaninemethylester of een mengsel van de α - en β -isomeren van N-formyl-L-aspartyl-L-fenylalaninemethylester wordt toegepast en de N-gedeformyleerde verbinding aspartaam of een mengsel van α - en β -aspartaam is.
3. Werkwijze volgens een der conclusies 1 of 2, met het kenmerk, dat de behandeling met oxaalzuur geschiedt met 1,0-2,2 molequivalent oxaalzuur per mol N-formylaspartylfenylalaninemethylester.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat de behandeling met oxaalzuur geschiedt met 1,0-1,5 molequivalent oxaalzuur per mol N-formylaspartylfenylalaninemethylester.
5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4, met het kenmerk, dat als oplosmiddelcombinatie voor de behandeling met oxaalzuur een combinatie van methylisobutylketon en methanol wordt gebruikt in een volumeverhouding van 3 : 1 tot 11 : 1 en waarbij de hoeveelheid N-geformyleerde uitgangsverbinding 0,1 tot 0,5 mol per liter bedraagt.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de volumeverhouding methylisobutylketon ten opzichte van methanol 6,5 à 7 : 1 bedraagt en de hoeveelheid N-geformyleerde uitgangsverbinding 0,3 tot 0,35 mol per liter bedraagt.

8701035

7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6, met het kenmerk, dat de
behandeling met oxaalzuur geschiedt bij een temperatuur van
30-60°C, gedurende 24 tot 72 uur.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de behandeling
5 met oxaalzuur geschiedt bij een temperatuur van 40-50°C, gedurende
24 tot 72 uur.
9. Oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester.

8701035

S A M E N V A T T I N G

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van aspartylfenylalaninemethylester uit N-formylaspartylalaninemethylester door behandeling met een zuur, gekenmerkt doordat N-formylaspartylalaninemethylester bij 30-60°C wordt behandeld met ten

5 minste 0,5 molequivalent oxaalzuur per mol N-formylaspartylfenylalaninemethylester in een oplosmiddelcombinatie waarin N-formylaspartylfenylalaninemethylester goed oplosbaar is en het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester slecht oplosbaar is, waarna

10 het oxaalzure zout van aspartylfenylalaninemethylester afgefiltreerd wordt, opgelost wordt in water en vervolgens geneutraliseerd wordt met behulp van een anorganische base onder vorming van vrij aspartylfenylalaninemethylester.

8701035