



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 651 067 A5

⑤ Int. Cl. 4: C 12 P 21/02  
C 07 K 5/06

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// A 23 L 1/236

⑫ PATENTSCHRIFT A5

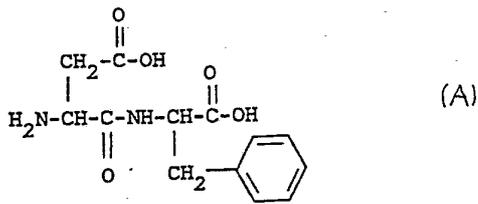
<p>⑳ Gesuchsnummer: 5647/81</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 02.09.1981</p> <p>③① Priorität(en): 02.09.1980 US 183556</p> <p>㉔ Patent erteilt: 30.08.1985</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 30.08.1985</p>	<p>⑦③ Inhaber: G. D. Searle &amp; Co., Skokie/IL (US)</p> <p>⑦② Erfinder: Davino, A. Arthur, Skokie/IL (US)</p> <p>⑦④ Vertreter: Dietlin, Mohnhaupt &amp; Cie, Genève</p>
---	---

⑤④ Verfahren zum Verestern von alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin.

⑤⑦ alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin wird an der Phenylalanin-Carboxylgruppe selektiv in die entsprechenden Ester überführt. Man verwendet dazu ein proteolytisches Enzym mit spezifischer Esteraseaktivität. Das Verfahren wird in wässrigem Alkohol durchgeführt, wobei die Alkoholkonzentration so gewählt wird, dass die Esteraseaktivität umgekehrt wird. Die erhaltenen Ester des alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanins sind künstliche Süßmittel.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Veresterung der Carboxylgruppe des Phenylalaninrestes des alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanins der Formel



dadurch gekennzeichnet, dass man diese Verbindung mit einem Alkohol in Gegenwart einer wirksamen Menge eines proteolytischen Enzyms mit spezifischer Esteraseaktivität in einem wässrig-alkoholischen Medium bei einem pH von 4 bis 7 behandelt, wobei die Alkoholkonzentration so gewählt wird, dass sie ausreicht, um die Hydrolysewirkung des proteolytischen Enzyms umzukehren.

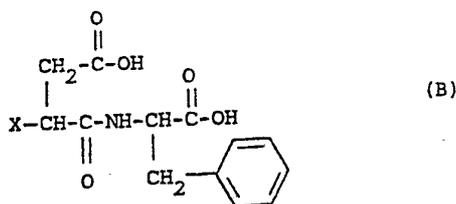
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Enzym eine Serin-Alkali-Proteinase ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Proteinase Subtilisin Carlsberg ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Alkohol Methanol in einer Konzentration von 10 bis 90 Vol.-% verwendet.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass man bei einem pH von 5,0 und einer Methanolkonzentration von 60 Vol.-% arbeitet.

6. Verfahren zur Veresterung der Carboxylgruppe des Phenylalaninrestes des N-geschützten alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanins der Formel



worin X eine primäre Aminogruppe bedeutet, die mit einer Schutzgruppe am Stickstoffatom versehen ist, dadurch gekennzeichnet, dass man mit dieser Verbindung als Ausgangssubstanz das Verfahren gemäss Anspruch 1 ausführt und dann die Schutzgruppe aus dem Rest X abspaltet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Schutzgruppe die Carbobenzyloxygruppe ist.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum selektiven Verestern der Carbonylgruppe des Phenylalaninrestes von alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin unter Verwendung eines proteolytischen Enzyms mit spezifischer Esteraseaktivität.

Die Veresterung von alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin durch chemische Mittel wird in den US-Patentschriften 3 933 781 und 4 173 562 beschrieben. Ein Nachteil der chemischen Verfahren besteht darin, dass die Veresterung sowohl an der Aspartylcarboxylgruppe wie auch an der Phenylalanincarboxylgruppe erfolgt, so dass unerwünschte Nebenprodukte der Formel I der beiliegenden Tabelle (im folgenden Diester genannt) und der Formel II (im folgenden Aspartyl-

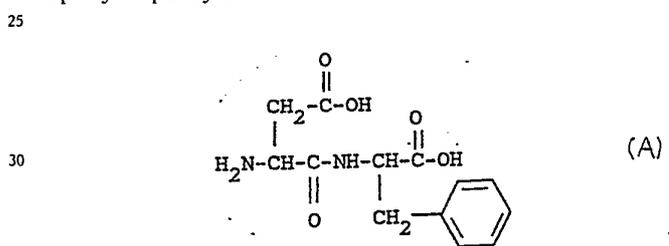
ester genannt) auftreten. Der Diester und der Aspartylester müssen durch Reinigungsoperationen abgetrennt werden, damit man die gewünschte Verbindung erhält.

Bekanntes enzymatische Veresterungsverfahren beziehen sich auf einfache Aminosäuren. Sie wurden nicht auf selektive Veresterungen von Dipeptiden mit ihren Problemen angewandt, insbesondere nicht auf alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin mit mehr als einer Carboxylgruppe.

Beispielsweise beschreiben Ingalls et al., Biotechnology and Bioengineering 17 (1975) 1627-1637 die Veresterung einer einfachen Aminosäure, N-Acetyltyrosin, mit immobilisierten Chymotrypsin oder Subtilisin Carlsberg in der freien unmodifizierten Form in einem Lösungsmittelsystem aus Wasser, Ethanol und Glycerin. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass erhebliche Mengen des Glycerinesters der Aminosäure gebildet werden.

Klibanov et al., Biotechnology and Bioengineering 19 (1977) 1351-1361 beschreiben die Veresterung der einfachen Aminosäure N-Acetyltryptophan mit immobilisiertem Chymotrypsin in einem Zweiphasensystem aus Wasser und Chloroform.

Die Erfindung betrifft nun ein Verfahren zur Veresterung der Carboxylgruppe des Phenylalaninrestes des alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanins der Formel



dadurch gekennzeichnet, dass man diese Verbindung mit einem Alkohol in Gegenwart einer wirksamen Menge eines proteolytischen Enzyms mit spezifischer Esteraseaktivität in einem wässrig-alkoholischen Medium bei einem pH von 4 bis 7 behandelt, wobei die Alkoholkonzentration so gewählt wird, dass sie ausreicht, um die Hydrolysewirkung des proteolytischen Enzyms umzukehren.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass die Carboxylgruppe des Phenylalaninrestes selektiv in einem Einphasensystem verestert wird, ohne dass die unerwünschten Nebenprodukte Diester und Aspartylester gebildet werden. Dies wird durch Verwendung einer Serin-Alkali-Proteinase erreicht, die aromatische Aminosäuren bevorzugt.

Die erfindungsgemäss herstellbaren alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin-alkylester sind wertvolle Süßmittel. Der Ausdruck «spezifische Esteraseaktivität» bezieht sich auf die Fähigkeit des proteolytischen Enzyms, selektiv die Carboxylgruppe des Phenylalaninrestes zu verestern. Die Süßmitteleigenschaften der erfindungsgemäss hergestellten Ester werden in der US-Patentschrift 3 492 131 beschrieben.

Man kann als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemässe Verfahren auch N-geschütztes alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin verwenden, wobei der hergestellte Ester dann N-geschützt ist. In diesem Fall kann man am Schluss die N-Schutzgruppe abtrennen, und zwar in bekannter Weise. Eine bevorzugte N-Schutzgruppe ist die Carbobenzyloxygruppe.

Bevorzugte Alkohole besitzen die Formel R-OH, worin R eine Niedrigalkylgruppe mit 1 bis 7 C-Atomen bedeutet, nämlich Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl und deren verzweigte Isomere.

Die Aminogruppe des Ausgangsmaterials kann durch übliche Schutzgruppen geschützt werden, wie z.B. Arylniederalkylgruppen, wie Diphenylmethyl oder Triphenylmethyl, die durch Halogen, Nitro, Niederalkyl oder Niederalkoxy substi-

tuiert sein können, oder auch durch Benzhydryl, Trityl und Di-para-methoxybenzhydryl, ferner durch eine Acylgruppe, wie Formyl, Trifluoracetyl, Phthaloyl, Benzolsulfonyl und o-Nitrophenylsulfonyl, ausserdem durch Reste von Carbonsäuren oder Thiocarbonsäuren, wie Carbobenzyloxygruppen, die im aromatischen Teil durch Halogen, Nitro, Niederalkyl, Niederalkoxy oder Carboalkoxy substituiert sein können, wie Carbobenzyloxy, p-Chlorcarbobenzyloxy, p-Nitrocarbobenzyloxy und p-Methoxycarbobenzyloxy, ferner durch gefärbte Benzylloxycarbonylgruppen, wie p-Phenylazobenzylloxycarbonyl und p-(p-Methoxyphenyl-azo)-benzylloxycarbonyl, und schliesslich auch durch 2-Tolyl-2-propoxycarbonyl, 2-Phenyl-2-propoxycarbonyl, 2-Tolyl-2-propoxycarbonyl und 2-(p-Biphenyl)-2-propoxycarbonyl. Auch aliphatische Oxycarbonylgruppen sind dienlich, wie t-Butoxycarbonyl, Alkyloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl und t-Amyloxycarbonyl. Speziell bevorzugt wird im vorliegenden Fall die Carbobenzyloxygruppe als N-Schutzgruppe.

Die Aminogruppe kann auch durch Enaminbildung geschützt werden, indem man sie mit 1,3-Diketonen umsetzt, wie etwa Benzoylacetone oder Acetylacetone.

Die N-Schutzgruppen können in üblicher Weise entfernt werden, wie etwa durch Hydrogenolyse (z.B. in Gegenwart von Palladiumschwarz), durch Behandeln mit Halogenwasserstoff, wie Brom- Fluor- oder Chlorwasserstoff in Essigsäure, oder durch Behandeln mit Trifluoressigsäure.

Die Veresterung kann in einer Wasser-Alkohol-Lösung erfolgen, die so gepuffert ist, dass das Enzym seine Wirksamkeit behält. Für Serin-Alkali-Proteinase beträgt dazu das pH etwa 4 bis 7. Typische Pufferlösungen sind Natriumpyrophosphat-, Citronensäure-, Essigsäure- und Tris-HCl-Lösungen.

Die verwendeten Serin-Alkali-Proteinasen sind Enzyme mit hoher Esteraseaktivität und selektiver Wirkung auf aromatische Aminosäuren. Typische Vertreter solcher Enzyme sind Subtilisin und Alkaliproteinase verschiedener Stämme von *Bacillus Aspergillus*, *Streptomyces*, *Penicillium* und *Arthrobacter*. Eine bevorzugte Serinalkali-proteinase ist das im Handel erhältliche Subtilisin Carlsberg. Das Enzym wird im Veresterungsverfahren in katalytischen Mengen angewandt, vorzugsweise 10 bis 500 mg pro Millimol alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin oder dessen N-geschütztem Derivat. Zum Unterstützen der Enzymwirkung kann ein Calciumsalz zugesetzt werden.

Das Enzym kann frei vorliegen oder immobilisiert auf einem geeigneten Träger, wie porösem Glas, Polyacrylamidgel, Carboxymethylcellulose oder Aminomethylcellulose. Solche Methoden werden in Immobilized Enzymes, Bd. 44, *Methods in Enzymology*, Herausg. Klaus Mosback, beschrieben.

Die Reaktionstemperatur beträgt gewöhnlich etwa 10–50 °C, was für die Enzymwirksamkeit genügt. Bevorzugt werden 20–40 °C.

Die Reaktion wird in wässrigem Alkohol durchgeführt, wobei die Alkoholkonzentration ausreichen muss, um die Esteraseaktivität des Enzyms umzukehren. Die Alkoholkonzentration kann 10 bis 90 Vol.-%, bevorzugt 30 bis 70 Vol.-% und speziell 50 bis 60 Vol.-% betragen. Das Optimum liegt bei 60 Vol.-%.

In einer speziell bevorzugten Ausführungsform wird als Enzym Subtilisin Carlsberg, eine Proteinase mit spezifischer Esterasewirkung, und Methanol in einer Konzentration von 60 Vol.-% angewandt. Die wässrige-alkoholische Mischung enthält 5,0 Millimol Calciumchlorid, das pH ist 5,0 und die Reaktionstemperatur beträgt 25 °C.

Unter diesen Bedingungen verläuft die Reaktion glatt bis zum Schluss. Bevorzugte Reaktionszeiten liegen zwischen 1 bis 260 Stunden, insbesondere zwischen 1 und 90 Stunden.

Das Endprodukt wird in üblicher Weise durch Chromatographieren oder andere bekannte Methoden aus der Reaktionsmischung entfernt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Temperaturen werden in °C angegeben und Mengen in Gewichtsteilen, falls nicht anders erwähnt. Das Verhältnis zwischen Gewichtsteilen und Volumenteilen ist dasselbe wie zwischen Gramm und Milliliter.

#### 10 Beispiel 1

Subtilisin Carlsberg (Protease Typ VIII, Sigma Chemical Co.) wird in einer Konzentration von 40 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser bei 5 °C dialysiert. 0,1 Volumenteile der Enzymlösung werden mit 0,9 Volumenteilen einer wässrigen Methanollösung gemischt, die 0,0056 Gewichtsteile alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin enthält. Die wässrige Methanollösung wird hergestellt durch Vermischen von 0,6 Volumenteilen Methanol mit 0,075 Volumenteilen von 0,33 M Natriumacetat, 0,225 Volumenteilen von 0,33 M Essigsäure und 0,002 Volumenteilen von 2,5 M Calciumchlorid. Vor der Zugabe des Enzyms wird die wässrige Methanollösung während einer Minute beschallt, um das alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin zu dispergieren. Das pH wird mit verdünnter Salzsäure auf 5,0 eingestellt. Die so erhaltene Reaktionslösung enthält 4 mg/ml Enzym, 5,0 mM Calciumchlorid, 0,1 M Essigsäurepuffer, 60% Methanol und 0,02 M alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin; sie wird während vier Tagen ständig bei etwa 25 °C gerührt. Die Mischung wird sodann durch eine Kolonne von Sephadex LH-120 fließen gelassen, um das Enzym vom Dipeptid zu trennen. Die Dipeptidfraktionen werden vereinigt und gemäss den US-Patenten 3 798 207 und 4 173 562 mit Halogenwasserstoff behandelt, um den alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin-methylester der Formel III auszufällen und zu reinigen.

#### 35 Beispiel 2

Das Verfahren gemäss Beispiel 1 wird mit einem immobilisierten Enzym als Katalysator wiederholt. Das Enzym wird covalent an DEAE-Cellulose gebunden, die mit Bromcyan aktiviert wurde. Dies erfolgt, indem man 0,075 Gewichtsteile DEAE-Cellulose (vorgequollte DE52, Whatman) mit 0,1 M Natriumbicarbonat wäscht und dann mit 3 Volumenteilen Bromcyanlösung (25 mg/ml) behandelt. Das pH wird mit 2 M Natriumhydroxid auf 11,0 eingestellt und gehalten, und man rührt langsam während 6 Minuten bei 25 °C. Das Gel wird abfiltriert und mit 100 Volumenteilen 0,1 M Natriumbicarbonat gewaschen. 0,025 Gewichtsteile Subtilisin Carlsberg werden in 0,25 Volumenteilen 0,1 M Natriumbicarbonat gelöst und dann während vier Stunden gegen den gleichen Puffer bei 5 °C dialysiert. Die Enzymlösung wird mit dem durch Bromcyan aktivierten Gel in einem geschlossenen Polypropylenrohr unter Argon vermischt und dann während 17 Stunden bei 5 °C belassen. Das gebundene Enzym wird hierauf mit Wasser gewaschen und mit 5 Volumenteilen 1 M Ethanolamin (pH 9,0) unter mässigem Rühren während 2 Stunden bei 25 °C belassen. Das Gel wird zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in 0,3 Volumenteilen destilliertem Wasser suspendiert. Das so immobilisierte Enzym wird dann in 0,7 Volumenteilen einer wässrigen Methanollösung suspendiert, und zwar derart, dass die erhaltene Mischung die gleichen Komponenten in gleicher Konzentration wie in Beispiel 1 aufweist. Die Reaktion erfolgt wie im Beispiel 1, jedoch wird das immobilisierte Enzym durch Zentrifugieren vor der Reinigung des Endproduktes abgetrennt.

#### 65 Beispiel 3

Wenn man das in den Beispielen 1 und 2 angewandte Methanol durch eine äquivalente Menge Ethanol ersetzt und

praktisch die gleichen Reaktionsbedingungen einhält, erhält man den alpha-L-Aspartyl-L-phenylalanin-ethylester der Formel IV.

Beispiel 4

Man verfährt gemäss dem Beispielen 1 und 2, verwendet

jedoch als Ausgangsmaterial 0,0125 Gewichtsteile N-Carbobenzoxy-alpha-L-aspartyl-L-phenylalanin. Man erhält den Methylester des N-Carbobenzoxyderivats. Aus diesem wird die N-Carbobenzoxyschutzgruppe durch Reduzieren nach Bergmann und Zervas, Ber. 65 (1932) 1192 abgetrennt.

Tabelle

