



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(11) 910117

(51) Дополнительный к патенту —

(22) Заявлено 26.01.78 (21) 2570052/23-04

(23) Приоритет — (32) 27.01.77

(31) 7279/1977 (33) Япония

Опубликовано 28.02.82. Бюллетень № 8

Дата опубликования описания 23.04.82

(51) М. Кл.

С 07 С 103/52
/А 61 К 37/02

(53) УДК 547.964.
.4.07(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы
Есиказу Изова, Мунеки Охмори, Каору Мори, Тецуя Исикава,
Юдзи Нонака, Кеити Кихара, Кийотака Ояма, Хейидзиро Сато
и Сигеаки Нисимура
(Япония)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
"Тойо Сода Мануфакчуринг КО, ЛТД и (Зайданходзин) Сагами Кемикал
Рисерч Сентер"
(Япония)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ
ДИПЕПТИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО И АМИНОКИСЛОТЫ

РРЧК

Изобретение относится к способу получения новых продуктов присоединения дипептидного производного и аминокислоты, соединений, обладающих биологической активностью, которые могут найти применение в биохимии и медицине.

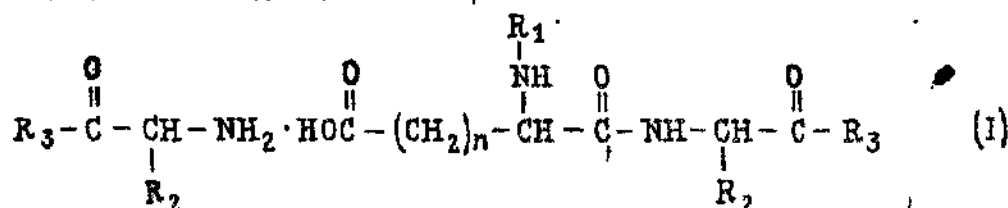
Известно применение протеаз (таких как папаин, химотрипсин) для образования пептидных связей. Таким способом были осуществлены белковые синтезы из моноаминокарбоновых кислот, таких как лейцин, имеющих N-концевую защитную бензоильную группу, и леицин глицин, обе из которых имеют C-концевую защитную группу [1].

При этом продукты реакции осаждались в водной среде и как водонераств-

воримые при потере водорастворимых групп (что необходимо для сдвига обратимой реакции в сторону образования белка). В случае, когда водорастворимая группа сохраняется в реакционном продукте, например, как в случае использования в качестве исходного соединения дикарбоновых аминокислот, необходимо водорастворимую группу исходного соединения закрыть менее гидрофильной защитной группой.

Цель изобретения — новый способ получения новых биологически активных соединений.

Поставленная цель достигается тем, что в способе получения продуктов присоединения дипептидного производного и аминокислоты общей формулы



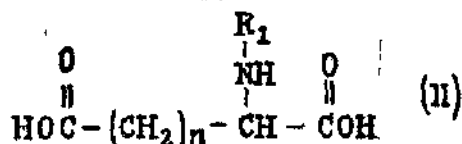
где R_1 — бензилоксикарбонил, пара-метоксибензилоксикарбонил;

R_2 — бензил;

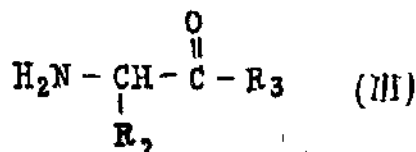
R_3 — метокси, этокси-группы;

n — 1 или 2

N-замещенную аминокислоту общей формулы,



где значения R_1 и n указаны выше, подвергают взаимодействию со сложным эфиром аминокислоты общей формулы



где значения R_1 и R_2 указаны выше.

При молярном соотношении исходных соединений формул II и III 1:1 — 1:3,75, в водной среде, в присутствии металлопротеазы при pH 5,0-7,2, температуре 10-90°C. Продукты, полученные в процессе реакции, мало растворимы в воде и выпадают в осадок. Кроме того, предлагаемый способ позволяет получить оптически активный продукт присоединения дипептида и сложного эфира аминокислоты из рацематов, поскольку реакция образования пептидной связи при этом происходит только на L-изомерах. С другой стороны, сложные эфиры аминокислот, используемые для проведения реакции присоединения с образованием продуктов присоединения, могут быть либо в L-форме, либо в D-форме, либо их смесью.

При использовании DL-формы сложного эфира аминокислоты L-изомер DL-формы сложного эфира аминокислоты расходуется в процессе пептидного синтеза при получении продукта присоединения, остающийся сложный эфир аминокислоты имеет D-форму.

Если концентрации исходных веществ высоки, процесс проходит с количественным выходом. При использовании двух молей DL-формы сложного эфира аминокислоты на 1 моль L-формы. N-замещенной моноаминодикарбоновой кислоты получают продукт присоединения, состоящий в основном из LL-дипептидного сложного эфира и сложного

эфира D-аминокарбоновой кислоты. Полученный продукт присоединения может быть легко разделен на два частичных компонента, т. е. на LL-дипептидный эфир и сложный эфир D-аминокислоты. Таким образом, предлагаемый способ может одновременно обеспечить получение дипептидного эфира и оптическое разделение сложного эфира DL-аминокарбоновой кислоты.

Отделенную D-форму или обогащенную D-форму сложного эфира аминокислоты можно рацемизовать обычным способом, и полученный продукт использовать в качестве исходного вещества в описываемом способе.

При использовании DL-формы N-замещенной моноаминодикарбоновой кислоты и L-формы сложного эфира аминокислоты D-изомер из DL-формы N-замещенной моноаминодикарбоновой кислоты, являясь инертным, остается в водной среде, в результате чего может быть получен продукт присоединения LL-дипептидного сложного эфира и сложного эфира L-аминокарбоновой кислоты. Соответственно, если D-форму N-замещенной моноаминодикарбоновой кислоты выделяют из водной среды, то это может одновременно обеспечить получение продукта присоединения и оптическое разделение N-замещенной DL-моноаминодикарбоновой кислоты. Если выделенную N-замещенную D-моноаминодикарбоновую кислоту рацемизовать известным способом, то полученный продукт может быть использован в качестве исходного вещества. При использовании DL-формы N-замещенной моноаминодикарбоновой кислоты и DL-формы сложного эфира аминокислоты из водной среды может быть получена N-замещенная DL-моноаминодикарбоновая кислота, а также продукт присоединения LL-дипептидного сложного эфира и сложного эфира D-аминокарбоновой кислоты, причем указанный продукт присоединения разделяют на компоненты, как указано выше. Одновременно может быть достигнуто образование дипептидного сложного эфира и оптическое разделение N-замещенной DL-моноаминодикарбоновой кислоты и сложного эфира DL-аминокарбоновой кислоты.

Предлагаемый способ позволяет исключить стадии введения и удаления защитных групп в боковой цепи, которые считаются неизбежными в известных

способах, что соответственно позволя-
ет предотвратить потерю исходных ве-
ществ; а также использовать DL-форму
исходных соединений. В обычных спосо-
бах с использованием фермента D-изо-
мер DL-формы исходных веществ не ну-
жен в реакции, и хотя он не влияет
на ход реакции, но вызывает потерю
исходных веществ. Однако D-форму ис-
ходных веществ можно с успехом ис-
пользовать в качестве агента для осаж-
дения пептида с последующим их вос-
становлением.

Таким образом, при осуществлении
предлагаемого способа может быть од-
новременно достигнуто оптическое раз-
деление N-замещенной DL-аминодикарбо-
новой кислоты и сложного эфира DL-
аминокарбоновой кислоты.

Продукты присоединения имеют ха-
рактеристики, которые можно ожидать
на основании формулы I. Например,
типичный продукт присоединения, по-
лученный реакцией N-бензилоксикарбо-
нил L-аспарагиновой кислоты и мети-
лового эфира L-фенилаланина, дает
поглощение в инфракрасном диапазоне
и спектр ЯМР, указанные ниже.

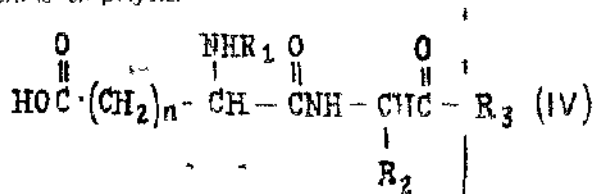
Инфракрасный спектр: 3260 см^{-1}
(колебание растяжения связи N-H),
 $3000-3200\text{ см}^{-1}$ (колебание растяжения
связи C-H); 1740 см^{-1} (сложный эфир
C=O); 1720 см^{-1} (C=O уретан); 1660 см^{-1}
(1-ое амидное поглощение); 1630 см^{-1}
(карбоксилат), 1540 см^{-1} (2-е амид-
ное поглощение); 1430 и 1450 см^{-1}
(C-H деформационное колебание);
 1390 см^{-1} (карбоксилат); 1200 и
 1290 см^{-1} (C-O-C колебание растяжения
связи и 3-е амидное поглощение),
 1050 см^{-1} (колебание фенила в плос-
кости); и 740 и 695 см^{-1} (колебание
монозамещенного бензольного кольца
вне плоскости).

ЯМР-спектр, δ : (1) $2,75\text{ ppm}$ (2H),
(2) $3,02\text{ ppm}$ (4H), (3) $3,61\text{ ppm}$ (3H),
 $3,7\text{ ppm}$ (3H), (4) $4,4-4,8\text{ ppm}$ (3H);
(5) $5,05\text{ ppm}$ (2H), (6) $5,82\text{ ppm}$ (5H);
(7) $7,3\text{ ppm}$ (15H).

Результаты элементарного анализа
продукта присоединения оказались та-
кими же, что и рассчитанные значения
для формулы I, где значения R_1 , R_2 ,
 R_3 и n указаны выше.

Когда продукт присоединения обраба-
тывают сильной кислотой, такой как
соляная, и полученный продукт экстра-
гируют из органического растворителя,
такого как этилацетат, то из органи-

ческого слоя получают кислотное со-
единение. При обработке продукта при-
соединения указанным образом получают
кислотное соединение с characteristi-
ками и свойствами, отвечающими соеди-
нению формулы



в DL-форме, где R_1 , R_2 , R_3 и n имеют
те же значения, что и в продукте при-
соединения.

Кислотное соединение, полученное
из продукта присоединения при ката-
литическом восстановлении дает из-
вестное соединение - метиловый эфир
L-аспартил-фенилаланина.

Результаты анализа соединений,
полученные на основании инфракрасных
спектров, спектр ЯМР и элементарного
анализа подтверждают структуру соеди-
нения формулы I. Полностью совпадаю-
щие результаты получены также и в слу-
чае, когда выбраны соединения с други-
ми значениями R_1 , R_2 , R_3 и n .

Протеазы, используемые в предлага-
емом способе, являются металлопротеа-
зами, имеющими металлический ион в
активном центре. Пригодными металло-
протеазами являются ферменты, полу-
ченные из микроорганизмов, такие как
нейтральные протеазы из актиномицета,
пролизин, термолизин, колагеназа,
протеаза *Crotalus atrox* и т. д. Могут
быть использованы также неочищенные
ферменты, такие как термолизин, трипси-
наза-N, проназа и т. д. Чтобы подавить
действие эстеразы, содержащейся в
неочищенных ферментах, предпочтитель-
но использовать ферментный ингибитор,
картофельный ингибитор вместе с не-
очищенными ферментами. Используют
тиопные протеазы, папаин или сери-
новые протеазы, трипсин, однако они
обладают эстеразной активностью. По-
этому, во время проведения реакции с
использованием таких ферментов необ-
ходимо принять меры для предотвраще-
ния гидролиза сложных эфиров.

Пример 1. 1335 мг (5 ммоль)
N-бензилоксикарбонил L-аспарагиновой
кислоты и 1078 мг (5 ммоль) хлоргид-
рата метилового эфира L-фенилаланина
помещают в 30 мл колбу и добавляют
20 мл воды до их растворения, pH до-
водят до 6 с помощью 7%-ной аммиачной

воды. Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина, смесь встряхивают при 38-40°C в течение ночи. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают 40 мл воды и сушат. Получают 1145 мг тонких игольчатых кристаллов, имеющих т. пл. 117-120°C (продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1); выход 75,5% в расчете на хлоргидрат метилового эфира-фенилаланина).

После перекристаллизации из смеси растворителей этилацетата и н-гексана физические свойства и результаты элементарного анализа продукта следующие: т. пл. 120-124°C; $(\alpha)_D^{25} = +7,1$ (C=1, метанол).

Найдено, %: C 63,15; H 6,15; N 7,00

$C_{32}H_{37}N_3O_9$

Рассчитано, %: C 63,24; H 6,13; N 6,97.

Сняты ИК-спектр и спектр ¹H-ЯМР продукта.

1145 мг полученного продукта растворяют в 40 мл 1 н. HCl и трижды экстрагируют 30 мл этилацетата. Экстракты объединяют и промывают водой, беря порции по 20 мл (3 раза), и сушат над безводным сульфатом магния. Раствор концентрируют и продукт перекристаллизовывают из н-гексана, получают 640 мг. Физические свойства и результаты элементарного анализа продукта следующие: т. пл. 115-125°C; $(\alpha)_D^{25} = -15,3$ (C=1 метанол)

Найдено, %: C 61,52; H 5,65; N 6,57

$C_{32}H_{34}N_2O_7$

Рассчитано, %: C 61,67; H 5,65; N 6,54.

Результаты инфракрасного спектра и ЯМР-спектра дают характеристики, ожидаемые в метиловом сложном эфире N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина.

Полученные результаты совпадают с результатами исследования соединения, полученного при бензилоксикарбонилировании аминокислоты метилового эфира L-аспартил-L-фенилаланина.

Метиловый эфир L-фенилаланина выделяют из смеси солянокислой фазы и фракции промывочной воды, отделенной при экстракции из этилацетатной фазы. Подтверждено, что соединение, полученное посредством первой реакции - продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-

фенилаланина. Спектром ¹H-ЯМР подтверждено, что их молярное отношение составляет 1:1.

Пример 2. 1335 мг (5 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 1078 мг (5 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина загружают в 30 мл колбу и к смеси добавляют 10 мл воды, до их растворения и pH раствора доводят до 6 с помощью 7%-ной аммиачной воды. Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина, и смесь непрерывно встряхивают при 38-40°C в течение ночи. Осадок отфильтровывают, сушат, получают 1504 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1); (выход 99,1% в расчете на хлоргидрат метилового эфира L-фенилаланина, т. пл. 104-113°C).

Пример 3. Получение продукта и обработку реакционной массы проводят аналогично примеру 2, но изменяют количество N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира L-фенилаланина на 534 мг (2 ммоль) и 863 мг (4 ммоль) соответственно, получают 1068 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 70,4% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 116-119°C.

Пример 4. 534 мг (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 863 мг (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина загружают в 30 мл колбу, растворяют в 8 мл воды, pH доводят до 6,2 с помощью 7%-ной аммиачной воды. Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина, и смесь встряхивают при 38-40°C в течение ночи. Осадок отфильтровывают, отделяют от раствора и сушат, получают 1099 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 90,5% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту.

Пример 5. 267,2 мг (1 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 537,6 мг (3 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 5 мл буферного раствора Мак-Илвай-

на (рН 7,0). Полученный раствор смешивают с 100 мг термоазы и 100 мг картофельного ингибитора, и смесь встряхивают в течение 20 ч при 38°C. Осадок отфильтровывают и промывают водой и сушат, получают 580 мг неочищенного кристаллического продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 95,5% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 123-125°C.

Продукт растворяют в 40 мл смеси диметилформамид и вода (1:1), и к раствору добавляют при перемешивании H-форму сильнокислотной катионообменной смолы, которую затем отделяют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Остаток растворяют в диметилформамиде и к раствору добавляют воду, в осадок выпадает 330 мг метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина, выход 77,0% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 123-125°C.

Пример 6. 267,2 мг (1 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 537,6 мг (3 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 5 мл буферного раствора Мак-Илвайна (рН 7,0). Полученный раствор смешивают со 100 мг тациназы N и со 100 мг картофельного ингибитора, смесь встряхивают в течение 6 ч при 38°C. Осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат. Получают 120 мг неочищенного кристаллического продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1) выход 19,7%, т. пл. 119-123°C.

Согласно примеру 5, продукт обрабатывают сильнокислотной катионообменной смолы в H-форме, получают 50 мг метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Выход 11,7%, т. пл. 95-105°C.

Пример 7. 1335 мг (5 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 1078 мг (5 ммоль) метилового сложного эфира L-фенилаланина загружают в 30 мл колбу, добавляют 4 мл воды, рН полученного раствора доводят до 6,8 с помощью триэтиламина, добавляют 20 мг термолизина, смесь встряхивают при 38-40°C в течение

2 дней. Осадок отфильтровывают, промывают 40 мл воды, сушат, получают 475 кг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 31,3% в расчете на хлоргидрат метилового эфира L-фенилаланина. После перекристаллизации из смеси этилацетата и n-гексана получают продукт с т. пл. 120-124°C, $[\alpha]_D^{25} = +7,2$ (с = 1, метанол)

Элементарный анализ

Найдено, %: С 63,52; Н 6,22; N 7,04

Рассчитано, %: С 63,24; Н 6,13; N 6,97

Пример 8. Процесс ведут аналогично примеру 7, но рН доводят до 5,2, получают 753 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 49,5% в расчете на метиловый эфир L-фенилаланина.

Пример 9. К раствору 133,6 мг (0,5 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 89,2 мг (0,5 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина в 2,5 мл буферного раствора Мак-Илвайна (рН 7,0) с 0,07 мл триэтиламина, имеющему рН 6,7, добавляют 50 мг термоазы и 50 мг картофельного ингибитора, смесь встряхивают при 38°C в течение 20 ч. Осадок отфильтровывают, промывают водой, получают 130 мг неочищенного продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 85,5% в расчете на метиловый эфир L-фенилаланина, т. пл. 115-124°C.

Раствор продукта растворяют в 20 мл смеси из диметилформамида и воды (1:1), обрабатывают сильнокислотной катионообменной смолой в H-форме согласно примеру 5, получают 75 мг метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланина, полный выход 70% в расчете на 50% количества исходного метилового эфира L-фенилаланина.

Пример 10. Реакцию проводят аналогично примеру 9, но используют 0,05 мл N-метилморфолина вместо 0,07 мл триэтиламина при начальном рН 6,4. Получают 120 мг неочищенного кристаллического продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и

метилового эфира L-фенилаланина (1:1) выход 78,9% в расчете на метиловый эфир L-фенилаланина, т. пл. 118-124°C.

Продукт обрабатывают сильнокислотной катионнообменной смолой в H-форме согласно примеру 9, получают 70 мг кристаллического метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланина. Полный выход 66% в расчете на 50%-ное использование количества исходного метилового эфира L-фенилаланина.

Пример 11. Проводят реакцию аналогично примеру 4, но реакцию проводят при pH 6,5 при встряхивании в течение 1 ч, получают 920 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 75,8%.

Пример 12. 524 мг (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 863 мг (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 2 мл воды, к раствору добавляют 5,5 мг 1н. NaOH до pH 7.

Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина и смесь встряхивают при 38-40°C в течение 2 ч. Осадок отфильтровывают, высушивают, получают 734 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 60,5%, т. пл. 106-118°C.

Пример 13. 540 мг (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 863 мг (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 7 мл воды, pH раствора доводят до 6 с помощью 7%-ной аммиачной воды, к раствору добавляют 100 мг термоазы, смесь встряхивают при 38-40°C в течение ночи. Осадок отфильтровывают, промывают 70 мл воды, сушат, получают 550 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина (1:1). Выход 45,3%, т. пл. 113-116°C.

Пример 14. 270 мг (1 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 432 мг (2 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 4 мл воды, pH раствора доводят до 6 с помощью 7%-ной аммиачной воды.

К полученному раствору добавляют 50 мг термоазы, смесь непрерывно встряхивают при 38-40°C в течение 40 ч. Осадок отфильтровывают, сушат, получают 177 мг продукта присоедине-

ния метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1). Выход 29,1% т. пл. 103-112°C.

Пример 15. Процесс проводят аналогично примеру 14, но в раствор добавляют дополнительно еще 50 мг картофельного ингибитора. Получают 381 мг того же самого продукта. Выход 62,7%, т. пл. 105-117°C.

Пример 16. 534 мг (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 863 мг (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира DL-фенилаланина растворяют в 7 мл воды, величину pH доводят до 6,2 с помощью 7%-ной аммиачной воды.

Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина и встряхивают в течение ночи при 38-40°C. Осадок отфильтровывают, сушат, получают 1045 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира фенилаланина (1:1). Выход 86,1% в расчете на N-бензоилкарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 104-108°C.

После перекристаллизации из смеси этилацетата и n-гексана получают продукт с т. пл. 127-135°C, $[\alpha]_D^{25} = -6,4$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 63,52; H 6,19; N 6,92
 $C_{32}H_{37}N_3O_7$
 Рассчитано, %: C 63,24; H 6,13; N 6,97.

Методом ЯМР показана тождественность полученного продукта с продуктом присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина (1:1), т. е. соединение по примеру 1.

800 мг продукта растворяют в 40 мг 1н. HCl и экстрагируют дихлорметаном (30 мл x 3), органическую фазу отделяют, промывают водой, сушат над безводным сульфатом, упаривают, остаток перекристаллизовывают из смеси этилацетата и n-гексана, получают 450 мг кристаллического продукта, т. п. 124-132°C, $[\alpha]_D^{25} = -15,3$ (C = 1 метанол).

Найдено, %: C 61,38; H 5,58; N 6,29
 $C_{22}H_{24}N_3O_7$
 Рассчитано, %: C 61,67; H 5,65; N 6,54.

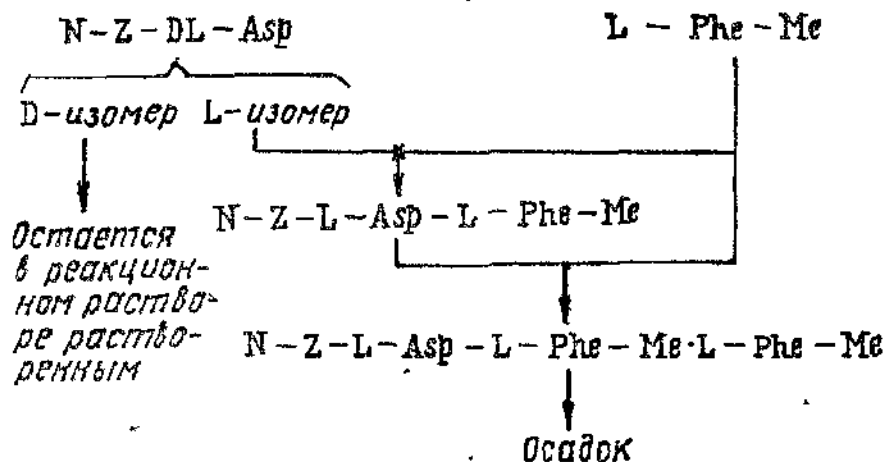
Продукт представляет собой метиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина.

Водную фазу после отделения слоя дихлорметана смешивают с бикарбонатом натрия, значение pH доводят до 8,7, продукт трижды экстрагируют 30 мл хлористого метилена. Экстракт сушат над безводным сульфатом магния, в экстракт подают газообразный хлористый водород в течение 10 мин, затем упаривают досуха. Остаток перекристаллизовывают из этилового эфира, получают 29,0 мг хлоргидрата метилового

эфира D-фенилаланина, т. пл. 149 - 151°C, $[\alpha]_D^{25} = -15,1$ (C = 1, метанол), (инфракрасный спектр и спектр ЯМР совпадают со спектрами L-формы).

Таким образом, полученный продукт - продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина (1:1).

Пример 17.



1069 мг (4 ммоль) N-бензилоксикарбонил-DL-аспарагиновой кислоты и 863 мг (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 2 мл воды, значение pH доводят до 6 с помощью 7%-ной аммиачной воды.

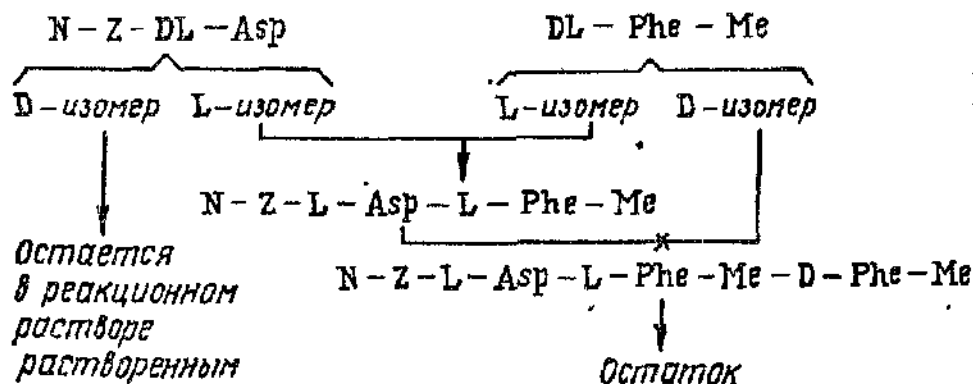
Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина и встряхивают при 38-40°C в течение 2 ч. Осадок отфильтровывают, промывают 20 мл воды, сушат, получают 787 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина

(1:1) выход 64,8% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 105-110°C.

После перекристаллизации из смеси этилацетата и n-гексана, получают продукт с т. пл. 121-125°C; $[\alpha]_D^{25} = 7,2$ (C = 1, метанол).

Из оставшейся реакционной смеси выделяют N-бензилоксикарбониласпарагиновую кислоту (в основном в D-форме).

Пример 18. Используют оба рацемата



Процесс проводят аналогично примеру 17, но используют метиловый эфир DL-фенилаланина вместо метилового

эфира L-фенилаланина. Получают 756 мг продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-

-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина (1:1). Выход 62,3% в расчете на N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту, т. пл. 105-111°C.

Продукт перекристаллизовывают из смеси этилацетата и н-гексана, т.пл. 126-134°C; $[\alpha]_D^{25} = -6,5$ (C = 1, метанол). Из оставшейся реакционной смеси выделяют N-бензилоксикарбониласпарагиновую кислоту (в основном в D-форме).

Пр и м е р 19. 5,34 г (20 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 7,32 г (42 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 70 мл воды. Получают раствор с pH 6,2-6,3.

К раствору добавляют 200 мл термолизина и смесь непрерывно встряхивают в течение 4 ч при 38-40°C. Осадок отфильтровывают, промывают 70 мл воды, сушат, получают 10,11 г продукта, (т. пл. 117-120°C).

Полученное соединение - продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1), после перекристаллизации из смеси ацетата и н-гексана, т. пл. 120-124°C, $[\alpha]_D^{25} = +7,2$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 63,16; H 6,14; N 6,99

$C_{32}H_{37}N_3O_9$

Рассчитано, %: C 63,24; H 6,13 N 6,97.

Инфракрасный спектр и спектр ЯМР показали те же характеристики, которые указаны выше для продукта присоединения (1:1) метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина. После обработки полученного продукта сильной кислотой, экстракции этилацетатом, последующей отгонки органического растворителя получают метиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина.

10 г (1,65 ммоль) полученного продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и сложного эфира L-фенилаланина загружают в 30 мл колбу и добавляют 2 мл воды и 2,0 мл 1н. HCl, смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин.

Суспензию фильтруют, осадок промывают 4 мл воды, сушат, получают 0,74 г метилового эфира N-бензилок-

сикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Выход 98,8%. После растворения в этилацетате продукт осаждают н-гексаном, т. пл. 121-124°C, $[\alpha]_D^{25} = -15,4$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 61,58; H 5,64; N 6,56.

$C_{22}H_{24}N_2O_7$

Рассчитано, %: C 61,67; H 5,65; N 6,54.

Инфракрасный спектр продукта совпадает со спектром стандартного продукта.

Идентичность продукта подтверждена сравнением водного раствора полученного продукта с водным раствором стандартного соединения методом высокоскоростной жидкостной хроматографии. Чистота, измеренная этим способом, составляет 100%. Устройство для проведения высокоскоростной жидкостной хроматографии и условия ее проведения указаны ниже. Этот способ также использован для оценки чистоты продуктов разложения, продуктов присоединения в примерах, если это не оговорено иначе. То же устройство и те же условия использованы в примерах, если речь идет об этом способе.

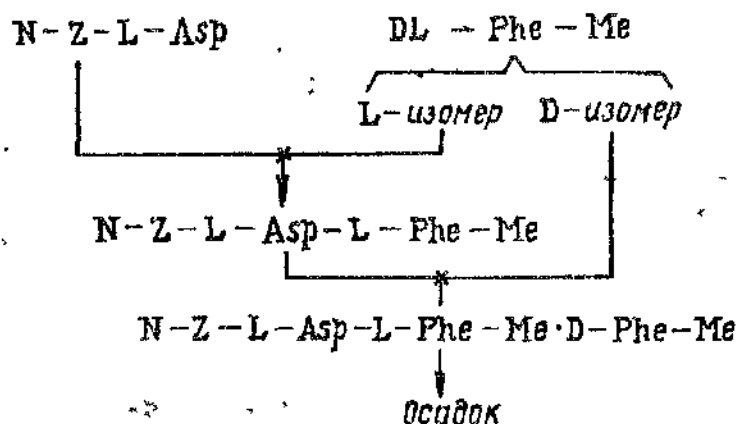
Устройство для высокоскоростной жидкостной хроматографии (TSK-HLC 801).

Колонка: внутренний диаметр 7,5 мм длина 30 см; наполнитель: крахмальный гель, размер частиц 5 мкм (TSK-GEL LS 170)..

Элюент: 0,5%-ный водный раствор ацетата натрия. Скорость потока 0,8 мл/мин перепад давления 20 кг/см², температура измерения комнатная, детектор - дифференциальный рефрактометр.

Пр и м е р 20. 1,00 г (1,65 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного в примере 19, растворяют в смеси 2 мл воды и 1,32 мл 1 н. HCl. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин и обрабатывают в условиях по примеру 19. Получают 0,70 г продукта в виде тонких призматических кристаллов. Содержание метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина 96,8% т. пл. 100-126°C.

Пр и м е р 21.



D-Phe-Me не реагирует с N-Z-L-Asp, в реакции с протеазой связывается с дипептидом и осаждается как аддитивное соединение.

0,534 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 0,863 г (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира DL-фенилаланина растворяют в 10 мл воды, pH раствора доводят до 6,0 с помощью 7%-ной аммиачной воды. К раствору добавляют с 50 мг термоллизина и смесь встряхивают в течение ночи при 38-40°C. Осадок отфильтровывают, промывают 10 мл воды и сушат, получают 0,90 г кристаллического продукта. Т. пл. 120-126°C. После перекристаллизации из смеси этилацетата и n-гексана, получают продукт с т.пл. 128-134°C и $[\alpha]_D^{25} = -6,3$ (C = 1, метанол). Инфракрасный спектр и спектр ЯМР продукта идентичны спектрам при соединении метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1).

Найдено, %: С 63,42; Н 6,17; N 6,95
C₃₂H₃₇N₃O₉

Рассчитано, %: С 63,24; Н 6,13;
N 6,97.

Продукт обрабатывают кислотой, получают метиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метиловый эфир D-фенилаланина в мольном отношении 1:1. Из полученных результатов сделан вывод, что соединение есть продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина (1:1).

Смесь 0,50 г (0,82 ммоль) продукта присоединения с 4 мл воды и 0,26 г лимонной кислоты перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин и обрабатывают в условиях при-

мера 19, получают 0,35 г кристаллов метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход 99,3%.

Пример 22. К 0,50 г (0,8 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного в примере 19, добавляют 4 мл воды и 0,24 г (1,2 ммоль) п-толуолсульфокислоты моногидрата, обрабатывают смесь по примеру 19, получают 0,33 г кристаллов метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход 93,6%.

Пример 23. К смеси 0,45 г (0,82 ммоль) 85% муравьиной кислоты и 8 мл воды добавляют 0,50 г (0,82 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного в примере 19, смесь перемешивают в течение 20 мин при комнатной температуре, продукт отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат, получают 0,312 г белых кристаллов метилового эфира, N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход 88,6%.

Пример 24. 0,47 г (0,82 ммоль) ледяной уксусной кислоты и 8 мл воды помещают в 30 мл колбу, 0,50 г (0,82 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-бензилокси-карбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин, продукт отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат, получают 0,308 г белых кристаллов метилового эфира N-бензи-

локсикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%, выход 87,2%.

Пример 25. 1,00 г (1,65 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного в примере 19, загружают в 30 мл колбу, добавляют 2 мл воды и 2,0 мл 1 н. HCl, смесь перемешивают при 60°C в течение 3 мин, затем обрабатывают способом, описанным аналогичным в примере 19, получают 0,35 г кристаллов метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход 100%.

Пример 26. 0,594 г (2 ммоль) N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 0,860 г (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 1 н. NaOH, значение pH доводят до 6,0. Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина, встряхивают в течение ночи 38-40°C. Осадок отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат, получают 0,928 г кристаллов, имеющих 68-74°C.

Результаты подтверждают получение продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1).

После перекристаллизации продукта из смеси этилацетата и н-гексана. Т.пл. 72-76°C. $[\alpha]_D^{25} = +6,5$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 61,85; H 6,04; N 6,46
 $C_{23}H_{26}N_2O_8$
 Рассчитано, %: C 62,15; H 6,16; N 6,59.

Инфракрасный спектр: 3280 cm^{-1} (колебание растяжения связи N-H); 3020 и 2930 cm^{-1} (колебание растяжения C-H); 1735 cm^{-1} (сложный эфир C=O); 1700 cm^{-1} (C=O уретан); (2-ое амидное поглощение); 1435 cm^{-1} (C-H деформационное колебание); 1380 cm^{-1} (карбоксилат); 1210 до 1240 cm^{-1} (колебание растяжения связи C-O-C и 3-е амидное поглощение); 1030 cm^{-1} (колебание фенила в плоскости) и 690, 740 и 810 cm^{-1} колебание фенила вне плоскости).

Спектр ЯМР, δ : (1) 2,7 ppm (2H); (2) 3,1 ppm (4H); (3) 3,6 ppm (3H); 3,7 ppm (3H); (4) 3,8 ppm (3H); (5) 4,0 ppm (1H); (6) 4,5 ppm (1H); (7)

4,8 ppm (1H); (8) 5,0 ppm (2H); (9) 5,65 ppm (3H); (10) 5,65 ppm (1H); (11) 6,2 (1H); и (12) 6,8 до 7,3 ppm (14H).

Полученные результаты показывают, что продукт является продуктом присоединения формулы I, где R₁, R₂, R₃, и n означают n-метоксибензилоксикарбонил, бензил, метокси и 1 соответственно.

Смесь 0,500 г (0,78 ммоль) продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного таким образом, с 2 мл воды и 0,94 мл (0,94 ммоль) 1 н. HCl перемешивают при 60°C в течение 3 мин. Полученную суспензию отфильтровывают и промывают 6 мл воды, сушат, получают 0,32 г кристаллов.

Нижеследующие результаты подтверждают, что продукт является сложным эфиром N-P-метокси-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%, выход 89,1%.

Кристаллы растворяют в этилацетате и продукт осаждают н-гексаном получают соединение с т. пл. 128-130°C, $[\alpha]_D^{25} = -15,1$ (C = 1 метанол)

Найдено, %: C 60,30; H 5,74; N 5,99
 $C_{23}H_{26}N_2O_8$
 Рассчитано, %: C 60,25; H 5,72; N 6,11.

Инфракрасный спектр: 3280 cm^{-1} (растяжение N-H); 2930 и 3020 cm^{-1} (колебание растяжения C-H); 1735 cm^{-1} (C=O сложный эфир); 1700 cm^{-1} (C=O уретан); 1650 cm^{-1} (1-ое амидное поглощение); 1510 до 1540 cm^{-1} (2-е амидное поглощение); 1440 cm^{-1} (деформация C-H); 1220 до 1270 cm^{-1} (колебание растяжения C-O-C, 3-е амидное поглощение); 1030 и 1050 cm^{-1} (колебание фенила в плоскости); 690 и 810 cm^{-1} (колебание фенила вне плоскости).

ЯМР спектр, δ : (1) 2,8 ppm (2H); (2) 3,0 ppm (2H) (3) 3,6 ppm (3H); (4) 3,8 ppm (3H) (5) 4,5 ppm (1H); (6) 4,8 ppm (1H) (7) 6,6 ppm (2H); (8) 6,0 ppm (1H) (9) 6,6 ppm (1H); (10) 6,6 ppm (1H) (11) 6,8 до 7,3 ppm (9H).

Эти результаты показывают, что конечным продуктом является соединение формулы IV, в котором R₁, R₂, R₃ и n означает n-метоксибензилоксикарбонил, бензил, метокси и 1 соответственно.

0,2 весовых частей полученного метилового эфира N-P-метоксибензилокси-карбонил-L-аспартил-L-фенилаланина растворяют в 2 вес.ч. ацетона и к полученному раствору добавляют 1 вес.ч. 4 н. HCl, смесь нагревают на водяной бане со слабым противотоком в течение 1,5 ч, до полного разложения для образования раствора, содержащего в качестве основных компонентов метиловый сложный эфир L-аспартил-L-фенилаланина, метиловый эфир L-фенилаланина и анисовый спирт, причем из указанного раствора получают метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина 15

Пример 27. 0,562 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-глутаминовой кислоты и 0,860 г (4 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 1 н. NaOH, и pH доводят до 6,0.

Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина и смесь встряхивают при 38-40°C в течение ночи. Осадок отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат, получают 0,510 г кристаллов, т. пл. 80-85°C.

Следующие результаты подтверждают, что получили продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-глутамил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1).

Продукт перекристаллизовывают из смеси этилацетата и н-гексана, т. пл. 92-97°C. $[\alpha]_D^{25} = 0,1$ (C = 1, метанол)

Найдено, %: C 63,61; H 6,31; N 6,65
 $C_{23}H_{28}N_2O_7$

Рассчитано, %: C 63,75; H 6,32; N 6,76.

Инфракрасный спектр: 3340 cm^{-1} (колебание растяжения связи N-H); 2950 и 3030 cm^{-1} (колебание растяжения связи C-H); 1730 и 1745 cm^{-1} (C = O сложный эфир); 1690 cm^{-1} (C = O уретан); 1660 cm^{-1} (1-ое амидное поглощение); 1620 cm^{-1} (карбоксилат); 1530 cm^{-1} (2-ое амидное поглощение); 1440 cm^{-1} (C-H деформационное колебание); 1405 cm^{-1} (карбоксилат); 1240 до 1310 cm^{-1} (C-O-C колебание растяжение и 3-е амидное поглощение); 1050 cm^{-1} (колебание фенила в плоскости); 700 и 750 cm^{-1} (колебание фенила вне плоскости).

Спектр ЯМР, δ : (1) 2,0 ppm (2H); (2) 2,3 ppm (2H); (3) 3,0 ppm (4H); (4) 3,6 ppm (3H) и 3,7 ppm (3H); (5) 3,8 ppm (1H); (6) 4,3 ppm (1H); (7) 4,8 ppm (1H); (8) 5,0 ppm (2H); (9)

5,8 ppm (3H); (10) 5,8 ppm (1H); (11) 7,2 ppm (1H); (12) 7,2 ppm (10H); (13) 7,3 ppm (5H).

Эти результаты показывают, что продукт является присоединением формулы I, где R_1 , R_2 , R_3 и n означают бензилоксикарбонил, бензил, метокси и 2 соответственно.

0,100 г продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-глутамил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина добавляют при перемешивании 2,3 мл (0,32 ммоль)

0,14 и HCl, и смесь затем перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Полученный белый осадок отфильтровывают и промывают 3 мл воды, сушат, получают 0,0683 г кристаллов.

Следующие результаты подтверждают, что продукт представляет метиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-глутамил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход 95,8%.

Кристаллы растворяют в этилацетате, и продукт осаждают н-гексаном, т. пл. 97-99°C, $[\alpha]_D^{25} = -11,0$ (C = 1, метанол)

Найдено, %: C 62,63; H 5,94; N 6,24
 $C_{23}H_{28}N_2O_7$

Рассчитано, %: C 62,43; H 5,92; N 6,33.

Инфракрасный спектр: 3300 cm^{-1} (колебание растяжения N-H); 2930 и 3030 cm^{-1} (колебание растяжения C-H); 1735 cm^{-1} (C = O сложный эфир); 1690 cm^{-1} (C = O уретан); 1650 cm^{-1} (1-ое амидное поглощение); 1530 cm^{-1} (2-ое амидное поглощение); 1440 cm^{-1} (колебание деформации C-H); 1220 до 1280 cm^{-1} (колебание растяжения C-O-C и 3-е амидное поглощение); 1050 cm^{-1} (колебание фенила в плоскости) и 695 и 735 cm^{-1} (колебание фенила вне плоскости).

Спектр ЯМР, δ : (1) 2,0 ppm (2H); (2) 2,4 ppm (2H); (3) 3,1 ppm (2H); (4) 3,7 ppm (3H); (5) 4,3 ppm (1H); (6) 4,8 ppm (1H); (7) 5,1 ppm (2H); (8) 5,9 ppm (1H); (9) 7,2 ppm (1H); (10) 7,2 ppm (5H); (11) 7,3 ppm (5H); (12) 8,1 ppm (1H).

Эти результаты показывают, что конечный продукт представляет собой соединение формулы IN, где R_1 , R_2 , R_3 и n означает бензилоксикарбонил, бензил, метокси и 2 соответственно.

Полученный метиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-глутамил-L-фенилала-

нина посредством восстановления водородом превращают в метиловый эфир L-глутамил-L-фенилаланина, и гидролизом его превращают в N-бензилоксикарбонил-L-глутамил-L-фенилаланин.

П р и м е р 28. К раствору 0,686 г (3,12 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина в 25 мл воды при охлаждении льдом добавляют 2 н. NaOH водного раствора при перемешивании, при этом доводят pH до 7,5, затем не прекращая перемешивания, постепенно добавляют 0,360 г (1,44 ммоль) ангидрида N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты, pH поддерживают в пределах 7,0-7,5 посредством добавления 2 н. водного раствора NaOH. Смесь перемешивают в течение 2 ч, к реакционной смеси добавляют 1 н. HCl водный раствор, чтобы довести pH до 6. Полученный осадок отфильтровывают, промывают 50 мл воды, сушат, получают 0,416 г продукта присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-фенилаланина (смесь 86% метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-(C α)-L-фенилаланина и 14% метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-(C β)-L-фенилаланина) и метилового эфира L-фенилаланина (1:1) (т. пл. 103-115°C). В реакционной смеси образуется значительное количество метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-(C β)-L-фенилаланина, но большая часть соединения остается в фильтрате и в промывочной воде.

Полученный продукт присоединения метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-(C α и C β)-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина добавляют к 1,7 мл (0,7 ммоль) 0,4 н. HCl при перемешивании, смесь продолжают перемешивать при комнатной температуре в течение 15 мин. Полученный белый осадок отфильтровывают, промывают 3 мл воды, сушат, получают 0,136 г (выход 96,3%) кристаллов метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина (содержащий 17% N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-(C β)-L-фенилаланина (т. пл. 110-118°C)).

П р и м е р 29. В 30 мл колбе 0,543 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 0,918 г (4 ммоль) хлоргидрата этилового эфира L-фенилаланина растворяют в 5 мл воды, к раствору добавляют 4 н. NaOH,

значение pH доводят до 6. Полученный раствор смешивают с 50 мг термолизина, и смесь встряхивают в течение ночи при 38-40°C. Осадок отфильтровывают, промывают 30 мл воды, сушат, получают 0,913 г кристаллов, т. пл. 85-90°C.

Продукт тождественен с продуктом присоединения этилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и этилового эфира L-фенилаланина (1:1).

После перекристаллизации из смеси этилацетата и n-гексана получают продукт с т. пл. 93-95°C, $[\alpha]_D^{25} = +6,0$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 64,50; H 6,56; N 6,63

C₂₄H₂₄N₂O₅

Рассчитано, %: C 64,23; H 6,50;

N 6,61

Инфракрасный спектр: 3300 см⁻¹ (колебание растяжения связи N-H); 2900 до 3050 см⁻¹ (колебание растяжения C-H); 1710 и 1740 см⁻¹ (C = O сложный эфир и C = O уретан); 1640 см⁻¹ (1-ое амидное поглощение); 1585 см⁻¹ (карбоксилат); 1520 см⁻¹ (2-е амидное поглощение); 1440 см⁻¹ (деформационное колебание C-H); 1380 см⁻¹ (карбоксилат); 1200, 1270 см⁻¹ (колебание растяжения C-O-C и 3-е амидное поглощение); 1055 см⁻¹ (колебание фенила в плоскости); 700, 730 и 750 см (колебание фенила вне плоскости).

Спектр ЯМР, δ : (1) 1,1 ppm (6H); (2) 2,7 ppm (2H); (3) 3,0 ppm (4H); (4) 4,0 ppm (4H); (5) 4,1 ppm (1H); (6) 4,5 ppm (1H); (7) 4,7 ppm (1H); (8) 5,0 ppm (2H); (9) 6,2 ppm (1H); (10) 6,7 ppm (3H); (11) 7,2 ppm (1H); (12) 7,2 ppm (10H); (13) 7,3 ppm (5H).

Эти результаты показывают, что продукт является продуктом присоединения формулы I, где R₁, R₂, R₃ и n означают бензилоксикарбонил, бензил, этокси и 1.

В 30 мл колбе 0,125 г (0,197 ммоль) полученного продукта присоединения этилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и этилового эфира L-фенилаланина смешивают 2 мл воды и 0,24 мл 1н. HCl (0,24 ммоль) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученную суспензию фильтруют, осадок промывают 5 мл воды, сушат, получают 0,0807 г кристаллов этилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина. Чистота 100%; выход

92,6%. Кристаллы перекристаллизовывают из смеси этилацетата и н-гексана, получают продукт с т. пл. 128-135°C, $[\alpha]_D^{25} = -17,3$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 62,82; H 5,96; N 6,40

$C_{23}H_{35}N_2O$

Рассчитано, %: C 62,43; H 5,92;

N 6,33.

Инфракрасный спектр: 3300 cm^{-1} ; от 2900 до 3100 cm^{-1} ; 1730 cm^{-1} ; 1690 cm^{-1} ; 1655 cm^{-1} ; 1530 cm^{-1} ; 1440 cm^{-1} ; 1200-1280 cm^{-1} ; 1030 cm^{-1} ; 690 cm^{-1} ; 740 cm^{-1} .

Спектр ЯМР, δ : 1,1 ppm; 2,8 ppm; 3,0 ppm; 4,1 ppm; 4,6 ppm; 4,8 ppm; 5,1 ppm; 6,0 ppm; 7,1 ppm; 7,3 ppm; 9,6 ppm.

Пример 30. 5,00 г (16,82 ммоль) N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 7,26 г (33,64 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина загружают в 100 мл колбу и добавляют 1н. NaOH, pH раствора 6,0. Полученный раствор смешивают с 2,0 г термолитина и с 0,4 г картофельного ингибитора, смесь встряхивают при 38-40°C в течение 5 ч. Осадок отфильтровывают, промывают 100 мл воды, сушат, получают 8,11 г кристаллов, имеющих т.пл. 88-92°C. Выход 75,6% в виде продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира фенилаланина (1:1). После перекристаллизации из смеси этилацетата и н-гексана физические характеристики и результаты элементарного анализа, аналогичны продукту присоединения, полученного в примере 26.

0,3 г продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина растворяют в 3 мл ацетона, к раствору добавляют 2 мл 2,4 н. HCl, реакцию проводят при 60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь смешивают с водой, 1,2 н. водным раствором $NaHCO_3$ и циклогексаном, добавленным в качестве внутреннего стандарта. Методом высокоскоростной жидкостной хроматографии подтверждено получение метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина. Выход 72,1%.

Пример 31. 0,3 продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина

токсикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, полученного в примере 30, разлагают и анализируют согласно примеру 30, но вместо ацетона используют диоксан.

Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 73,0%.

Пример 32. Аналогичен примеру 31 но используют метанол вместо диоксана. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 63,3%.

Пример 33. Аналогичен примеру 31, но используют вместо диоксана N,N-диметилформамид. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 28,1%.

Пример 34. Аналогичен примеру 31, но в качестве нейтрализующего агента используют 4 мл диоксана, 1 мл диоксанового раствора 5,3 н. HCl и триэтиламин вместо 3 мл диоксана, 2 мл 2,4 н. HCl и 1,2 н. водного раствора $NaHCO_3$, соответственно. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 98,6%.

Пример 35. Аналогичен примеру 34, но реакцию проводят при 90°C в течение 20 мин (вместо 60°C в течение 1 ч). Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 88,5%.

Пример 36. Аналогичен примеру 34, но используют 4,5 диоксана и 0,5 мл диоксанового раствора 5,3 н. HCl вместо 4 мл и 1 мл вышеуказанных веществ соответственно, а также проводят реакцию при 90 вместо 60°C. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 84,4%.

Пример 37. Аналогичен примеру 34, но используют 3 мл диоксана и 2 мл диоксанового раствора 5,3 н. HCl вместо 4 мл и 1 мл указанных веществ соответственно, а также проводят реакцию при 30°C в течение 120 мин вместо 60°C в течение 1 ч. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина 98,6%.

Пример 38. Аналогичен примеру 34, но используют 4,5 мл диоксана и 0,5 мл 60% хлорной кислоты вместо 4 мл диоксана и 1 мл диоксанового раствора 5,3 н. HCl соответственно. Выход метилового эфира L-L-аспартил-L-фенилаланина.

Пример 39. Аналогичен примеру 34, но используют 4,85 мл диоксана и 0,15 мл концентрированной серной кислоты вместо 4 мл диоксана и 1 мл

диоксанового раствора 5,3 н.НС₂. Выход метилового эфира Δ -L-аспартил-L-фенилаланина.

Пример 40. 0,3 г продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1), полученного в примере 30, растворяют в 2 мл диоксана и добавляют 3 мл трифторуксусной кислоты. Реакцию проводят при 60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь упаривают под пониженным давлением, а затем к части этого вещества добавляют воду, триэтиламин и циклогексанон в качестве внутреннего стандарта, полученный образец анализируют высокоскоростной жидкостной хроматографией. Выход метилового эфира Δ -L-аспартил-L-фенилаланина 96,4%.

Пример 41. Смесь 1,000 г продукта присоединения метилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1), полученного в примере 30, 14 мл диоксана и 4 мл диоксанового раствора (5,3 н.НС₂), загружают в 650 мл колбу и перемешивают при 60°C в течение 1 ч. Диоксан отгоняют из реакционной смеси при пониженном давлении, добавляют 6 мл воды и 20 мл диэтилового эфира к оставшемуся маслянистому продукту, перемешивают, смесь разделяют на две фазы. К водной фазе добавляют 10 мл диэтилового эфира, продукт экстрагируют трижды таким же образом. Эфирные экстракты объединяют, дважды промывают 5 мл 5%-ного водного раствора бикарбоната натрия и сушат над безводным сульфатом магния. Эфир отгоняют при пониженном давлении, получают 0,176 г (выход 81,2%) неочищенного анисового спирта. Водную фазу нейтрализуют 7%-ным водным раствором гидрата окиси до pH 6, выдерживают примерно при 5°C в течение ночи. Полученные кристаллы отфильтровывают и промывают 2 мл воды, сушат, получают 0,316 г (выход 68,5%) неочищенного метилового эфира L-аспартил-L-фенилаланина. Маточник и водные промывки объединяют и подщелачивают 7%-ным водным раствором гидрата окиси натрия до pH, продукт экстрагируют дихлорметаном (3 x 15 мл), объединенные экстракты промывают 5 мл воды, сушат над безводным сульфатом магния. Дихлорметан отгоняют при пониженном

давлении, получают 0,234 г (выход 83,4%) неочищенного метилового эфира L-фенилаланина.

Пример 42. 1,189 г (4 ммоль) N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 1,837 г (8 ммоль) хлоргидрата этилового эфира L-фенилаланина растворяют в 1 н. водном растворе NaOH, pH 6,0. Доводят объем реакционной смеси водой до 15 мл. Полученный раствор смешивают с 100 мг термолизина. Смесь перемешивают при 38-40°C в течение 7 ч.

Осадок отфильтровывают, промывают 30 мл воды, сушат, получают 2,401 г (выход 90,2%) продукта присоединения этилового эфира N-P-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и этилового эфира L-фенилаланина (1:1); что подтверждено нижеприведенными результатами анализа.

Продукт перекристаллизовывают из смеси метанола и эфира. Т. пл. 82-87°C. $[\alpha]_D^{25} = +6,0$ (C = 1, метанол).
Найдено, %: C 63,52; H 6,57; N 6,54
 $C_{35}H_{43}N_3O_{10}$
Рассчитано, %: C 63,14; H 6,51; N 6,31.

Спектры инфракрасного поглощения и ЯМР дают следующие характеристические максимумы.

Инфракрасный спектр: 3300 см⁻¹ (колебание растяжения N-H); от 2900 до 3050 см⁻¹ (колебание растяжения C-H); 1720, 1730 и 1740 (C=O сложные эфиры и уретан); 1650 см⁻¹ (1-ое амидное поглощение); от 1510 до 1540 см⁻¹ (2-ое амидное поглощение); 1440 см⁻¹ (деформационное колебание C-H); 1390 см⁻¹ (карбоксилат); от 1220 до 1280 см⁻¹ (C-O-C растяжение и 3-е амидное поглощение); 1030 см⁻¹ (деформация фенила в плоскости); и 690, 760 и 810 см⁻¹ (колебание фенила вне плоскости).

Спектр ЯМР, δ : (1) 1,2 ppm (6H); (2) 2,7 ppm (2H); (3) 3,1 ppm (4H); (4) 3,8 ppm (3H); (5) 4,0 ppm (4H); (6) 4,1 ppm (1H); (7) 4,5 ppm (1H); (8) 4,7 ppm (1H); (9) 5,0 ppm (1H); (10) 5,5 ppm (4H); (11) 6,1 ppm (1H); (12) 6,8-7,4 ppm (14H).

Результаты показывают, что продукт представляет собой присоединение формулы (I), где R₁, R₂, R₃ и n означает p-метоксибензилоксикарбонил, бензил, этокси и 1, соответственно.

Повторяют процесс аналогично примеру 34, но используют полученный про-

дукт присоединения вместо продукта присоединения метилового эфира N-р-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина, получают этиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина. Выход этилового эфира L-аспартил-L-фенилаланина 95,5%.

Пример 43. 1,189 г (4 ммоль) N-р-метоксибензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 1,725 г (8 ммоль) хлоргидрата метилового эфира DL-фенилаланина загружают в 30 мл колбу и растворяют при добавлении 1 н. водного раствора NaOH; pH 6,0. Раствор разбавляют водой до 15 мл. Полученный раствор смешивают с 0,1 г термолизина, и смесь перемешивают при 38-40°C в течение 50 мин. Осадок отфильтровывают, промывают 30 мл воды и сушат, получают 2,109 г кристаллов, имеющих т. пл. 119-123°C, затем перекристаллизовывают продукт из смеси этилацетата и n-гексана, высушивают при 80°C в течение 7 ч при пониженном давлении. Подтверждено, что соединение - продукт присоединения метилового эфира N-р-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина (1:1) полугидрата. Т. пл. 131-138°C, $[\alpha]_D^{25} = -4,2$ (C = 1, метанол).

Найдено, %: C 61,50; H 6,12; N 6,49

$C_{33}H_{33}N_3O_{10} \cdot 1/2 H_2O$

Рассчитано, %: C 61,29; H 6,23; N 6,50.

Спектры инфракрасного поглощения и ЯМР дали те же характеристические особенности, что и в продукте присоединения формулы I, полученном в примере 26, где R₁, R₂, R₃ и n означали р-метоксибензилоксикарбонил, бензил, метокси и 1 соответственно, за тем исключением, что поглощения, вызванные протонами воды и групп -NH- и NH₂ - сдвигались на 4,1 ppm из-за возмущения, обусловленного наличием воды, поскольку продукт включал кристаллизационную воду, как указано ниже. Навеску 1,5024 г продукта нагревают микроволновым излучением в течение 12 мин в микроволновой печи при частоте 2,45 ГГц и мощности 1,2 кВт, чтобы высушить образец, вес которого уменьшился до 1,48152 г после облучения (потеря при сушке 0,02091 г).

Элементарный анализ облученного образца дал следующие результаты:

Найдено, %: C 62,07; H 6,17; N 6,69

$C_{33}H_{33}N_3O_{10}$ (%)

Рассчитано, C 62,15; H 6,16;

N 6,69.

Спектры инфракрасного поглощения и ЯМР облученного образца дали те же характерные особенности, что и в продукте присоединения формулы I, полученном в примере 26.

Навеску 1,0 г облученного образца смешивают с 4 мл воды и 2 мл 1 н. HCl, затем полученную смесь перемешивают при 60°C в течение 3 мин. Фильтруют, вводят метиловый эфир N-р-метоксибензилоксикарбонил-L-фенилаланина и метиловый эфир D-фенилаланина в молярном отношении 1:1 из твердой фазы и из жидкой фазы, соответственно.

Повторяют способ аналогичный примеру 34, но используют 0,3 г полученного продукта присоединения (полугидрат вместо продукта присоединения, полученного в примере 30). Выход метилового эфира L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина 95,9%.

Пример 44. 0,3 продукта присоединения метилового эфира N-р-метоксибензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина (1:1), полученного в примере 30, растворяют в 10 мл раствора 0,31 н. HCl в хлороформе, реакцию проводят при 60°C в течение 2 ч. Реакционную смесь упаривают при пониженном давлении, к остатку добавляют воду, триэтиламин и циклогексанон в качестве внутреннего стандарта, образец анализируют высокоскоростной жидкостной хроматографией. Выход метилового эфира L-аспартил-L-фенилаланина 94,3%.

Пример 45. 53,4 г N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и 107,8 г (0,5 моль) хлористоводородного метилового эфира фенилаланина помещают в 1-литровую колбу и добавляют к смеси 300 мл водного раствора едкого натрия для их растворения и для доведения pH до 6,4. Добавляют к реакционной массе 0,3 г термоазы и 0,26 г моногидрата ацетата кальция, полученный раствор оставляют при 20°C на 218 ч, при этом в осадок выпадает полученное в результате реакции аддитивное соединение метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспарагил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина. Осадок отфильтровывают,

промывают водой, высушивают. Скоростной жидкостной хроматографией показывают, что выход продукта 92,7%, считая на взятую N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту.

Пример 46. Процесс и анализ продукта реакции проводят аналогично примеру 45, но используют 161,8 г (0,75 моль) хлористоводородного метилового эфира D-фенилаланина, 500 мл раствора едкого натрия, pH 6,7, 1,0 г термоазы и 0,88 г моногидрата ацетата кальция, вместо соответственно 107,8 г, 6,4, 0,3 г и 0,26 г при 25°C в течение 100 ч, вместо 20°C и 218 ч. Выход 93,3%, считая на взятую N-бензилоксикарбонил-L-аспарагиновую кислоту.

Пример 47. Процесс проводят в условиях примера 45, но используют 149,2 г (0,65 ммоль) метилового эфира DL-фенилаланина гидрохлорида, 500 мл водного раствора гидроокиси натрия, pH 6,6, 0,7 г термоазы и 0,62 г ацетата кальция моногидрата вместо 107,8 г, 300 мл, 6,4, 0,3 г и 0,26 г, соответственно, при 13°C в течение 195 ч вместо 20°C и 218 ч. Выход 90,9% исходя из N-бензилоксикарбонила-L-аспартата.

Пример 48. 0,534 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспартата и 0,863 г (4 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина гидрохлорида помещают в 30 мл колбу и туда же добавляют 7 мл гидроокиси аммония для растворения и доведения pH раствора до 6,0. В раствор вводят 50 мг термолизина. Раствор перемешивают при 60°C в течение 2 ч до выпадения продукта присоединения из метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина. Большое количество воды добавляют в реакционную смесь, содержащую выпавшие кристаллы примесного соединения для их растворения. Полученный в результате этого гомогенный раствор анализируют с помощью высокоскоростной жидкостной хроматографии; выход примесных соединений 54%.

Пример 49. 0,534 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспартата и 0,853 г (4 ммоль) метилового эфира DL-фенилаланина гидрохлорида помеща-

ют в 30 мл колбу и туда же добавляют 5 мл воды вместе с триэтиламинем для растворения и доведения pH до 5,0. В раствор вводят 50 мг термолизина. Раствор перемешивают при 33-40°C в течение 16 ч. Выпавшие кристаллы продукта присоединения, состоящего из метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира D-фенилаланина, отделяют фильтрацией, сушат. Получают 0,836 г кристаллов, т. пл. 96-113°C.

Пример 50. 0,534 г (2 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспартата и 0,863 г (4 ммоль) метилового эфира DL-фенилаланина гидрохлорида помещают в 30 мл колбу и туда же добавляют 6 мл аммиачной воды для растворения и доведения pH до 7,2. В раствор вводят 50 мг термолизина и перемешивают при 38-40°C в течение 4,5 ч. Выпавшие кристаллы продукта присоединения, состоящего из метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира DL-фенилаланина, отфильтровывают и сушат. Получают 0,630 г кристаллов. Выход 51,8%.

Пример 51. 10,7 г (40 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-аспартата и 28,0 г (130 ммоль) метилового эфира L-фенилаланина гидрохлорида помещают в 200 мл колбу и туда же добавляют 10 мл водного раствора гидроокиси натрия для растворения и доведения pH до 6,6. В раствор вводят 32 мг термолизина. Раствор выдерживают до выпадения кристаллов продукта присоединения, состоящего из метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина и метилового эфира L-фенилаланина. Полученные кристаллы отфильтровывают и сушат. Высокоскоростная хроматография показала выход 82,5%, исходя из N-бензилоксикарбонил-L-аспартата.

Пример 52. Процесс проводят в условиях примера 49, но используют 15 мл аммиачной воды вместо воды и триэтиламина, pH раствора доводят до 6,0 вместо 5,0. Получают 0,800 г примесных соединений. Выход 65,8%.

Изобретение иллюстрируется табл. 1 и 2.

Т а б л и ц а 1

Пример, %	Изомерия продукта	Т. пл. продукта	
		До очистки, °C	После очистки, °C
1	LL-L	117-120	120-124
2	LL-L	104-113	-
3	LL-L	116-119	-
5	LL-L	123-125	-
6	LL-L	119-123	-
7	LL-L	-	120-126
9	LL-L	115-124	-
10	LL-L	118-124	-
12	LL-L	106-118	-
13	LL-L	113-116	-
14	LL-L	103-112	-
15	LL-L	105-117	-
16	LL-D	104-108	127-135
17	LL-L	105-110	121-125
18	LL-D	105-111	126-134
19	LL-L	117-120	120-124
21	LL-D	120-126	128-134
49	LL-D	96-113	-

Т а б л и ц а 2

При- мер, №	Количе- ство λ-за- мещенных моноами- нодикарбо- новых кис- лот (ммоль)	Количе- ство эфи- ров ами- но кислот, (ммоль)	Количество фер- мента, мг	Объем ра- створа, мл	pH раст- вора ре- акции	Отношение фер- мента к субст- рату мг/ммоль		Концентрация суб- страта моль/л		Отношение N- замещенных мо- ноаминодикар- боновых кислот к эфирам ами- но кислот	Температура реакции, °C
						Титр N- замещен- ных моно- аминоди- карбоно- вых кис- лот	Титр эфиров амино- кислот	λ-замещен- ные моно- аминоди- карбоновые кислоты	Эфиры амино- кислот		
1	5	5	б) Термолизин								
			50	20+2*	6	10	10	0,227	0,227	1 : 1	38-40
2	5	5	50	10+2*	6	10	10	0,417	0,417	1 : 1	38-40
3	2	4	50	10+1*	6	25	12,5	0,182	0,364	1 : 2	38-40
4	2	4	50	8+1*	6,2	25	12,5	0,222	0,444	1 : 2	38-40
5	1	3	а) Термоаза								
			100	5	7,0	100	33,3	0,200	0,600	1 : 3	38
6	1	2	а) Тациназа								
			100	5	7,0	100	50	0,200	0,400	1 : 2	38
7	5	5	б) Термолизин								
			20	4	6,8	4	4	1,25	1,25	1 : 1	38-40
8	5	5	20	4	5,2	4	4	1,25	1,25	1 : 1	38-40
9	0,5	0,5	а) Термоаза								
			50	2,5	7,0	100	100	0,200	0,200	1 : 1	38
10	0,5	0,5	50	2,5	7,0	100	100	0,200	0,200	1 : 1	38
11	2	4	б) Термолизин								
			50	8	6,5	25	12,5	0,250	0,500	1 : 1	38
12	2	4	50	7,5	7	25	12,5	0,267	0,533	1 : 2	38-40
13	2	4	а) Термоаза								
			100	7	6	50	25	0,286	0,571	1 : 2	38-40
14	1	2	50	4	6	50	25	0,250	0,500	1 : 2	38-40
15	1	2	50	4	5	50	25	0,250	0,500	1 : 2	38-40
16	2	4	б) Термолизин								
			50	7	6,2	25	12,5	0,285	0,571	1 : 2	38-40
17	10 - 4	4	50	2+1,5*	6	12,5	12,5	1,143	1,143	1 : 2	38-40

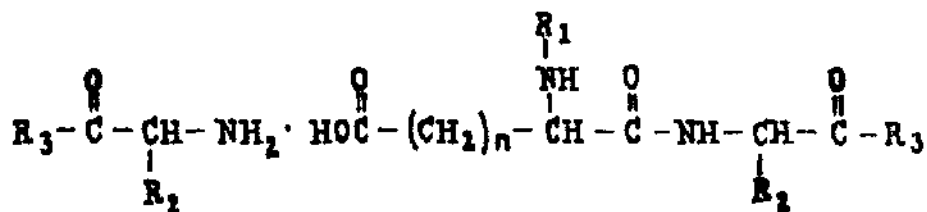
Продолжение табл. 2

При- мер, №	Количе- ство N-за- мещенных моноами- нодикарбо- новых кис- лот (ммоль)	Количе- ство эфи- ров ами- но кислот, (ммоль)	Количество фер- мента, мг	Объем ра- створа, мл	pH раст- вора ре- акции	Отношение фер- мента к субст- рату мг/ммоль		Концентрация суб- страта моль/л		Отношение N- замещенных мо- ноаминодикар- боновых кислот к эфирам ами- но кислот	Температура реакции, °C
						Титр N- замещен- ных моно- аминоди- карбоно- вых кис- лот	Титр эфиров амино- кислот	N-замещен- ные моно- аминоди- карбоновые кислоты	Эфиры амино- кислот		
18	DL - 4	DL - 4	50	21 1,5*	6	12,5	12,5	1,143	1,143	1 : 2	38-40
19	20	42	200	70	6,2-6,3	10	4,76	0,286	0,600	1 : 2,1	38-40
21	2	DL - 4	50	10+1*	6,0	25	12,5	0,182	0,364	1 : 2	38-40
26	2	4	50	4	5	25	12,5	0,500	1,00	1 : 2	38-40
27	2	4	50	4	6	25	12,5	0,500	1,00	1 : 2	38-40
29	2	4	50	6	6	25	12,5	0,333	0,667	1 : 2	38-40
30	16,32	33,64	200	34	6	11,9	5,9	0,495	0,989	1 : 2	38-40
42	4	8	100	15	6	25	12,5	0,267	0,533	1 : 2	38-40
43	4	DL - 8	100	15	6	25	12,5	0,267	0,533	1 : 2	38-40
45	200	DL-650	500	300	6,4	2,5	0,77	0,667	2,167	1 : 3,25	20
46	200	DL-750	1000	500	6,7	5	1,33	0,400	1,500	1 : 3,75	25
47	200	DL-650	700	500	6,6	3,5	1,08	0,400	1,300	1 : 3,25	13
48	2	4	50	7	6,0	25	12,5	0,286	0,571	1 : 2	60
49	2	DL - 4	50	5	5,0	25	12,5	0,400	0,800	1 : 2	38-40
50	2	DL - 4	50	6	7,2	25	12,5	0,333	0,667	1 : 2	38-40
51	40	130	32	100	6,6	0,8	4,1	0,400	1,300	1-3,25	30
52	2	DL - 4	50	15	6	25	12,5	0,133	0,267	1 : 2	38-40

* Объем добавленного агента регулируется величиной pH. Добавление агента описано в специфике, а количество не описано.

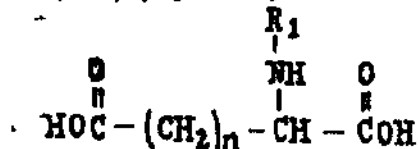
Формула изобретения
Способ получения продуктов присое-

динения дипептидного производного и
аминокислоты общей формулы I

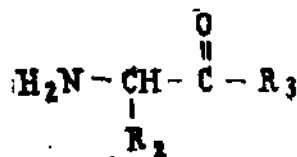


где R_1 — бензилоксикарбонил, n -метоксибензилоксикарбонил;
 R_2 — бензил;
 R_3 — метокси, этокси-группы;
 n — 1 или 2,

отличающийся тем, что
N-замещенную аминодикарбоновую кислоту общей формулы II,



где значения R_1 и n указаны выше,
подвергают взаимодействию со сложным
эфиром аминокислоты общей
формулы III



где значения R_2 и R_3 указаны выше,
при молярном соотношении соединений
формулы II и III 1:1 — 1:3,75, в вод-
ной среде, в присутствии металлопро-
теазы при pH 5,0-7,2, температуре
10-90 °C.

Источники информации,
принятые во внимание при экспертизе
1. Josef S. Fruton Advances in
Protein chemistry, Academic Press,
Inc. New York, N. Y. 1949, vol. 5,
с. 33.

Составитель В. Волкова

Редактор И. Ковальчук

Техред З. Фанта

Корректор Г. Решетник

Заказ 3734

Тираж 448

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4