

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 602**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

C07C 319/20 (2006.01)

C07D 241/08 (2006.01)

C07C 319/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2009 E 09737390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2348881**

54 Título: **Preparación y utilización de metionil-metionina como un aditivo para piensos para peces y crustáceos**

30 Prioridad:

17.10.2008 DE 102008042932

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.01.2014

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**KOBLER, CHRISTOPH;
HÄUSSNER, THOMAS y
WECKBECKER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 437 602 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación y utilización de metionil-metionina como un aditivo para piensos para peces y crustáceos

5 **Introducción**

El presente invento se refiere a unas nuevas síntesis químicas de metionil-metionina, que es el dipéptido de metionina, y a su utilización especial como un aditivo para piensos a solas o en mezcla con metionina para la nutrición de peces y crustáceos.

10

Estado de la técnica

Los aminoácidos esenciales (EAA), tales como metionina, lisina o treonina, son como aditivos para piensos unos componentes muy importantes de la nutrición de animales, y desempeñan un cometido importante en el caso de la crianza económica de animales útiles tales como p.ej. gallinas, cerdos y ruminantes. La suplementación con EAAs de unas fuentes naturales de proteínas tales como p.ej. plantas de soja, maíz y trigo, hace posible, por un lado, un crecimiento más rápido de los animales o respectivamente una producción más alta de leche en el caso de vacas lecheras de alto rendimiento, pero, por otro lado, también un aprovechamiento más eficiente del pienso. Esto constituye una ventaja económica muy grande. Los mercados para los aditivos para piensos presentan una gran importancia industrial y económica. Además, ellos constituyen unos fuertes mercados en crecimiento, lo que se debe de atribuir no en último término a la importancia creciente de países tales como, por ejemplo, China e India.

15

20

25

30

35

40

45

La L-metionina (el (S)-ácido 2-amino-4-metil-tiobutírico) constituye el primer aminoácido limitador para muchas especies de animales tales como gallinas, patos, pavos y también para muchas especies de peces y crustáceos, y ella desempeña, por lo tanto, un cometido muy importante en la nutrición de animales y como aditivo para piensos (véanse las citas bibliográficas de Rosenberg y colaboradores, J. Agr. Food Chem. 1957, 5, 694-700 y Lovell, T. R., J. Anim. Sci. 1991, 69, 4193-4200). En el caso de la clásica síntesis química, la metionina resulta no obstante en forma de un racemato, a saber una mezcla 50:50 de D- y L-metionina. Esta DL-metionina racémica, se puede emplear no obstante directamente como un aditivo para piensos, puesto que en el caso de algunas especies de animales, en unas condiciones *in vivo*, existe un mecanismo de transformación, que transforma al enantiómero D no natural de la metionina en el enantiómero L natural. En este caso, la D-metionina es desaminada primeramente con ayuda de una D-oxidasa inespecífica para dar la α -ceto-metionina, y a continuación ésta es transformada ulteriormente con una L-transaminasa para dar la L-metionina (Baker D.H. en "Amino acids in farm animal nutrition (Aminoácidos en la nutrición de animales de granja)", D'Mello, J.P.F. (coordinador de edición), Wallingford (Reino Unido), CAB International, 1994, 37-61). De esta manera se aumenta la cantidad disponible de L-metionina en el organismo, que luego puede ser puesta a disposición del animal para el crecimiento. La transformación enzimática de D- en L-metionina se comprobó en el caso de gallinas, cerdos y vacas, pero en particular también en el caso de peces carní- y omnívoros y también en el caso de camarones y gambas. Así, por ejemplo, Sveier y colaboradores (Aquacult. Nutr. 2001, 7 (3), 169-181) y Kim y colaboradores (Aquaculture 1992, 101 (1-2), 95-103) pudieron mostrar que es posible realizar la transformación de D- en L-metionina en el caso de salmones del Océano atlántico y de truchas arcoíris. Lo mismo pudieron mostrar Robinson y colaboradores (J. Nutr. 1978, 108 (12), 1932-1936) y Schwarz y colaboradores (Aquaculture 1998, 161, 121-129) para especies de peces omnívoros, tales como, por ejemplo, peces gatos (en inglés "Cattfish") y carpas. Además de esto, Forster y Dominy (J. World Aquacult. Soc. 2006, 37 (4), 474-480) pudieron mostrar, en unos ensayos de alimentación de camarones omnívoros de la especie *Litopenaeus vannamei*, que la DL-metionina posee la misma actividad que la L-metionina.

50

55

60

En el año 2007 se produjeron directamente en todo el mundo más de 700.000 t de DL-metionina cristalina o respectivamente de un compuesto análogo a metionina hidroxilado líquido racémico (MHA, rac-ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanoico (HMB)) y un calcio-MHA sólido, y se emplearon directamente con éxito como un aditivo para piensos en el caso de unos animales monogástricos tales como p.ej. aves de corral y cerdos. Debido al vertiginoso desarrollo económico de la crianza de peces y crustáceos en cultivos acuáticos altamente industrializados, una posibilidad óptima, económica y eficiente de suplementación de metionina, precisamente en este sector, en los últimos años, desempeña un cometido cada vez más importante (Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO) Fisheries Department "State of World Aquaculture 2006 (Estado de los cultivos acuáticos en el mundo)", 2006, Roma. International Food Policy Research Institute (IFPRI) "Fish 2020: Supply and Demand in Changing Markets (Peces 2020: abastecimiento y demanda en unos mercados cambiantes)", 2003, Washington, D.C. En este caso, sin embargo, al contrario que con las gallinas y los cerdos, en el caso de la utilización de metionina, MHA o Ca-MHA como un aditivo para piensos, en el caso de determinadas especies de peces y crustáceos pueden aparecer diversos problemas. Así, Rumsey y Ketola (J. Fish. Res. Bd. Can. 1975, 32, 422-426), informan de que la utilización de harina de soja en conexión con unos aminoácidos cristalinos, suplementados individualmente, no condujo a ningún aumento del crecimiento en el caso de las truchas arcoíris. Murai y colaboradores (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1984, 50 (11), 1957) pudieron mostrar que la alimentación diaria de dietas para peces con unas altas tasas de aminoácidos cristalinos suplementados en el caso de las carpas dio lugar a que más de un 40 % de los aminoácidos libres fuese segregado a través de las branquias y los riñones. Debido a

la rápida resorción de aminoácidos suplementados poco después de la ingestión de los piensos, se llega a un muy rápido aumento de la concentración de aminoácidos en el plasma sanguíneo del pez (respuesta rápida, en inglés "Fast-Response"). En este momento, sin embargo, los otros aminoácidos procedentes de las fuentes proteínicas naturales, tales como p.ej. una harina de soja, todavía no se encuentran en el plasma, lo que puede conducir a un asincronismo de la disponibilidad simultánea de todos los aminoácidos importantes. Una parte de los aminoácidos altamente concentrados es metabolizada, como consecuencia de esto, rápidamente en el organismo y es aprovechada p.ej. como una fuente pura de energía. De esta manera, en el caso de las carpas solamente se llega a un pequeño o respectivamente a ningún aumento del crecimiento en el caso de la utilización de aminoácidos cristalinos como aditivos para piensos (Aoe y colaboradores, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1970, 36, 407-413). En el caso de los crustáceos, la suplementación de aminoácidos cristalinos puede conducir todavía a otros problemas. Por medio del lento comportamiento de comida de determinados crustáceos, tales como p.ej. los camarones de la especie *Litopenaeus Vannamei*, debido al largo período de tiempo de permanencia del pienso bajo el agua, se llega al desprendimiento de los aminoácidos solubles en agua suplementados (en inglés "Leaching" =lixiviación), lo que da lugar a la eutrofización de las aguas y no a un aumento del crecimiento de los animales (Alam y colaboradores, Aquaculture 2005, 248, 13-16).

El abastecimiento eficaz de peces y crustáceos, que son criados en cultivos acuáticos, exige para determinadas/os especies y usos, una forma especial como producto de la metionina tal como p.ej. una metionina protegida química o físicamente de un modo correspondiente. En este caso, el objetivo es, por una parte, que el producto permanezca suficientemente estable durante la nutrición en el entorno acuático y que no se desprenda desde el pienso. Por otra parte, el objetivo consiste en que el producto de metionina, que es ingerido finalmente por el animal, pueda ser aprovechado óptimamente en el organismo animal y con una alta eficiencia.

En el pasado se emprendieron muchos esfuerzos para desarrollar unos adecuados aditivos para piensos, en particular constituidos sobre la base de la metionina, para peces y crustáceos. Así, por ejemplo, en el documento de solicitud de patente internacional WO 8906497 se describe la utilización de ciertos di- y tripéptidos como un aditivo para piensos para peces y crustáceos. De esta manera se debe de favorecer el crecimiento de los animales. Sin embargo, en este caso pasaron a emplearse de manera preferida unos di- y tripéptidos constituidos a base de aminoácidos no esenciales y, por lo tanto, tampoco limitadores, tales como p.ej. glicina, alanina y serina. Como dipéptidos que contienen metionina, de han descrito solamente DL-alanil-DL-metionina y DL-metionil-DL-glicina. De esta manera, en el dipéptido sólo está contenido de manera efectiva un 50 % de la sustancia activa (mol/mol), lo que se ha de considerar como muy desventajoso desde puntos de vista económicos. En el documento WO 02088667 se describen la síntesis enantioselectiva y el uso de unos oligómeros a base de MHA y ciertos aminoácidos, tales como p.ej. metionina, como aditivos para piensos, entre otros animales, también para peces y crustáceos. De esta manera se debe de conseguir un crecimiento más rápido. Los oligómeros descritos son constituidos por medio de una reacción catalizada por enzimas y tienen una distribución muy amplia de las cadenas de las cadenas de los oligómeros individuales. De esta manera, el procedimiento se vuelve no selectivo, caro y complicado en lo que respecta a la realización y la purificación. Dabrowski y colaboradores describen en el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 20030099689 la utilización de péptidos sintéticos como aditivos para piensos destinados al fomento del crecimiento de animales acuáticos. En este caso, los péptidos pueden constituir una proporción ponderal de 6-50 % de la formulación total de pienso. Los péptidos sintéticos se componen de manera preferida a base de aminoácidos esenciales y limitadores. La síntesis de tales oligo- y polipéptidos sintéticos es, sin embargo, muy complicada, cara y difícil de realizar a gran escala técnica. Además, la eficacia de los polipéptidos de un aminoácido individual es controvertida, puesto que éstos, con frecuencia, son convertidos químicamente sólo de una manera muy lenta, o incluso no son convertidos en absoluto, en unas condiciones fisiológicas, en aminoácidos libres. Así, por ejemplo, Baker y colaboradores (J. Nutr., 1982, 112, 1.130-1.132), describen que una poli-L-metionina, debido a su absoluta insolubilidad en agua, no tiene ningún valor biológico en el caso de las gallinas, puesto que no es posible una resorción por el organismo.

Junto al empleo de unos nuevos derivados químicos de metionina tales como p.ej. péptidos y oligómeros que contienen metionina, se investigaron también diferentes posibilidades físicas de protección tales como p.ej. unos revestimientos o respectivamente el embebimiento de un aminoácido en una matriz protectora. Así, por ejemplo, Alam y colaboradores (Aquacult. Nutr. 2004, 10, 309-316 y Aquaculture 2005, 248, 13-19) mostraron que una metionina y una lisina revestidas, al contrario que las no revestidas, tienen una influencia muy positiva sobre el crecimiento de camarones Kuruma jóvenes. A pesar de que la utilización de un revestimiento especial pudo reprimir la lixiviación de metionina y lisina desde los gránulos de pienso, existen algunas desventajas agravantes. La preparación o respectivamente el revestimiento de la metionina constituye en la mayoría de los casos un procedimiento técnicamente complicado y costoso, y es por lo tanto cara/o. Además, el revestimiento superficial de la metionina terminada de revestir puede ser dañado fácilmente por una carga y una abrasión mecánicas durante la elaboración de los piensos, lo que puede conducir a la disminución o respectivamente a la pérdida completa de la protección física. A esto se agrega el hecho de que mediante un revestimiento o una utilización de una sustancia de matriz, el contenido de metionina es disminuido, y por consiguiente, frecuentemente se vuelve antieconómico.

5 Junto al nuevo uso conforme al invento de DL-metionil-DL-metionina como un aditivo para piensos con un pequeño comportamiento de lixiviación a partir de gránulos o materiales extrudidos de piensos, así como junto a un óptimo abastecimiento con metionina en el organismo mediante un desdoblamiento con liberación lenta (en inglés "slow release") de metionil-metionina, se pudieron desarrollar también unos nuevos procedimientos para la preparación de metionil-metionina, que poseen muchas ventajas frente a las variantes de preparación descritas en la bibliografía. La mayoría de las síntesis de dipéptidos, conocidas a partir de la bibliografía, utilizan unos grupos protectores caros tales como p.ej. los grupos protectores Boc (terc.-butoxicarbonilo) o Z (benciloxicarbonilo), que deben de ser colocados junto al correspondiente aminoácido antes de la síntesis propiamente dicha del dipéptido, y que posteriormente deben de ser separados de nuevo. Además de esto, en la mayoría de los casos es necesaria una activación de los aminoácidos que deben de ser acoplados. Así, se puede preparar metionil-metionina mediante un acoplamiento de N-Boc-metionina con el éster metílico de metionina con ayuda de la dicitohexil-carbodiimida (DCC). Las grandes desventajas de este procedimiento de preparación son la utilización de unos grupos protectores caros, un gran gasto para la síntesis y unos reactivos de acoplamiento no reciclables y caros, tales como p.ej. la DCC. Otra alternativa distinta para la síntesis técnica de metionil-metionina se describe en el documento de patente alemana DE 2261926. Mediante un calentamiento del éster isopropílico de metionina, en la primera etapa se prepara la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (metionina-dicetopiperazina, DKP), que es saponificada a continuación para dar metionil-metionina. En este caso, para la etapa de saponificación se pudieron conseguir unos rendimientos solamente satisfactorios, de 62-65 %. Además de esto, la utilización del éster isopropílico de metionina como material de partida es demasiado cara y, por lo tanto, antieconómica.

20 Baker, D. H. y colaboradores (Journal of Nutrition, tomo 114, nº 2, 1984, páginas 292-297) divulgan (en la página 293, columna izquierda) también un procedimiento para la preparación de DL-metionil-DL-metionina a partir de una dicetopiperazina, que había sido preparada anteriormente a partir del éster isopropílico de DL-metionina.

25 Los documentos de patentes europeas EP 1760074 y EP 1564208 divulgan en cada caso un procedimiento para la preparación de DL-metionina mediante conversión química de metionil-hidantoína (fórmula (IIc) en la descripción) en el que resulta también DL-metionil-DL-metionina como un producto secundario, que es separado mediante cristalización o respectivamente desdoblado mediante hidrólisis para dar metionina.

30 El documento de patente de los EE.UU. US 3980653 divulga un procedimiento para la preparación de 3,6-bis-(2-metilmercapto-etil)-2,5-piperazinadiona (metionina-dicetopiperazina) mediante una reacción de metionina-hidantoína con metionina a 160°C y a una presión de, en primer lugar, 9,5 bares. La dicetopiperazina aislada mediante cristalización se puede convertir ulteriormente, por ejemplo, en metionil-metionina.

35 El documento US 4056658 divulga la utilización de DL-metionil-DL-metionina como un aditivo para piensos en unas mezclas de piensos, que contienen proteínas de soja para animales terrestres tales como los de ganado vacuno y ovino, así como un experimento de nutrición en ratas albinas.

40 Misión del invento

Una misión general fue la de poner a disposición un pienso o respectivamente un aditivo para piensos para la nutrición de animales, que esté constituido sobre la base de una nueva sustancia sustitutiva de metionina, el cual se pueda emplear a solas o como una mezcla con metionina especialmente en el sector de la industria de crianza de peces y crustáceos en cultivos acuáticos. Al mismo tiempo, se debería desarrollar una síntesis química sencilla y barata para esta nueva sustancia sustitutiva de la metionina.

50 Ante el antecedente de las desventajas del estado de la técnica, la misión del invento consistió, sobre todo, en poner a disposición un producto de metionina protegido químicamente para diversas especies de peces y crustáceos omní-herbí- y carnívoros, que viven en agua dulce o en agua salada. En particular, este producto debería poseer un pequeño comportamiento de solubilidad (lixiviación) en agua a partir del gránulo de pienso global o respectivamente a partir del material extrudido de pienso global, y debería poseer un mecanismo de liberación lenta, es decir una lenta y continua liberación de la metionina libre en condiciones fisiológicas. Además, el nuevo producto de metionina se debería poder emplear ventajosamente también en forma de una mezcla con DL-metionina.

55 Otra misión del invento fue la de descubrir una sustancia sustitutiva de metionina como un pienso o respectivamente un aditivo para piensos con un valor biológico muy alto, que debería tener unas buenas manipulabilidad y almacenabilidad así como una buena estabilidad en las condiciones usuales de tratamiento de los piensos mixtos, en particular en el caso de la granulación y la extrusión.

60 De esta manera, se debería poner a la disposición de los peces y crustáceos, junto a una DL-metionina cristalina, otra fuente eficiente de metionina, que a ser posible no tenga las desventajas de los productos conocidos o sólo las tenga en una extensión reducida.

Por lo demás, se debería desarrollar una nueva ruta de síntesis flexible para la metionil-metionina (DL-metionil-DL-metionina), en cuyo caso se puedan utilizar como material de partida unos típicos productos previos y secundarios procedentes del proceso técnico de producción de DL-metionina. Además de esto, se debería de desarrollar un procedimiento adecuado para la separación de los pares de diastereoisómeros DD/LL y DL/LD-metionil-metionina, con el fin de que para ciertos usos especiales también sea posible un empleo óptimo y eficaz de sólo un par de diastereoisómeros (DD/LL-I ó DL/LD-I).

Descripción del invento

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante la utilización de DL-metionil-DL-metionina y de sus sales como un aditivo para piensos en unas mezclas de piensos para animales criados en cultivos acuáticos.

De manera preferida, la mezcla de piensos contiene de 0,01 a 5 % en peso, de manera preferida de 0,05 a 0,5 % en peso de DL-metionil-DL-metionina.

La utilización de DL-metionil-DL-metionina se ha manifestado en este caso como especialmente ventajosa, puesto que el compuesto tiene un sobresaliente comportamiento de lixiviación debido a la baja solubilidad de la mezcla a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina o respectivamente del par de diastereoisómeros DL/LD-metionil-metionina (0,4 g/l).

Por lo demás, el compuesto muestra una buena estabilidad frente a la granulación y a la extrusión en el caso de la producción de piensos. La DL-metionil-DL-metionina es muy estable en unas mezclas con los componentes y piensos usuales tales como p.ej. cereales (p.ej. maíz, trigo, tritical, cebada, avena, entre otros), unos portadores de proteínas vegetales o animales (p.ej. habas de soja y colza y sus productos de elaboración ulterior, leguminosas (p.ej. guisantes, judías, lupinas, etc.), harina de pescado, entre otros) y en combinación con aminoácidos esenciales suplementados, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, grasas y aceites.

Por lo demás, es ventajoso el hecho de que, debido a la alta proporción de sustancia activa de la metionil-metionina por kg de sustancia, en comparación con la DL-metionina, por cada mol de metionil-metionina se ahorra un mol de agua.

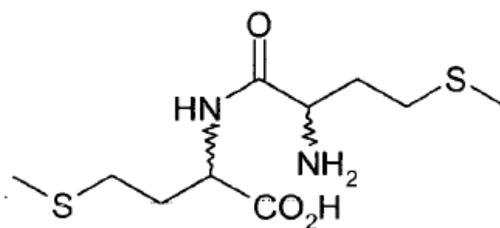
En una utilización preferida, la mezcla de piensos contiene proteínas e hidratos de carbono, de manera preferida unas/os constituidas/os sobre la base de harina de pescado, de soja o de maíz, y éstas/os se pueden suplementar con aminoácidos esenciales, proteínas, péptidos, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, grasas y aceites.

En particular, se prefiere que, en la mezcla de piensos, la DL-metionil-DL-metionina se presente a solas como una mezcla de DD/LL/DL/DL, como una mezcla de DL/LD o DD/LL, de manera preferida en cada caso adicionalmente en mezcla con DL-metionina, de manera preferida con una proporción de DL-metionina de 0,01 a 20 % en peso, de manera especialmente preferida de 1 a 10 % en peso.

En una utilización especialmente preferida, la DL-metionil-DL-metionina se presenta como un par de enantiómeros DL/LD-metionil-metionina.

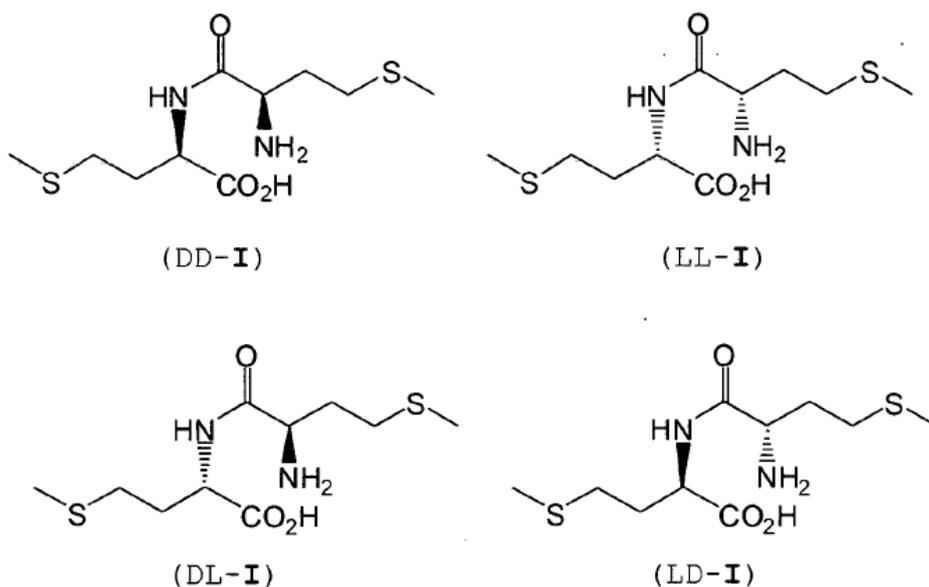
En una utilización preferida, los animales criados en cultivos acuáticos son unos peces y crustáceos de agua dulce y de agua salada escogidos entre el conjunto formado por las carpas, las truchas, los salmones, los siluros, las percas, las platijas, los esturiones, los atunes, las anguilas, las bremas, los bacalaos, los camarones, el krill y las gambas, muy especialmente para carpas plateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpas herbívoras (*Ctenopharyngodon idella*), carpas escamosas comunes (*Cyprinus carpio*) y carpas de cabeza grande (*Aristichthys nobilis*), carassios (*Carassius carassius*), catlas (*Catla Catla*), rohu labeo (*Labeo rohita*), salmones del Océano Pacífico y del Océano Atlántico (*Salmon salar* y *Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), siluro americano (*Ictalurus punctatus*), siluro africano (*Clarias gariepinus*), tiburones pangasios (*Pangasius bocourti* y *Pangasius hypothalamus*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), pez de leche (*Chanos chanos*), cobia (*Rachycentron canadum*), camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*), el camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) y la gamba de río gigante (*Macrobrachium rosenbergii*).

De acuerdo con el invento, la DL-metionil-DL-metionina (I) (abreviada metionil-metionina o Met-Met) o sus sales de metales alcalinos y alcalino-térreos, tales como p.ej. la sal difícilmente soluble de calcio o zinc, se utiliza(n) como un aditivo en mezclas de piensos como una mezcla de diastereoisómeros DD/LL/DL/LD, o DD/LL o DL/LD, a solas o en mezcla con DL-metionina, de manera preferida para peces y crustáceos:



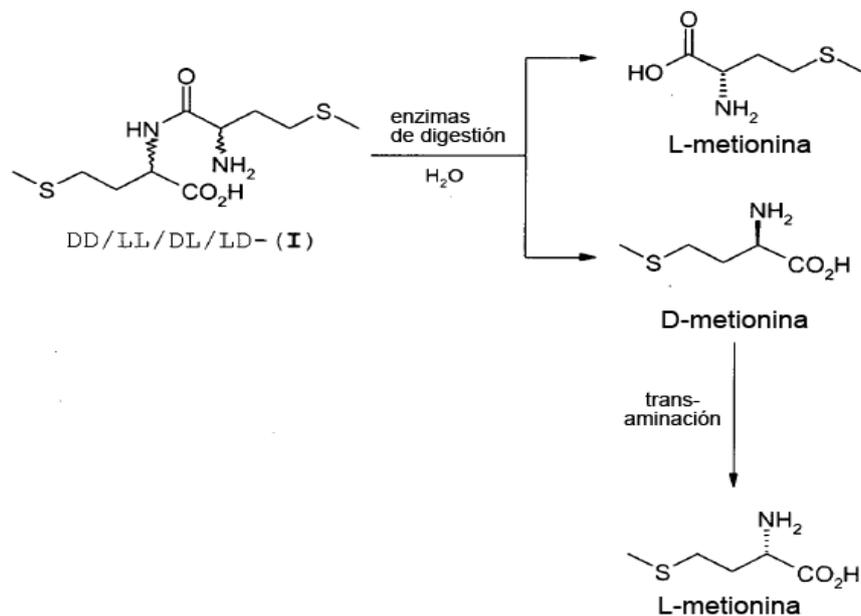
(I)

5 Del dipéptido DL-metionil-DL-metionina (I) existen cuatro diferentes estereoisómeros (diastereoisómeros), DD, LL, DL y LD-I, de los cuales es natural solamente la L-metionil-L-metionina (LL-I), los otros tres dipéptidos, la L-metionil-D-metionina (LD-I), la D-metionil-L-metionina (DL-I) y la D-metionil-D-metionina (DD-I), son todos ellos no naturales (véase el Esquema 1).



Esquema 1

- 10 En este caso, los DD-I y LL-I se comportan entre sí como una imagen y su imagen especular, es decir que son enantiómeros y poseen por lo tanto también las mismas propiedades físicas. Lo mismo es válido para el par de DL-I y LD-I.
- 15 Los dos pares DD/LL-I y DL/LD-I son, por el contrario diastereoisómeros entre sí, es decir que tienen diferentes datos físicos. Así, por ejemplo, el par de diastereoisómeros DD/LL-I posee a la temperatura ambiente una solubilidad de 21,0 g/l en agua, mientras que la solubilidad del par de diastereoisómeros DL/LD-I se sitúa en 0,4 g/l.
- 20 Junto al desarrollo de unos nuevos métodos de síntesis para la metionil-metionina, es el objeto del presente invento la utilización de la DL-metionil-DL-metionina como un pienso en forma de las mezclas de diastereoisómeros DD/LL/DL/LD, DD/LL ó DL/LD como un agente promotor del crecimiento para peces y crustáceos omni-, carní- y herbívoros en cultivos acuáticos. Así, conforme al invento, se pudo mostrar que la DL-metionil-DL-metionina (I) puede ser desdoblada enzimáticamente en condiciones fisiológicas por peces y crustáceos para dar la D- o respectivamente la L-metionina libre (véase el Esquema 2) (véanse también los Ejemplos 22 hasta 24). Para esto, se
- 25 aislaron las correspondientes enzimas de digestión a partir de carpas (omnívoras), truchas (carnívoras) y camarones patiblancos (omnívoros), y se hicieron reaccionar con la DL-metionil-DL-metionina en unas condiciones comparables fisiológicamente en unos ensayos *in vitro* optimizados. La particularidad conforme al invento del desdoblamiento de la DL-metionil-DL-metionina (I) se encuentra en el hecho de que la totalidad de los cuatro diastereoisómeros posibles, tanto el LL-I natural, como también los tres diastereoisómeros no naturales DD-, DL- y LD-I, se pueden
- 30 desdoblar en condiciones fisiológicas. Esto es válido tanto para la utilización de la mezcla global de todos los diastereoisómeros (DD/LL/DL/LD-I), como también en cada caso para los dos pares de diastereoisómeros DD/LL-I o respectivamente DL/LD-I (véase la Figura 1).



5 El desdoblamiento de los diastereoisómeros individuales de la metionil-metionina tiene lugar, sin embargo, con diferentes velocidades. Esto lo explica la representación esquemática del desdoblamiento enzimático de los diastereoisómeros individuales de metionil-metionina con enzimas de digestión de peces y crustáceos en la Figura 2. Mediante el desdoblamiento retardado se retrasa por consiguiente también la liberación de D- y L-metionina (véase la Figura 3). Esto tiene la gran ventaja de que no se puede llegar a ninguna resorción de respuesta rápida de la D- o respectivamente L-metionina libre en el tracto gastrointestinal, y por consiguiente tampoco se puede llegar a un valor
10 máximo de la concentración de metionina libre en el plasma sanguíneo.

La ventaja en el caso de la utilización de metionil-metionina como un aditivo para piensos y una fuente de metionina es por consiguiente que la D- o respectivamente L-metionina puede ser liberada en el organismo durante todo el período de tiempo de digestión y por consiguiente ella transcurre de manera sincrónica con la liberación de otros aminoácidos procedentes de fuentes naturales (mecanismo de liberación lenta) (véase la Figura 3). Este efecto especial tiene como consecuencia el hecho de que la disponibilidad simultánea de todos los aminoácidos importantes y esenciales es asegurada en una relación ideal en el plasma sanguíneo, lo que es absolutamente necesario para un crecimiento óptimo del organismo.
15

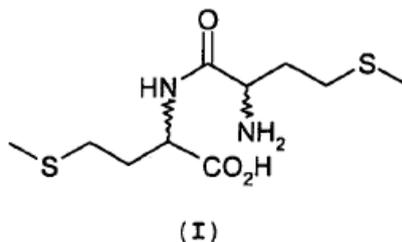
20 En el caso del desdoblamiento enzimático del dipéptido DL-metionil-DL-metionina (I), junto a la L-metionina natural, es liberada también la D-metionina no natural (véase el Esquema 2). Ésta puede ser transaminada enzimáticamente tanto por peces y crustáceos de agua salada o respectivamente dulce, tanto carní-, omní- como también herbívoros, para dar la L-metionina natural. Esto se pudo mostrar en el Ejemplo 25 con el ejemplo de las carpas. Con ayuda de un cóctel de enzimas a base de unas enzimas de digestión y del hígado procedentes de las carpas, la D--metionina se pudo transformar en L-metionina en unas correspondientes condiciones fisiológicas (véase la Figura 4). De esta manera se garantiza un abastecimiento óptimo del organismo con la L-metionina natural en el caso de la utilización de la DL-metionil-DL-metionina (I).
25

Los ensayos de granulación y extrusión con diferentes mezclas de DL-metionil-DL-metionina (I) y de unas fuentes naturales de proteínas e hidratos de carbono, tales como, por ejemplo, las harinas de pescado, maíz y soja, así como en unas mezclas con otros/as aminoácidos esenciales, proteínas, péptidos, vitaminas, minerales, grasas y aceites, muestran que la DL-metionil-DL-metionina (I) es absolutamente estable durante y después del proceso de producción, y que no se llega a ningún tipo de degradación o descomposición (véase el Ejemplo 26).
30

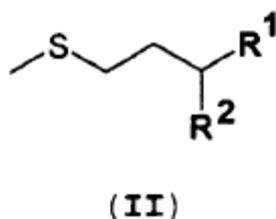
35 Con el fin de investigar el comportamiento de lixiviación de los diastereoisómeros de metionil-metionina (I) procedentes de gránulos de piensos mixtos bajo el agua, se midió la dependencia cronológica de la extracción por disolución de la metionil-metionina (véase el Ejemplo 26). Como comparación, se investigó el comportamiento de lixiviación de la DL-metionina, del MHA y del calcio-MHA (MHA-Ca) en unas condiciones idénticas. En este caso, se puso de manifiesto que tanto la mezcla global de todos los diastereoisómeros (DD/LL/DL/LD-I), así como también los pares de diastereoisómeros DD/LL-I y DL/LD-I muestran una lixiviación manifiestamente más baja que la DL-metionina, el MHA y el calcio-MHA (MHA-Ca) (véase la Figura 5). De esta manera, a lo largo del tiempo se disuelve
40

mucha menos cantidad de metionil-metionina a partir de los gránulos de pienso que en el caso de todos los otros derivados de metionina. Muestra unas tasas de lixiviación especialmente bajas el par de diastereoisómeros DD/LD-I, que incluso después de un período de tiempo de permanencia de más que 200 minutos, había sido extraído por disolución desde los gránulos de pienso solamente en como máximo un 5 % (véase la Figura 5).

5 El problema planteado por esta misión se resuelve además mediante un procedimiento para la preparación de DL-metionil-DL-metionina (I) con la fórmula



10 mediando conversión química de un derivado de urea de la fórmula general II,



estando definidos los radicales R^1 y R^2 en los derivados de urea **Ila**, **Ilb**, **Ilc**, **Ild**, **Ile**, **Ilf** y **Ilg** como sigue:

15 significando

Ila: $R^1 = \text{COOH}$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

Ilb: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

20

Ilc: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NH}_2$

(Ild: R^1 - $R^2 = -\text{CONHCONH}-$, no es conforme al invento)

Ile: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{OH}$

25

Ilf: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{NH}_2$

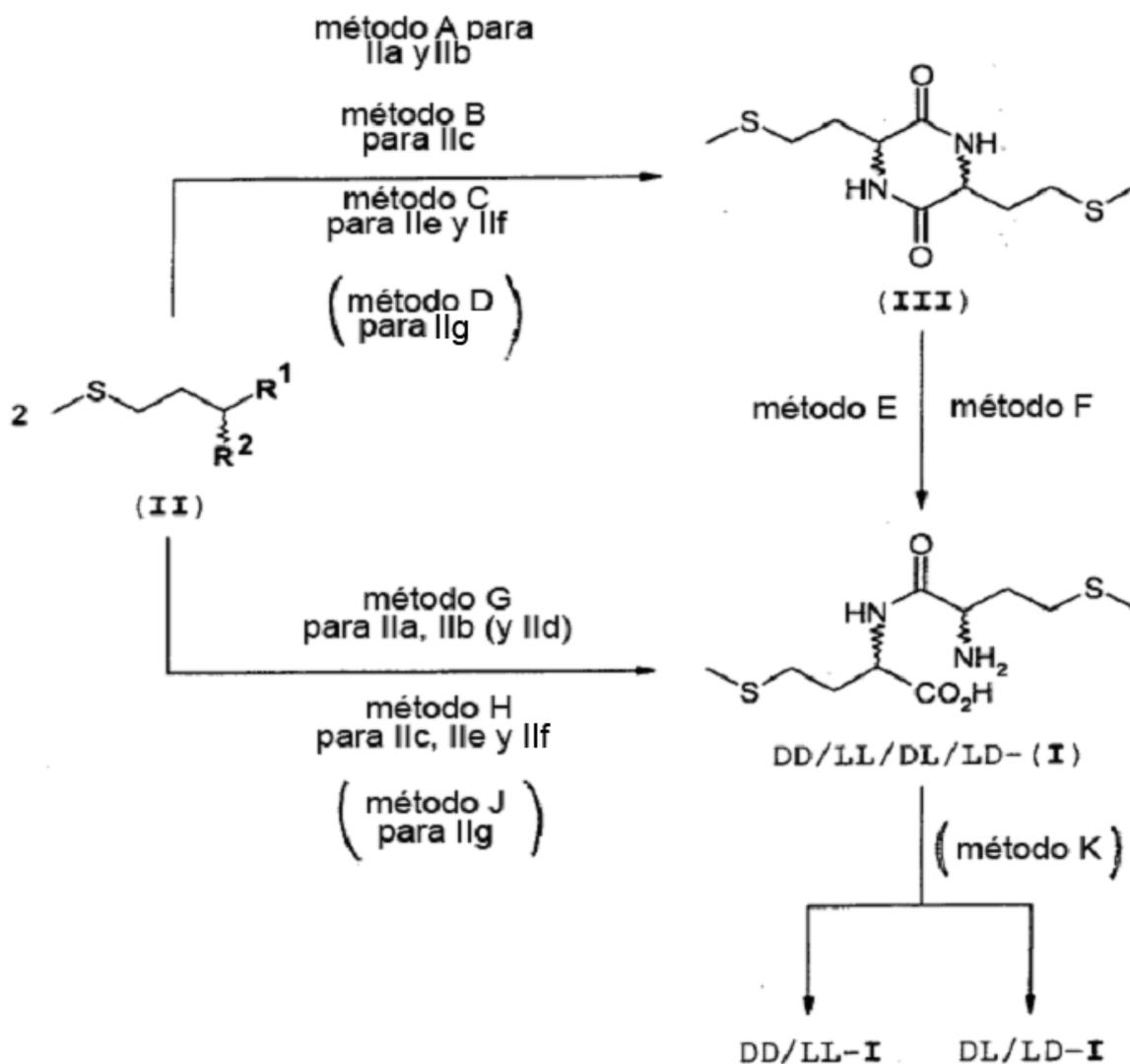
(Ilg: $R^1 = =\text{O}$, $R^2 = \text{H}$, no es conforme al invento),

para dar la DL-metionil-DL-metionina (I).

30

En una forma de realización del procedimiento conforme a la descripción se prefiere en este caso que la metionina-hidantoína (**Ild**) sea utilizada como un producto de partida o que se forme de manera intermedia como un producto intermedio. En el caso de este procedimiento, la DL-metionil-DL-metionina es sintetizada directamente a partir de metionina-hidantoína y abarca los métodos **G**, **H** y **J** mostrados en el Esquema 3.

35



Esquema 3

5 Los métodos puestos entre paréntesis no pertenecen al invento.

De manera preferida, en este caso una solución que contiene metionina-hidantoína y agua se hace reaccionar con metionina en condiciones básicas. Por lo demás, se prefiere que el valor del pH de la solución, que contiene el derivado de urea sea ajustado a 8 hasta 14, de manera preferida a 10 hasta 13.

10 En un modo preferido, la conversión química se efectúa a una temperatura de 50 a 200°C, de manera preferida a una temperatura de 80 a 170°C y de manera especialmente preferida a una temperatura de 130 a 160°C.

15 Por lo demás es preferido que la conversión química se lleve a cabo bajo presión, de manera preferida a una presión de 3 a 20 bares, de manera especialmente preferida a una presión de 6 a 15 bares.

En un procedimiento preferido conforme al invento, una solución, que contiene metionina-hidantoína y agua, se forma previamente a partir de uno o varios de los compuestos I Ia, I Ib, I Ic, I Ie y I If.

20 En otro procedimiento preferido, se obtiene la metionil-hidantoína mediante una reacción del compuesto I Ie o I If con una base que contiene nitrógeno, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, una mezcla de NH₄OH y CO₂ o unas sales carbamatos.

La conversión química del compuesto I Ie se lleva a cabo de manera preferida a una temperatura de 0°C a 150°C, de manera preferida de 0°C a 100°C y de manera especialmente preferida de 10°C a 70°C.

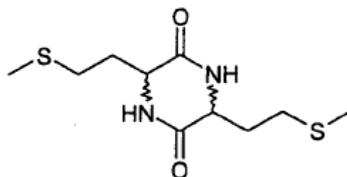
25

En otro procedimiento preferido, la metionil-hidantoína se obtiene mediante una reacción del compuesto **IIf** con CO₂. En este caso, se prefiere que la reacción se efectúe en presencia de una base, de manera preferida escogida entre el conjunto que contiene KHCO₃, K₂CO₃, unas aminas terciarias o sus sales y unas bases de metales alcalinos y alcalinotérreos.

En otro procedimiento descrito, la metionil-hidantoína se obtiene por reacción del compuesto **Ilg** con una fuente de iones cianuro y una base, escogida entre el conjunto formado por unas bases nitrogenadas, unas sales de amonio en presencia de CO₂, NH₄CO₃, (NH₄)₂CO₃, una mezcla de NH₄OH y CO₂ y unas sales carbamatos. La conversión química se efectúa en este caso a una temperatura preferida de -20°C a 150°C, de manera más preferida de -10°C a 100°C y de manera especialmente preferida de 0°C a 70°C.

Una forma alternativa del procedimiento conforme al invento comprende las siguientes etapas:

a) Una conversión química del derivado de urea de acuerdo con las fórmulas **Ila**, **Ilb**, **Ilc**, **Ile** y **Ilf** para dar una dicetopiperazina de la fórmula



(III)

b) Una conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina. Este procedimiento abarca los métodos A, B y C expuestos en el Esquema 3. En el caso de estos procedimientos se forma la dicetopiperazina (III) como un producto intermedio.

En este caso, se prefiere que la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina se lleve a cabo a una temperatura de 50°C a 200°C, de manera preferida de 100°C a 180°C y de manera especialmente preferida de 140°C a 170°C.

En un procedimiento preferido, la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina se efectúa bajo presión, de manera preferida a una presión de 3 a 20 bares, de manera especialmente preferida a una presión de 6 a 15 bares.

De manera preferida, la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina se efectúa en presencia de una base. En este caso, la base se escoge de manera preferida entre el conjunto formado por unas bases nitrogenadas, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, KHCO₃, K₂CO₃, una mezcla de NH₄OH y CO₂, unas sales carbamatos y unas bases de metales alcalinos y alcalinotérreos.

En otro procedimiento preferido, la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina se efectúa por una reacción con metionina. En este caso, se prefiere una relación del derivado de urea a la metionina de 1:100 a 1:0,5.

En otro procedimiento preferido, la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina se efectúa mediante una hidrólisis en condiciones ácidas. La hidrólisis en condiciones ácidas se lleva a cabo en este caso en presencia de un ácido, que se escoge entre el conjunto formado por los ácidos inorgánicos, HCl, H₂CO₃, CO₂/H₂O, H₂SO₄, los ácidos fosfóricos, los ácidos carboxílicos y los ácidos hidroxicarboxílicos.

En otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina se efectúa mediante una hidrólisis en condiciones básicas. En este caso, la hidrólisis en condiciones básicas se lleva a cabo de manera preferida a un pH de 7 a 14, de manera especialmente preferida a un pH de 9 a 12, de manera muy especialmente preferida a un pH de 10 a 11, con el fin de obtener la DL-metionil-DL-metionina. En este caso, las condiciones básicas se pueden ajustar mediante utilización de una sustancia, que se escoge de manera preferida entre el conjunto formado por unas bases nitrogenadas, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, una mezcla de NH₄OH y CO₂, unas sales carbamatos KHCO₃, K₂CO₃, carbamatos y unas bases de metales alcalinos o alcalinotérreos.

La hidrólisis en condiciones ácidas o respectivamente básicas se lleva a cabo de manera preferida a unas temperaturas de 50°C a 200°C, de manera preferida de 80°C a 180°C y de manera especialmente preferida de 90°C a 160°C.

En otra forma de realización, la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina se lleva a cabo mediante introducción de CO₂ en una solución de carácter básico, de manera preferida en una solución de carácter básico de hidróxido de amonio, potasio o sodio.

- 5 En un procedimiento preferido, la dicetopiperazina se aísla antes de la hidrólisis. En este caso se prefiere aislar la dicetopiperazina mediante una cristalización desde la solución de reacción, de manera preferida a una temperatura de -30 a 120°C, de manera especialmente preferida a una temperatura de 10 a 70°C.

10 Para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina a partir de unas soluciones de reacción de carácter básico, éstas se acidifican y la metionil-metionina se obtiene mediante una cristalización o respectivamente precipitación. En este caso se prefiere un valor del pH de 5 a 9, se prefiere especialmente un valor del pH de 5 a 7, y se prefiere muy especialmente un valor del pH de aproximadamente 5,6. En este caso, para la acidificación se pueden utilizar unos ácidos escogidos preferiblemente entre el conjunto formado por los ácidos inorgánicos, HCl, H₂CO₃, CO₂/H₂O, H₂SO₄, los ácidos fosfóricos, los ácidos carboxílicos y los
15 ácidos hidroxycarboxílicos.

20 Para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina a partir de unas soluciones de reacción de carácter ácido, éstas se neutralizan mediante una adición de ciertas bases y la metionil-metionina se obtiene mediante una cristalización o respectivamente precipitación. En este caso se prefiere un valor del pH de 5 a 9, se prefiere especialmente un valor del pH de 5 a 7, y se prefiere muy especialmente un valor del pH de aproximadamente 5,6. En este caso, para la neutralización se utilizan de manera preferida unas bases escogidas entre el conjunto formado por NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, unas bases nitrogenadas, NH₄OH, unas sales carbamatos, KHCO₃, K₂CO₃, unos carbonatos y unas bases de metales alcalinos o alcalinotérreos.

25 La descripción pone a disposición además un procedimiento para la separación de la mezcla de diastereoisómeros a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina mediante una cristalización fraccionada, obteniéndose los dos pares de enantiómeros DD/LL-metionil-metionina y DL/LD-metionil-metionina.

30 En una forma preferida de realización del procedimiento, de la cristalización fraccionada mediante una acidificación, se procede como sigue:

a) mediante una acidificación de la suspensión que contiene DD/LL/DL/LD-metionil-metionina hasta que se obtenga una solución transparente, y mediante una mezcladura escalonada de la solución ácida con una base hasta que se
35 separe un precipitado, se obtiene la DL/LD-metionil-metionina como el precipitado,

b) a partir de las aguas madres obtenidas en la etapa a) se obtiene la DD/LL-metionil-metionina.

40 En este caso se prefiere especialmente que en la etapa a) la acidificación se efectúe con un ácido y que se ajuste un valor del pH de 0,1 a 1,0, de manera preferida un valor del pH de aproximadamente 0,6, y que la solución transparente obtenida se ajuste a continuación con una base a un valor del pH de 5 a 6, de manera preferida a un valor del pH de aproximadamente 5,6. Como el ácido se pueden emplear en este caso unos ácidos inorgánicos, de manera preferida ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido carbónico o respectivamente dióxido de carbono, y/o unos ácidos carboxílicos, en particular los ácidos carboxílicos de C₁-C₄ ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico o ácido isobutírico. De manera especialmente preferida, el ácido carbónico o
45 respectivamente el dióxido de carbono se puede introducir en la mezcla de reacción bajo una presión normal o bajo una sobrepresión.

50 Para el ajuste de las condiciones básicas en la etapa a), se utiliza de manera preferida una base, escogida entre el conjunto formado por NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, unas bases nitrogenadas, NH₄OH, unas sales carbamatos, KHCO₃, K₂CO₃, unos carbonatos, unas bases de metales alcalinos y unas bases de metales alcalinotérreos.

En otra forma preferida de realización del procedimiento de la cristalización fraccionada, mediante un ajuste a condiciones básicas, se procede como sigue:

55 a) mediante un ajuste a condiciones básicas de la suspensión que contiene DD/LL/DL/LD-metionil-metionina hasta que se obtenga una solución transparente y mediante una mezcladura escalonada de la solución de carácter básico con un ácido hasta que se separe un precipitado, se obtiene la DL/LD-metionil-metionina como el precipitado.

b) a partir de las aguas madres obtenidas en la etapa a) se obtiene a continuación la DD/LL-metionil-metionina.

60 En este caso se prefiere especialmente que en la etapa a) el ajuste a condiciones básicas se efectúe con una base y que se ajuste un valor del pH de 7,5 a 14, de manera preferida un valor del pH de aproximadamente 9 hasta 13, y que la solución transparente obtenida se ajuste a continuación con un ácido a un valor del pH de 5 a 6, de manera preferida a un valor del pH de aproximadamente 5,6. Como bases se utilizan en este caso de manera preferida unas

bases escogidas entre el conjunto formado por NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, unas bases nitrogenadas, NH_4OH , unas sales carbamatos, KHCO_3 , K_2CO_3 , unos carbonatos y unas bases de metales alcalinos y alcalinotérreos.

5 Para el ajuste de las condiciones ácidas en la etapa a) se utiliza de manera preferida un ácido escogido entre el conjunto formado por los ácidos inorgánicos, de manera preferida ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, o ácido carbónico o respectivamente dióxido de carbono, y/o entre el conjunto formado por los ácidos carboxílicos, en particular los ácidos carboxílicos de C_1 - C_4 ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido isobutírico. De manera especialmente preferida, se utiliza el ácido carbónico o respectivamente el dióxido de carbono.

10 En una forma preferida de realización del procedimiento de la cristalización fraccionada, ésta se efectúa a una temperatura de 0°C a 100°C , de manera preferida de 5°C a 60°C y de manera especialmente preferida de 10°C a 40°C .

15 La DD/LL-metionil-metionina obtenida puede ser racemizada en este caso, y puede ser introducida en el procedimiento de separación antes descrito, siendo separados uno de otro los dos pares de enantiómeros DD/LL-metionil-metionina y DL/LD-metionil-metionina.

20 Todos los procedimientos mencionados del presente invento se llevan a cabo de manera preferida en un medio acuoso.

Además, los procedimientos del presente invento se pueden llevar a cabo como unos procedimientos discontinuos o como unos procedimientos continuos conocidos para un experto en la especialidad.

25 **Figuras**

La **Figura 1** muestra la representación esquemática del desdoblamiento enzimático de las mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina DD/LL-I, DL/LD-I y DD/LL/DL/LD-I.

30 La **Figura 2** muestra la representación esquemática del desdoblamiento enzimático de los cuatro diastereoisómeros de metionil-metionina DD-I, LL-I, DL-I y LD-I con diferentes velocidades de desdoblamiento.

La **Figura 3** muestra la representación esquemática de la liberación enzimática de metionina (D- y L-Met en común) a partir de los cuatro diastereoisómeros de metionil-metionina DD-I, LL-I, DL-I y LD-I.

35 La **Figura 4** muestra la biotransformación de D-metionina en L-metionina con un cóctel de enzimas procedente de carpas espejo.

La **Figura 5** muestra el comportamiento de lixiviación de las mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina DD/LL-I, DL/LD-I y LL/DD/LD/DL-I en comparación con metionina, MHA y MHA-Ca.

La **Figura 6** muestra la digestión *in vitro* de cuatro diferentes diastereoisómeros de metionil-metionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con unas enzimas de digestión de la carpa espejo.

45 La **Figura 7** muestra la digestión *in vitro* de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina LL/DD-I, DL/LD-I, y LL/DD/LD/DL-I con unas enzimas de digestión de la carpa espejo.

La **Figura 8** muestra la digestión *in vitro* de cuatro diferentes diastereoisómeros de metionil-metionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con unas enzimas de digestión de la trucha arcoíris.

50 La **Figura 9** muestra la digestión *in vitro* de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina LL/DD-I, DL/LD-I, y LL/DD/LD/DL-I con unas enzimas de digestión de la trucha arcoíris.

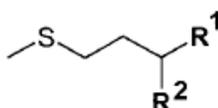
La **Figura 10** muestra la digestión *in vitro* de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con unas enzimas de digestión del camarón patiblanco.

55 La **Figura 11** muestra la digestión *in vitro* de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina LL/DD-I, DL/LD-I, y LL/DD/LD/DL-I con unas enzimas de digestión del camarón patiblanco.

Ejemplos**A) Vista de conjunto acerca de las etapas y métodos individuales del procedimiento conforme al invento**

5 El procedimiento conforme al invento para la preparación de DL-metionil-DL-metionina (I) y la separación en los pares de diastereoisómeros DD/LL-I y DL/LD-I se describen detalladamente en lo sucesivo.

El procedimiento conforme al invento para la preparación de DL-metionil-DL-metionina (I) parte en este caso de un compuesto de la fórmula general II



(II)

10

en la que significan **Ila:** R¹ = COOH, R² = NHCONH₂

15 **Ilb:** R¹ = CONH₂, R² = NHCONH₂

Ilc: R¹ = CONH₂, R² = NH₂

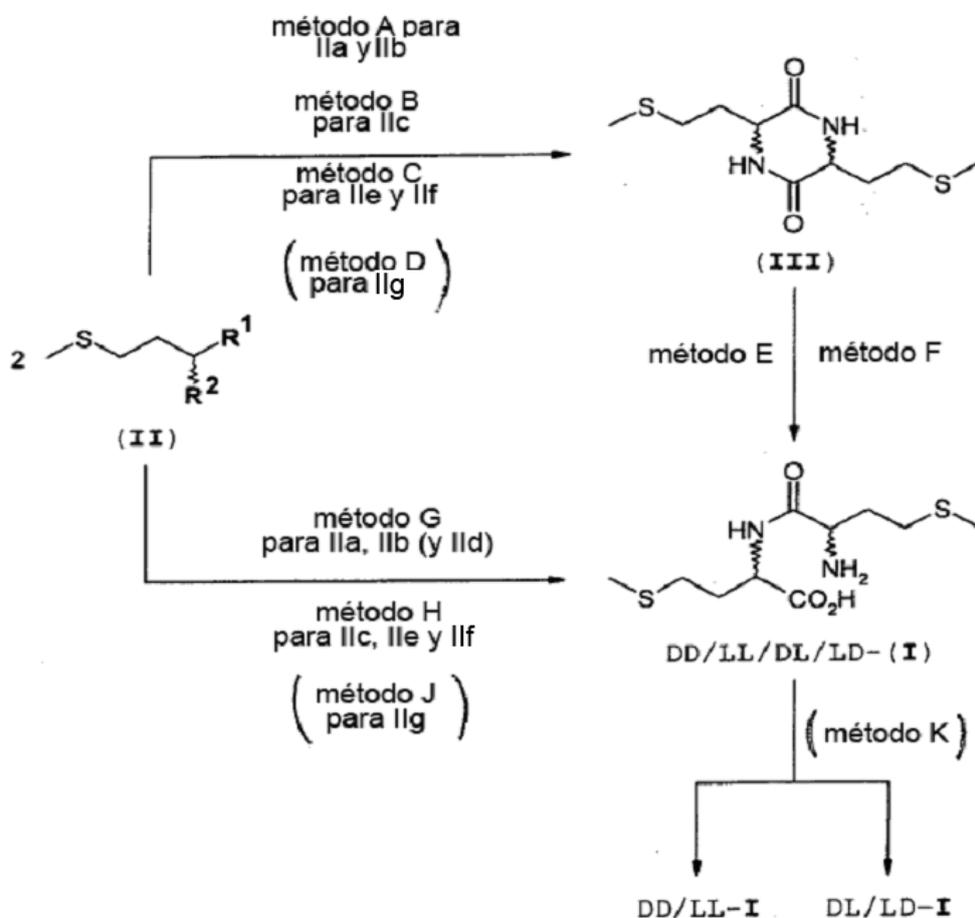
20 **(Ild:** R¹-R² = -CONHCONH-, no es conforme al invento)

Ile: R¹ = CN, R² = OH

Ilf: R¹ = CN, R² = NH₂

25 **(Ilg:** R¹ = =O, R² = H, no es conforme al invento).

30 Por medio de diferentes métodos de síntesis (**A, B, C, D, E, F, G, H y J**), este compuesto es transformado en la DL-metionil-DL-metionina (I) (véase el Esquema 3). En este contexto, en el caso de los métodos **A, B, C y D** se forma la correspondiente dicetopiperazina (III) como un producto intermedio. En el caso de los métodos de síntesis **G, H y J** resulta metionina-hidantoína como un producto intermedio, que es transformado directamente para dar la DL-metionil-DL-metionina (I). A continuación, con ayuda del método **K**, mediante una cristalización fraccionada se consigue una separación de los dos pares de diastereoisómeros DD/LL-I y DL/LD-I (véase el Esquema 3).



Los métodos puestos entre paréntesis no pertenecen al invento.

5 B) Ejemplos de síntesis:

Ejemplo 1:

10 Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinediona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de N-carbamoil-metionina (IIa) según el método A

17,5 g (90,0 mmol, pureza: 99 %) de N-carbamoil-metionina (IIa) se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml equipado con un sistema agitador magnético durante 6 horas a 160°C. La presión aumenta en este caso. De vez en cuando se dejó salir el gas siempre de nuevo durante tanto tiempo hasta que se hubo alcanzado una presión de 7 bares. Después de haberse terminado la reacción, el autoclave se enfrió en un baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el material sólido separado por filtración se lavó múltiples veces con agua y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento aislado fue de 8,1 g (30,9 mmol) (69 %) de la bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinediona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC = cromatografía de fase líquida de alto rendimiento), punto de fusión 234-236°C.

¹H-RMN de la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinediona (III) (500 MHz, D₆-DMSO): δ = 1,85-2,05 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,049 (s, 6H, 2 x SCH₃); 2,46-2,60 (m, 4H, 2 x SCH₂); 3,92-3,99 (m, 2H, 2 x CH); 8,213 (s, 2H, 2 x NH)

25 ¹³C-RMN de la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinediona (III) (125,8 MHz, D₆-DMSO): δ = 14,35 (CH₃); 14,38 (CH₃); 28,50 (CH₂S); 28,68 (CH₂S); 31,92 (CH₂CH₂S); 32,33 (CH₂CH₂S); 52,92 (CH); 52,96 (CH); 167,69 (C=O); 167,71 (C=O)

Análisis elemental para C₁₀H₁₈N₂O₂S₂ (M = 262, 39 g/mol) :

30 Calculado: C 45,77; H 6,91; N 10,68; S 24,44

Encontrado: C 45,94; H 6,96; N 10,64; S 24,38

Ejemplo 2:

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de la amida de ácido 2-[(aminocarbonil)amino]-4-(metiltio)butanoico (N-carbamoil-amida de metionina) (IIb) según el método A

17,4 g (90 mmol, pureza: 98,5 %) de la amida de ácido 2-[(aminocarbonil)amino]4-(metiltio)butanoico (IIb) se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 7 horas a 160°C. La presión aumenta en este caso. De vez en cuando se dejó salir el gas siempre de nuevo durante tanto tiempo hasta que se hubo alcanzado una presión de 7 bares. Después de haberse terminado la reacción, el autoclave se enfrió en el baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el material sólido separado por filtración se lavó múltiples veces con agua y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento aislado fue de 9,2 g (35,1 mmol) (78 %) de la bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 1.

Ejemplo 3: (no es conforme al invento)

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (IIc) (metionina-hidantoína) según el método A y un subsiguiente empleo renovado de las aguas madres (reacción en cascada)

Primera tanda:

Una suspensión de 13,4 g (0,09 moles) de metionina, 17,2 g (0,09 moles, pureza: 91 %) de metionina-hidantoína (IIc) y 150 g de agua se dispusieron previamente en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, y se agitaron durante 6 horas a 160°C, aumentando la presión hasta 15 bares. De vez en cuando, el autoclave se descomprimió, hasta que la presión descendiese constantemente alrededor de 10 bares. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y el material sólido se lavó con 75 ml de agua. Finalmente, el material sólido se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. Se obtuvo la bis(2-(metiltio)etil)-2,5-piperazinadiona (III) en forma de unos cristales de color amarillento blancuzco.

Siguientes tandas:

El agua de lavado y las aguas madres procedentes de la tanda precedente se reunieron y se espesaron en el evaporador rotatorio a 50°C hasta llegar a un volumen de 90 ml. 17,2 g (0,09 moles, pureza: 91 %) de metionina-hidantoína (IIc) fueron recogidos con las aguas madres concentradas y rellenados con agua hasta obtenerse 150 g de la solución. La solución resultante se dispuso previamente en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, y se agitó durante 6 horas a 160°C, aumentando la presión hasta 15 bares. De vez en cuando, el autoclave se descomprimió, hasta que la presión permaneciese constantemente en 10 bares. El tratamiento ulterior se efectuó de una manera análoga a la primera tanda.

Ejemplo 4:

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de la amida de ácido 2-amino-4-(metiltio)butanoico (amida de metionina) (IIc) según el método B

16,6 g (0,09 moles) del hidrocloreuro de la amida de ácido 2-amino-4-(metiltio)butanoico (IIc) y 8,7 g (0,09 moles) de (NH₄)₂CO₃ se disolvieron en 150 g de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 6 horas a 160°C. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el material sólido separado por filtración se lavó múltiples veces con agua y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento aislado fue de 6,5 g (24,8 mmol) (55 %) de la bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 1.

Ejemplo 5:

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de 2-hidroxi-4-(metiltio)butanonitrilo (cianhidrina de aldehído (3-(metilmercapto)propiónico, MMP-CH) (IIe) según el método C

Una solución de 30,5 g (0,232 moles) de 2-hidroxi-4-(metiltio)butanonitrilo (IIe) y 360 g de agua se añadieron gota a gota a la TA (acrónimo de "temperatura ambiente") a una suspensión de 22,4 g (0,283 moles = 1,22 equivalentes) de NH_4HCO_3 en 20 g de agua, y se agitó durante 2 h. El NH_4HCO_3 se disolvió en este caso. A continuación, la solución obtenida se agitó durante 7 h a 50°C y luego durante una noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transfirió entonces a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 500 ml, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y el material sólido se lavó con 50 ml de agua. Finalmente, el material sólido de color claro se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 17,8 g (67,8 mmol) (58 %) de la bis(2-(metiltio)etil)-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 1.

Ejemplo 6:

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de 2-amino-4-(metiltio)butanonitrilo (nitrilo de metionina) (IIf) según el método C

En una solución de 26,2 g (0,201 moles) de 2-amino-4-(metiltio)butanonitrilo (IIf) en 330 g de agua se introdujo durante un período de tiempo de 3 horas una corriente moderada de CO_2 , aumentando la temperatura a 45°C y pendulando el valor del pH alrededor de 8. A continuación, se continuó agitando durante una noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transfirió a la mañana siguiente a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 500 ml, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración, el material sólido se lavó con 50 ml de agua y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 15,7 g (59,7 mmol) (59 %) de la bis(2-(metiltio)etil)-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 1.

Ejemplo 7: (no es conforme al invento)

Síntesis de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) a partir de aldehído 3-(metiltio)propiónico (aldehído 3-(metilmercapto)propiónico, MMP) (IIg) según el método D

66,0 g (0,68 moles) de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ se dispusieron previamente en 100 g de agua y se enfriaron a 5°C en un baño de hielo. A continuación, en el transcurso de 25 minutos se añadieron gota a gota 16,6 g (0,61 moles) de ácido cianhídrico recientemente destilado, siendo mantenida la temperatura de la suspensión en el intervalo de 5 a 10°C. Después de haber añadido 860 g de agua a 10°C, se añadieron gota a gota 60,3 g (0,58 moles) del aldehído 3-(metiltio)propiónico (IIg) durante un período de tiempo de 80 minutos. El valor del pH permaneció constante en este caso en el intervalo de 8,5 a 9. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 50°C y se agitó durante 7 horas a esta temperatura. Después de haberse terminado la reacción, la mezcla de reacción se enfrió en el baño de hielo a 5°C y se almacenó durante una noche en la estufa de desecación. A la mañana siguiente, la mezcla se transfirió a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 2 l, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración, se lavó con 150 ml de agua y el material sólido se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 48,6 g (185,2 mmol) (64 %) de la bis(2-(metiltio)etil)-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 1.

Ejemplo 8:

Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) con ácido clorhídrico concentrado según el método E

655,9 g (2,50 moles) de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (DKP) se suspendieron con 1.661 g de agua. Mediando agitación se añadieron gota a gota muy lentamente 271,0 g de ácido clorhídrico concentrado y a continuación se calentó hasta reflujo con precaución mediando una agitación muy intensa. En este caso, se puede llegar a una formación fuerte de espuma. La mezcla de reacción se calentó durante 5,5 horas lentamente bajo reflujo, con lo que se disolvió todo el material sólido. Durante el subsiguiente enfriamiento precipitó la DKP (III) que no había sido convertida químicamente, la cual se separó por filtración. Esta DKP se puede emplear de nuevo para unas saponificaciones adicionales en unas conversiones químicas posteriores. El material filtrado se ajustó a continuación a pH 6 en un vaso de precipitados con un baño de hielo con agua amoniacal al 32 %. En este caso, precipita una DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) como una mezcla 50:50 de los dos pares de diastereoisómeros (DL/LD-Met-Met) (DL/DL-I) o respectivamente (DD/LL-Met-Met) (DD/LL-I) como una espesa papilla de cristales. Finalmente, se secó en la estufa de desecación a 60°C en vacío. Rendimiento: 601,0 g (2,14 moles) (85,7 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), como un material sólido de color ligeramente amarillento, pureza 98 % (según la HPLC).

¹H-RMN de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 1,86-2,16 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,050 (s, 3H, SCH₃); 2,060 (s, 3H, SCH₃); 2,44-2,64 (m, 4H, 2 x SCH₂); 2,90-4,00 (m, 1H, CH); 4,32-4,42 (m, 1H, CH); 8,45 (bs, 3H, NH₃⁺); 8,98-9,08 (m, 1H, 2 x NH)

¹³C-RMN de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) (125,8 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 14,33 (CH₃); 14,38 (CH₃); 27,74; 27,94; 29,51; 30,04; 30,13; 30,89; 30,95; 51,00; 51,29; 51,54 (CH, CH₂); 168,05 (CONH); 168,19 (CONH); 172,55 (COOH); 172,62 (COOH)

Análisis elemental para C₁₀H₂₀N₂O₃S₂ (M = 280,41 g/mol):

Calculado: C 42,83; H 7,19; N 9,99; S 22,87

Encontrado: C 42,61; H 7,19; N 10,06; S 22,72

Ejemplo 9:

Síntesis técnica de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) con ácido clorhídrico concentrado según el método E

En un recipiente esmaltado equipado con un mecanismo agitador que tenía una capacidad de 500 l se dispusieron previamente 500 l de agua, se añadieron 32 l de ácido clorhídrico concentrado así como 78,6 kg de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (DKP) y el aparato se cerró herméticamente. Luego se calentó durante 2 horas mediando agitación a 110°C, aumentado la presión hasta 2,5 bares, y la DKP (III) se disolvió de manera prácticamente total. Después de haberse terminado la reacción, se enfrió a 20°C y la DKP que no había reaccionado se centrifugó en una centrifugadora. El material sólido se lavó posteriormente con 10 l de agua. El material filtrado y el agua de lavado se reunieron en un contenedor que tenía una capacidad de 800 l, a continuación se introdujeron de nuevo en un recipiente que tenía una capacidad de 500 l equipado con un mecanismo agitador. Después de haber añadido 2 kg de carbón activo, se agitó a 20°C durante 30 minutos. La suspensión se filtró a continuación a través de una prensa de filtración en otro recipiente que tenía una capacidad de 500 l equipado con un mecanismo agitador. Mediante adición de aproximadamente 28 l de una solución concentrada de amoníaco, a un pH de 6 se precipitó a continuación la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I). En este caso, al principio precipita de manera preferida el par racémico de diastereoisómeros, que es más difícilmente soluble, DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I). Éste se separó por centrifugación y las aguas madres se concentraron por evaporación en común con el agua de lavado en el vacío de un chorro de vapor a una temperatura interna de como máximo 40°C hasta llegar a una cuarta parte del volumen original. En este caso, cristalizó el par racémico más fácilmente soluble de diastereoisómeros DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) en común con unas pequeñas cantidades del DL/LD-I difícilmente soluble. Después de haberse terminado la destilación, se enfrió a 20°C y se centrifugó. Las aguas madres separadas y el agua de lavado fueron desechadas. Las dos fracciones son secadas a 70°C en el vacío. En total se pudieron obtener 64,2 kg (78 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) como una mezcla de diastereoisómeros. Pureza > 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 10:

Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) en condiciones alcalinas p.ej. con amoníaco según el método F

65,6 g (0,25 moles) de 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (DKP), 70 ml de una solución al 25 % de amoníaco y 500 ml de agua se calientan durante 2 horas en un autoclave a 150°C. Después de haberse enfriado, la DKP (III), que no ha sido convertida químicamente, (16,0 g = 24,4 %) se filtra con succión. Ésta puede ser empleada de nuevo en una siguiente tanda. El material filtrado se concentró por evaporación en el evaporador rotatorio a una temperatura del agua de 80-90°C durante tanto tiempo hasta que precipitasen los primeros cristales. Después de haberse enfriado y de haber dejado reposar durante una noche, se pudieron aislar, después de una filtración y una desecación, en total 49,3 g (70,3 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) como una mezcla 50:50 de los dos pares de diastereoisómeros DL/DL-I o respectivamente DD/LL-I como un material sólido de color blanco. Pureza 98 % (según la HPLC).

El punto de fusión y los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 11: (no es conforme al invento)

Purificación de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I)

500 g de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) se suspendieron en 7.800 g de agua VE (totalmente desalinizada) (a un pH de 5,3). A 26°C se ajustó a un pH de 1,0 con 346,6 g de ácido sulfúrico al 50 % en peso. La metionil-metionina se disolvió en este caso totalmente. Para la clarificación, a la solución turbia de color amarillento se le añadieron 18 g de carbón activo, y se agitó durante 60 minutos. El carbón activo se separó por filtración y la solución incolora, transparente como el agua, se ajustó a un pH de 5,6 con 228 g de una solución al 32 % en peso de amoníaco. La solución se dejó reposar durante una noche. El material sólido precipitado de color blanco se filtró con succión y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. Rendimiento: 460,5 g (92 %) de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), como un material sólido de color blanco radiante, pureza > 99 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 12:

Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de N-carbamoil-metionina (IIa) y de DL-metionina con KOH según el método G

13,4 g (0,09 moles) de DL-metionina, 17,5 g (0,09 moles, pureza: 99 %) de N-carbamoil-metionina (IIa) y 11,9 g (0,18 moles) de KOH al 85 % se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 5 horas a 150°C, aumentando la presión hasta 6 bares. Después de haberse terminado la reacción, se enfrió el autoclave, la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. El agua de lavado y las aguas madres se reunieron y se concentraron por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 130 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,4 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 11,4 g (40,6 mmol) (45 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 13: (no es conforme al invento)

Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (IIId) (metionina-hidantoína) y DL-metionina con KOH según el método G

13,4 g (0,09 moles) de DL-metionina, 17,2 g (0,09 moles, pureza: 91 %) de metionina-hidantoína (IIId) y 8,9 g (0,135 moles) de KOH al 85 % se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 5 horas a 150°C, aumentando la presión hasta 8 bares. Después de haberse terminado la reacción, se enfrió el autoclave, la suspensión obtenida se separó por filtración y la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se lavó múltiples veces con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron y la solución resultante se concentró por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 125 ml. El concentrado se neutralizó con precaución con ácido clorhídrico concentrado. A un valor del pH de 5,8, durante

la agitación a lo largo de una noche a la temperatura ambiente, precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 17,5 g (62,4 mmol) (69 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

5

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 14: (no es conforme al invento)

10 **Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (IIId) (metionina-hidantoína) y DL-metionina con K₂CO₃ según el método G**

15 13,4 g (0,09 moles) de DL-metionina, 17,2 g (0,09 moles, pureza: 91 %) de metionina-hidantoína (IIId) y 12,4 g (0,09 moles) de K₂CO₃ se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 5 horas a 150°C, aumentando la presión hasta 12 bares. Después de haberse terminado la reacción, se enfrió el autoclave, la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron y la solución resultante se concentró por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta que se llegó a un volumen de 135 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,8, y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 14,3 g (60,0 mmol) (57 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), material sólido de color blanco, pureza > 99 % (según la HPLC).

25 Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 15: (no es conforme al invento)

30 **Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (IIId) (metionina-hidantoína) y DL-metionina con KHCO₃ según el método G**

35 13,4 g (0,09 moles) de DL-metionina, 17,2 g (0,09 moles, pureza: 91 %) de metionina-hidantoína (IIId) y 9,1 g (0,09 moles) de KHCO₃ se disolvieron en 150 ml de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 5 horas a 150°C, aumentando la presión hasta 12 bares. Después de haberse terminado la reacción, se enfrió el autoclave, la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron y la solución resultante se concentró por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 120 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,3 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 16,0 g (57,1 mmol) (63 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), material sólido de color blanco, pureza > 99 % (según la HPLC).

45 Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 16:

50 **Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de la amida de ácido 2-amino-4-(metiltio)-butanoico (IIc) (amida de metionina) y de DL-metionina con (NH₄)₂CO₃ según el método H**

55 8,3 g (0,045 moles) del hidrocloreuro de la amida de ácido 2-amino-4-(metiltio)butanoico (IIc), 6,7 g (0,045 moles) de metionina, 4,3 g (0,045 moles) de (NH₄)₂CO₃ y 3,0 g (0,045 moles) de KOH al 85 % se disolvieron en 75 g de agua y se agitaron en un autoclave de acero Roth que tenía una capacidad de 200 ml, equipado con un sistema de agitación magnética, durante 6 horas a 160°C. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se lavó con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron, se concentraron por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 70 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,3 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 7,8 g (27,8 mmol) (62 %) de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 17:

5 **Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 2-hidroxi-4-(metiltio)butanonitrilo (Ile) (cianhidrina de aldehído (3-metilmercapto)propiónico, MMP-CH) y de DL-metionina con NH₄HCO₃ según el método H**

15,2 g (0,116 moles) de 2-hidroxi-4-(metiltio)-butanonitrilo (Ile) se añadieron gota a gota lentamente a la TA a una suspensión de 11,1 g (0,141 moles = 1,22 equivalentes) de NH₄HCO₃ en 10 g de agua y se agitó durante 2 h. El NH₄HCO₃ se disolvió en este caso. A continuación, se añadieron 180 g de agua y la solución obtenida se agitó durante 7 h a 50°C y durante una noche a la temperatura ambiente. A la mañana siguiente se añadieron 17,3 g (0,116 moles) de metionina, 7,7 g (0,116 moles) de KOH al 85 % así como otros 180 g de agua y la mezcla de reacción se transfirió a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 1 l, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se lavó con 100 ml de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron, y la solución resultante se concentró por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 160 ml. El concentrado se neutralizó con precaución con ácido sulfúrico al 50 %. A un valor del pH de 5,4, durante la agitación a lo largo de una noche a la temperatura ambiente, precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 15,2 g (54,2 mmol) (47 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), un material sólido de color blanco, pureza > 99 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

25 Ejemplo 18:

Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de 2-amino-4-(metiltio)butanonitrilo (IIf) (nitrilo de metionina) con CO₂ y DL-metionina según el método H

30 En una solución de 26,2 g (0,201 moles) de 2-amino-4-(metiltio)butanonitrilo (IIf) en 330 g de agua se introdujo una corriente moderada de CO₂ durante un período de tiempo de 3 horas, aumentando la temperatura a 45°C y pendulando el valor del pH alrededor de 8. A continuación, se continuó agitando durante una noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se mezcló a la mañana siguiente con 30,0 g (0,201 moles) de metionina y 13,3 g (0,201 moles) de KOH al 85 % y se transfirió a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 1 l, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se lavó con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron, y se concentraron por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 280 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,0 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 32,7 g (116,6 mmol) (58 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), un material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

45 Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 19: (no es conforme al invento)

50 **Síntesis de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) a partir de aldehído 3-(metiltio)propanoico (IIg) (MMP) con ácido cianhídrico, carbonato de amonio y DL-metionina según el método J**

66,0 g (0,68 moles) de (NH₄)₂CO₃ se dispusieron previamente en 100 g de agua y se enfriaron en el baño de hielo a 5°C. A continuación, en el transcurso de 25 minutos, se añadieron gota a gota 16,55 g (0,612 moles) de ácido cianhídrico recién destilado, manteniéndose la temperatura de la suspensión a 5 hasta 10°C. Después de la adición de 500 g de agua, se añadieron gota a gota 60,3 g (0,58 moles) del aldehído 3-(metiltio)propanoico (IIg) durante un período de tiempo de 80 minutos a 10°C. El valor del pH permaneció en este caso constante en el intervalo de 8,5 a 9. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 50°C y se agitó durante 7 horas a esta temperatura. Después de haberse terminado la reacción, la mezcla de reacción se enfrió en el baño de hielo a 5°C y se almacenó durante una noche en la nevera. A la mañana siguiente se añadieron 86,5 g (0,58 moles) de ácido 2-amino-4-(metiltio)butanoico (metionina), 38,3 g (0,58 moles) de KOH al 85 % (0,58 moles), así como otros 530 g de agua. La mezcla se transfirió a un autoclave de acero que tenía una capacidad de 2 l, se calentó a 160°C y se agitó durante 6 horas a esta temperatura. Después de esto, el autoclave se enfrió en el baño de hielo, la suspensión obtenida se separó por filtración y la 3,6-bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III) (metionina-dicetopiperazina, DKP) precipitada se lavó con un poco de agua. Las aguas madres y el agua de lavado se reunieron y se concentraron por

evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 800 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,0 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. Rendimiento: 85,1 g (0,30 moles) (52 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), un material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 20: (no es conforme al invento)

Separación de los dos pares de diastereoisómeros DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) y DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I) mediante una cristalización fraccionada a partir de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) según el método K

a) DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I):

290,4 g de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I) (una mezcla 50:50 a base de DD/LL-I y DL/L-I) se suspendieron en 2.614 g de agua VE y se ajustó a un pH de 0,6 con 381,7 g de ácido sulfúrico al 50 %. La solución transparente, incolora, se ajustó a un pH de 5,6 con 265,9 g de una solución de amoníaco al 32 % en peso y el precipitado de color blanco resultante (580,9 g, húmedo) se filtró con succión. Finalmente, el material sólido se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento fue de 126,2 g (86,9 %) de la DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I), un material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC), intervalo de puntos de fusión 232-233°C (con descomposición).

¹H-RMN de la DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): 1,88-2,12 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,031 (s, 3H, CH₃); 2,041 (s, 3H, CH₃); 2,48-2,56 (m, 4H, 2 x SCH₂); 3,87-3,95 (m, 1H, CH); 4,30-4,38 (m, 1H, CH); 8,429 (d, 3H, ³J = 4,4 Hz, NH₃⁺); 9,034 (d, 1H, ³J = 8,0 Hz, NH)

¹³C-RMN de la DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I) (125,8 MHz, D₆-DMSO + HCl): 14,57 (CH₃); 14,62 (CH₃); 28,19; 29,75; 30,28; 31,19; 51,25 (CH); 51,79 (CH); 168,29 (CONH); 172,80 (COOH)

Solubilidad (agua, 20°C): 0,4 g/l

b) DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I):

Las aguas madres incoloras procedentes de a) se concentraron en el evaporador rotatorio a 35°C y en el vacío de una bomba de agua. Se obtuvo una suspensión de color blanco. El material sólido de color blanco, a base de sulfato de amonio, de unos restos de la DL/LD-I y del compuesto diana, se filtró con succión seguidamente y se secó en vacío a 50°C. Para la separación de los tres materiales sólidos, la mezcla se suspendió en agua VE y se extrajo por agitación. La DL/LD-I no disuelta se filtró con succión y las aguas madres se concentraron en el evaporador rotatorio a 50°C y en el vacío de una bomba de agua hasta aproximadamente una quinta parte. Después de haber dejado reposar durante un prolongado período de tiempo, la DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) cristalizó como un material sólido de color blanco. Finalmente, se filtró con succión y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C. El rendimiento fue de 78,2 g (53,9 %) referido a la DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I), de un material sólido de color blanco, > 96 % (según la HPLC), intervalo de puntos de fusión 226-227°C (con descomposición).

¹H-RMN de la DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): 1,84-2,12 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,044 (s, 3H, CH₃); 2,046 (s, 3H, CH₃); 2,48-2,62 (m, 4H, 2 x SCH₂); 3,89-3,97 (m, 1H, CH); 4,33-4,40 (m, 1H, CH); 8,422 (d, 3H, ³J = 4,4 Hz, NH₃⁺); 9,065 (d, 1H, ³J = 7,5 Hz, NH)

¹³C-RMN de la DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) (125,8 MHz, D₆-DMSO + HCl): 14,56 (CH₃); 14,57 (CH₃); 27,97; 29,73; 30,35; 31,11; 51,22 (CH); 51,50 (CH); 168,41 (CONH); 172,83 (COOH)

Solubilidad (en agua, a 20°C): 21,0 g/l

Ejemplo 21: (no es conforme al invento)

Racemización de los dos pares de diastereoisómeros DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) y DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I) en condiciones básicas

A) Racemización de DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I)

12,6 g (45,0 mmol) del par de diastereoisómeros DL/LD-metionil-metionina (DL/LD-I) se disolvieron en común con 3,1 g (22,5 mmol) de K₂CO₃ en un reactor de laboratorio Roth que tenía una capacidad de 200 ml en 75 ml de agua

y se calentaron a 160°C mediando agitación. La presión aumentó en este caso hasta 7 bares. Después de 6 horas a esta temperatura, el autoclave se enfrió en el baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el material sólido separado por filtración se lavó múltiples veces con agua y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento aislado fue de 6,5 g (24,8 mmol) (55 %) de bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 %, punto de fusión 234-236°C; relación de los diastereoisómeros: 52:48 (DD/LL-III : meso-III). El agua de lavado y las aguas madres se reunieron y se concentraron por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 25 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado el valor del pH de 6,0 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 5,7 g (20,3 mmol) (45 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), un material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

a) Racemización de DL/LD-metionil-metionina (DD/LL-I)

12,6 g (45,0 mmol) de DD/LL-metionil-metionina (DD/LL-I) se disolvieron en común con 4,5 g (45,0 mmol) de KHCO₃ en un reactor de laboratorio Roth que tenía una capacidad de 200 ml en 75 ml de agua y se calentaron a 160°C mediando agitación. La presión aumentó a 7 bares, después de 6 horas a esta temperatura, el autoclave se enfrió en el baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el material sólido separado por filtración se lavó múltiples veces con agua y se secó en la estufa de desecación a 50°C en vacío. El rendimiento aislado fue de 6,0 g (22,9 mmol) (51 %) de bis[2-(metiltio)etil]-2,5-piperazinadiona (III), cristales de color amarillento blancuzco, pureza > 98 % (según la HPLC), punto de fusión 233-236°C, relación de los diastereoisómeros: 54:46 (DD/LL-III : meso-III). El agua de lavado y las aguas madres se reunieron y se concentraron por evaporación en el evaporador rotatorio a 40°C hasta llegar a un volumen de 25 ml. En la solución obtenida se introdujo a continuación una corriente moderada de CO₂, hasta que se hubo alcanzado un valor del pH de 6,0 y precipitó un material sólido de color blanco. Éste se separó por filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó en la estufa de desecación en vacío a 50°C durante una noche. El rendimiento aislado fue de 5,5 g (19,6 mmol) (44 %) de la DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I), un material sólido de color blanco, pureza > 98 % (según la HPLC).

Los datos de RMN coincidieron con los del Ejemplo 8.

Ejemplo 22:

Ensayos de digestión *in vitro* de DL-metionil-DL-metionina (I) con unas enzimas de digestión procedentes de carpas omnívoras

a) Aislamiento de las enzimas de digestión a partir de carpas espejo (*Cyprinus carpio morpha noblis*)

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo apoyándose en el método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para esto, se dejaron al descubierto los intestinos de cinco carpas espejo (*Cyprinus carpio morpha noblis*) de un año de edad, se enjuagaron con agua, se cortaron longitudinalmente y en cada caso la mucosa intestinal se separó por raspadura. Ésta se desmenuzó en común con hielo triturado con un aparato mezclador. La suspensión resultante se trató con una barra de ultrasonidos, con el fin de disgregar las células que estaban todavía intactas. Para la separación de los componentes celulares y de la grasa se centrifugó la suspensión durante 30 minutos a 4°C, el material homogeneizado se separó por decantación y se esterilizó con una traza de timerosal. A partir de 5 carpas espejo se obtuvieron 260,7 ml de una solución de enzimas de la mucosa intestinal, y la solución se almacenó a 4°C en la oscuridad.

b) Realización de las investigaciones *in vitro*

La DL-Metionil-DL-metionina (I) o respectivamente los correspondientes pares de diastereoisómeros DD/LL-I y DL/LD-I se recogieron en una solución tamponadora de TRIS/HCl y se mezclaron con la solución de enzimas. Como comparación y para la estimación de la velocidad del desdoblamiento puramente químico se estableció en cada caso un valor a ciegas sin ninguna solución enzimática. De vez en cuando se extrajo una muestra y se detectó y cuantificó su composición con ayuda de una HPLC calibrada. El grado de conversión se determinó como el cociente del área de superficie de la metionina y del área de superficie de la metionil-metionina (I) (véanse las Figuras 6 y 7).

Tabla 1

		Muestra	Valor a ciegas
Carga previa	Substrato Met-Met (I)	0,143 mmol (40,1 mg)	0,143 mmol (40,1 mg)
	Solución tamponadora de TRIS/HCl, de pH 9,5	5,7 ml	8,3 ml
Iniciación de la reacción	solución de enzimas ($\hat{=}$ 5 % de una solución procedente de carpas)	2,6 ml	---
Reacción		37°C	37°C
Interrupción de la reacción	0,2 ml de la solución de reacción se recogieron en 9,8 ml de una solución al 10 % de H ₃ PO ₄ .		

5 Ejemplo 23:

Ensayos de digestión *in vitro* de DL-metionil-DL-metionina (I) con unas enzimas de digestión procedentes de truchas carnívoras

10 a) Aislamiento de las enzimas de digestión a partir de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo apoyándose en el método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para esto, se dejaron al descubierto los intestinos de seis truchas arcoíris de un año de edad (*Oncorhynchus mykiss*) y se trataron como se ha descrito en el Ejemplo 22.

15 b) Realización de las investigaciones de digestión *in vitro*

Las investigaciones de digestión *in vitro* se llevaron a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 22 (véanse las Figuras 8 y 9).

20

Tabla 2

		Muestra	Valor a ciegas
Carga previa	Substrato Met-Met (I)	0,143 mmol (40,1 mg)	0,143 mmol (40,1 mg)
	Solución tamponadora de Tris/HCl, de pH 9,5	5,7 ml	9,8 ml
Iniciación de la reacción	solución de enzimas ($\hat{=}$ 10 % de una solución procedente de truchas)	4,2 ml	---
Reacción		37°C	37°C
Interrupción de la reacción	0,2 ml de la solución de reacción se recogieron en 9,8 ml de una solución al 10 % de H ₃ PO ₄ .		

25 Ejemplo 24:

Ensayos de digestión *in vitro* de DL-metionil-DL-metionina (I) con unas enzimas de digestión procedentes de camarones omnívoros

30 a) Aislamiento de las enzimas de digestión a partir de camarones patiblanco (*Litopenaeus Vannamei*)

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo apoyándose en el método de Ezquerria y Garcia-Carreño (J. Food Biochem. 1999, 23, 59-74). Para esto, se extrajeron los hepatopáncreas a partir de cinco kilogramos de

camarones patiblancos (*Litopenaeus Vannamee*) y se desmenuzaron en común con hielo triturado con un mezclador. El tratamiento ulterior se llevó a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 22.

b) Realización de las investigaciones de digestión *in vitro*

5 Las investigaciones de digestión *in vitro* se llevaron a cabo de una manera análoga a la del Ejemplo 22 (véanse las Figuras 10 y 11).

10 **Tabla 3**

		Muestra	Valor a ciegas
Carga previa	Substrato Met-Met (I)	0,143 mmol (40,1 mg)	0,143 mmol) (40,1 mg)
	Solución tamponadora de TRIS/HCl, de pH 9,5	5,7 ml	7,9 ml
Iniciación de la reacción	solución de enzimas ($\hat{=}$ 2 camarones)	2,2 ml	---
Reacción		37°C	37°C
Interrupción de la reacción	0,2 ml de la solución de reacción se recogieron en 9,8 ml de una solución al 10 % de H ₃ PO ₄ .		

Ejemplo 25:

15 **Biotransformación de D- en L-metionina con enzimas procedentes de los intestinos, del hígado y del páncreas de carpas espejo**

a) Aislamiento de las enzimas de digestión a partir de carpas espejo (*Cyprinus carpio morpha noblis*)

20 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo apoyándose en el método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para esto, se dejaron al descubierto los intestinos de seis carpas espejo de un año de edad (*Cyprinus carpio morpha noblis*) y se trataron como se ha descrito en el Ejemplo 22. Para el aislamiento de las enzimas del hígado se aislaron los hígados, se homogeneizaron y se trataron de una manera análoga a la elaboración de las enzimas de los intestinos en el Ejemplo 22. Se procedió de una manera análoga a ésta con el aislamiento de las enzimas a partir del páncreas.

25 b) Realización de la biotransformación *in vitro* de D- en L-metionina

30 La D-metionina se recogió en una solución tamponadora y se mezcló con la solución de enzimas. Como comparación y para la estimación de la velocidad de transformación puramente química se estableció en cada caso un valor a ciegas sin ninguna solución de enzimas. Después de 24 horas se extrajo una muestra y se detectó y cuantificó su composición con ayuda de una HPLC calibrada. El grado de conversión se determinó como el cociente del área de superficie de la L-metionina y del área de superficie de la D-metionina (véase la Figura 4).

35 **Tabla 4**

		Muestra	Valor a ciegas
Carga previa	Substrato D-metionina	0,143 mmol (21,3 mg)	0,143 mmol) (21,3 mg)
	Solución tamponadora	11,7 ml	23,4 ml
Iniciación de la reacción	cóctel de enzimas ($\hat{=}$ solución de carpa al 5 %)	11,7 ml	---
Reacción		37°C	37°C
Interrupción de la reacción	0,2 ml de la solución de reacción se recogieron en 9,8 ml de una solución al 10 % de H ₃ PO ₄ .		

Soluciones tamponadoras:

Tampón de citrato: pH 5, pH 6 y pH 7

Tampón de fosfato: pH 8

Tampón de TRIS/HCl: pH 9

5

Cóctel de enzimas a base de unas enzimas de los intestinos, del hígado y del páncreas ($\hat{=}$ solución de carpa al 5 %).

2,6 ml de una solución de enzimas procedentes de la mucosa intestinal

3,5 ml de una solución de enzimas procedentes del hígado

10 5,6 ml de una solución de enzimas procedentes del páncreas

Ejemplo 26

15 **Comportamiento de lixiviación de las mezclas de diastereoisómeros de metionil-metionina LL/DD/LD/DL-I, DD/LL-I o respectivamente DL/LD-I a partir de gránulos de pienso en comparación con DL-metionina, MHA y calcio-MHA**

Mezcla de piensos:

20 Como matriz de piensos se utilizó un mezcla de piensos que es deficiente en metionina a base de unos ingredientes habituales tales como p.ej. un material molido de soja, aceite de soja, almidón de maíz, harina de trigo, harina de pescado, celulosa, aminoácidos esenciales cristalinos, y minerales y vitaminas en forma de unas mezclas previas. Esta mezcla se suplementó a continuación en tandas de 20 kg en cada caso con los derivados de metionina que se exponen en la Tabla 5, con una tasa de suplementación de 0,25 % (referida a los derivados de azufre), se homogeneizó y a continuación se granuló mediando un tratamiento con vapor. Como comparación con la metionil-metionina (I) se realizó en cada caso un ensayo de granulación con DL-metionina, MHA (un compuesto análogo a la metionina hidroxilado) y calcio-MHA. Como ensayo testigo se llevó a cabo además una granulación sin la adición de un derivado de metionina (véase la Tabla 5).

25

Tabla 5

Nº	Derivado de metionina	Pureza (% en peso)	Masa molar (del monómero)	Cantidad pesada
1	sin ningún aditivo	---	---	0,00 g
2	DL-metionina	99,0 %	149,21	50,61 g
3	MHA	88,0 %	150,19	57,14 g
4	calcio-MHA (MHA-Ca)	93,3 %	169,22	60,77 g
5	DD/LL/DL/LD-metionil-metionina (I)	99,7 %	140,20	47,13 g

30

Durante todo el proceso de granulación y el tratamiento con vapor, todos los diastereoisómeros de la metionil-metionina (I) permanecieron estables (véase la Tabla 6).

Tabla 6

Muestra		Mezcla de piensos no suplementada	Mezcla de piensos suplementada con Met-Met (I)	Gránulos de piensos, suplementados con Met-Met (I)
Parámetro				
CP	%	18,64	18,88	18,45
DM	%		85,58	86,58
MET	%	0,28	0,47	0,51
CYS	%	0,32	0,32	0,30
MET+CYS	%	0,59	0,79	0,81
LYS	%	1,00	0,99	0,98
THR	%	0,67	0,70	0,67
ARG	%	1,16	1,19	1,17
ILE	%	0,75	0,79	0,74
LEU	%	1,54	1,60	1,51
VAL	%	0,88	0,90	0,85
HIS	%	0,47	0,51	0,48
PHE	%	0,91	0,92	0,88
GLY	%	0,78	0,81	0,77
SER	%	0,89	0,94	0,90
ALA	%	0,89	0,93	0,89
ASP	%	1,74	1,75	1,70
GLU	%	3,62	3,79	3,58
MET-MET (I)	Ex		0,156	0,153
MET	Ex		0,017	0,022
LYS	Ex		0,092	0,104

(Ex: componentes solubles)

- 5 En este caso, la determinación de los aminoácidos se llevó a cabo apoyándose en el método de EU 98/64/EC. Después de la extracción de los aminoácidos libres y de la metionil-metionina (I), éstos se determinaron a continuación con ayuda de un analizador de aminoácidos mediante una derivatización posterior a la columna con ninhidrina (véase la Tabla 6).
- 10 A continuación, se investigó el comportamiento de lixiviación de los diastereoisómeros de metionil-metionina (I) a partir de los gránulos de pienso debajo del agua. En este caso, se determinó la extracción por disolución de la metionil-metionina bajo el agua en dependencia del tiempo, de la temperatura y de la composición del agua (agua salada o dulce). Para esto, se añadieron 20,0 g de los gránulos de pienso a una bolsa de tamiz de malla estrecha y se sumergieron totalmente en un matraz Erlenmeyer con 200 g de agua. A continuación, todo el matraz Erlenmeyer fue movido continuamente a una temperatura constante de 20°C con un aparato sacudidor de laboratorio. En intervalos definidos de tiempo se extrajo entonces en cada caso una muestra de agua y se determinó el contenido de los pares individuales de diastereoisómeros de metionil-metionina en agua mediante una HPLC (véase la Tabla 7).

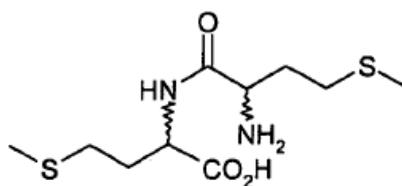
Tabla 7

Tiempo	Metionina	MHA	MHA-Ca	LL/DD-I	DL/LD-I	LL/DD/LD/DL-I
0	4,0%	6,0%	8,6%	2,7%	0,6%	1,5%
5	12,0%	12,8%	16,5%	3,7%	0,7%	2,0%
10	16,0%	20,8%	28,2%	6,5%	0,9%	3,2%
15	24,0%	28,8%	39,4%	7,7%	0,6%	3,6%
30	39,9%	50,5%	61,7%	12,1%	0,6%	5,4%
60	59,9%	75,4%	82,4%	20,6%	1,7%	9,5%
120	79,8%	94,1%	94,1%	27,4%	1,7%	12,3%
210	87,8%	99,9%	97,0%	35,9%	3,8%	17,0%

Como comparación se investigaron en las mismas condiciones en cada caso los gránulos de pienso, que habían sido suplementados con DL-metionina, MHA o respectivamente calcio-MHA, y de esta manera se determinó su comportamiento de lixiviación bajo el agua en las respectivas condiciones (véanse la Figura 5 y la Tabla 7).

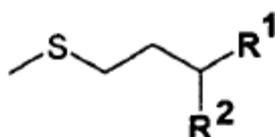
REIVINDICACIONES

1. Utilización de DL-metionil-DL-metionina y de sus sales como un aditivo para piensos en mezclas de piensos para unos animales criados en cultivos acuáticos, prefiriéndose como sales las de unos cationes escogidos entre el conjunto de los de metales alcalinos y alcalinotérreo así como los de amonio, Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} .
2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, conteniendo la mezcla de piensos de 0,01 a 5 % en peso, de manera preferida de 0,05 a 0,5 % en peso de la DL-metionil-DL-metionina.
3. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, conteniendo la mezcla de piensos proteínas e hidratos de carbono, de manera preferida constituidas/os sobre la base de harina de pescado, soja o maíz, y pudiendo estar suplementada con aminoácidos esenciales, proteínas, péptidos, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, grasas y aceites.
4. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, presentándose la DL-metionil-DL-metionina a solas o en forma de una sal como una mezcla de los diastereoisómeros DD/LL/DL/LD, como una mezcla de los diastereoisómeros DL/LD o DD/LL, de manera preferida en cada caso adicionalmente en mezcla con DL-metionina, de manera preferida con una proporción de DL-metionina de 0,01 a 20 % en peso, de manera especialmente preferida de 1 a 10 % en peso.
5. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 4, presentándose la DL-metionil-DL-metionina como el par de enantiómeros DL/LD-metionil-metionina.
6. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 5, realizándose que los animales criados en cultivos acuáticos son unos peces y crustáceos de agua dulce y de agua salada, de manera preferida escogidos entre el conjunto formado por las carpas, las truchas, los salmones, los siluros, las percas, las platijas, los esturiones, los atunes, las anguilas, las bremas, los bacalaos, los camarones, el krill y las gambas, muy especialmente para carpas plateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpas herbívoras (*Ctenopharyngodon idella*), carpas escamosas comunes (*Cyprinus carpio*) y carpas de cabeza grande (*Aristichthys nobilis*), carassios (*Carassius carassius*), catlas (*Catla Catla*), rohu labeo (*Labeo rohita*), salmones del Océano Pacífico y del Océano Atlántico (*Salmon salar* y *Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), siluro americano (*Ictalurus punctatus*), siluro africano (*Clarias gariepinus*), tiburones pangasios (*Pangasius bocourti* y *Pangasius hypothalamus*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), pez de leche (*Chanos chanos*), cobia (*Rachycentron canadum*), camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*), camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) y gamba de río gigante (*Macrobrachium rosenbergii*).
7. Procedimiento para la preparación de DL-metionil-DL-metionina (I) con la fórmula



(I)

- mediando una conversión química de un derivado de urea de la fórmula general II,



(II)

estando definidos los radicales R^1 y R^2 en los derivados de urea Ila, I Ib, I Ic, I le y I lf como sigue:

significando en **Ila:** $R^1 = \text{COOH}$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

5 **Ilb:** $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

Ilc: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NH}_2$

Ile: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{OH}$

10 **Ilf:** $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{NH}_2$

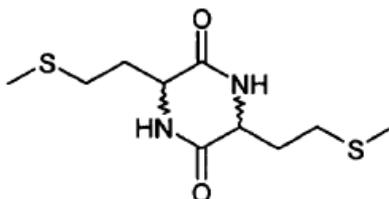
para dar la DL-metionil-DL-metionina.

15 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, siendo ajustado el valor del pH de la solución que contiene el derivado de urea a 8 hasta 14, de manera especialmente preferida a 10 hasta 13.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, efectuándose la conversión química a una temperatura de 50 a 200°C, de manera preferida a una temperatura de 80 a 170°C y de manera especialmente preferida a una temperatura de 130 a 160°C, y/o llevándose a cabo la conversión química bajo presión, de manera preferida a una presión de 3 a 20 bares, de manera especialmente preferida a una presión de 6 a 15 bares.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 que abarca las siguientes etapas:

25 a) Una conversión química del derivado de urea de acuerdo con las fórmulas **Ila**, **Ilb**, **Ilc**, **Ile** y **Ilf** para dar una dicetopiperazina (**III**) de la fórmula



(III)

b) Una conversión química de la dicetopiperazina (**III**) para dar la DL-metionil-DL-metionina (**I**)

30 y en este caso la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina se lleva a cabo a una temperatura de 50°C a 200°C, de manera preferida de 100°C a 180°C y de manera especialmente preferida de 140°C a 170°C.

35 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, llevándose a cabo la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina bajo presión, de manera preferida a una presión de 3 a 20 bares, de manera especialmente preferida a una presión de 6 a 15 bares.

40 12. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11, efectuándose la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina en presencia de una base, y escogiéndose la base en este caso de manera preferida entre el conjunto formado por unas bases nitrogenadas, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, KHCO_3 , K_2CO_3 , una mezcla de NH_4OH y CO_2 , unas sales carbamatos y unas bases de metales alcalinos y alcalinotérreos.

45 13. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 12, efectuándose la conversión química del derivado de urea para dar la dicetopiperazina mediante una reacción con metionina.

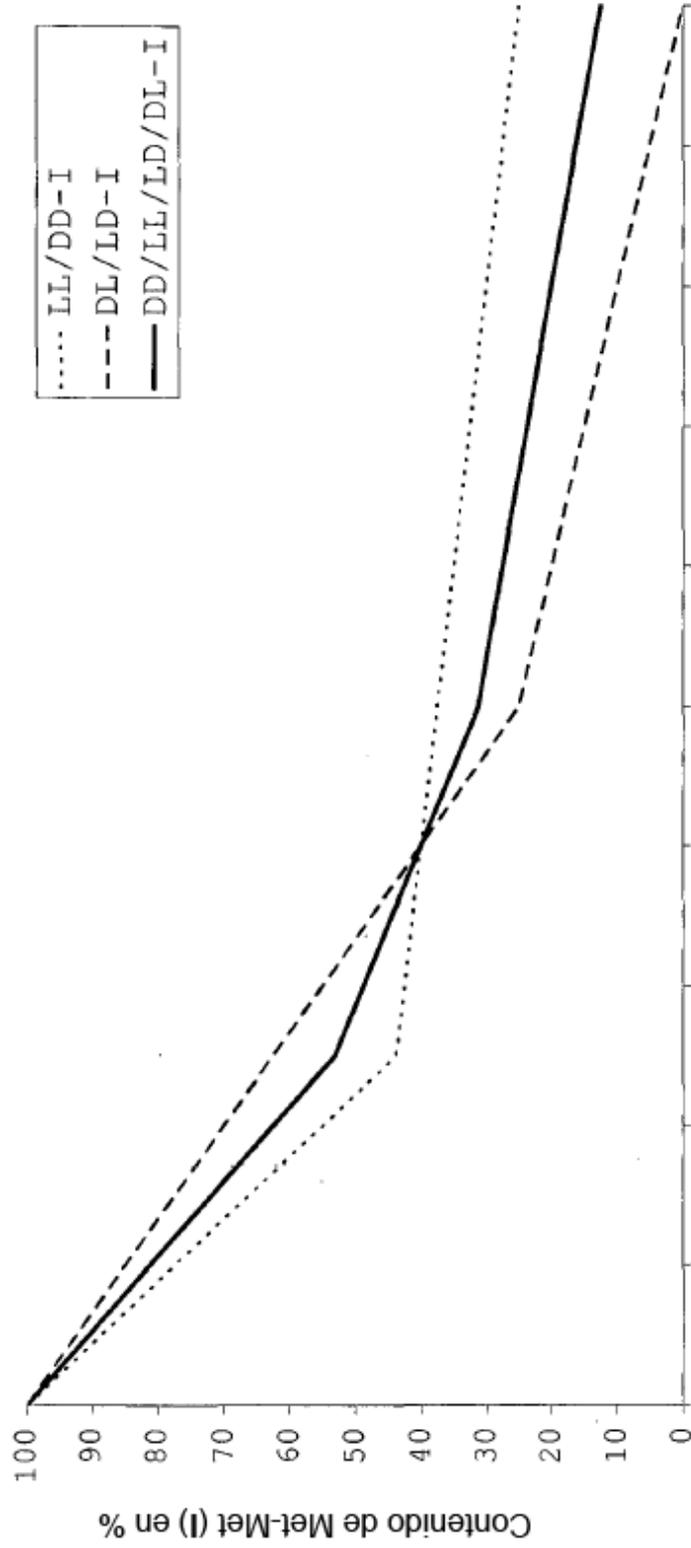
50 14. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 13, efectuándose la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina mediante una hidrólisis en condiciones ácidas, y efectuándose la hidrólisis en condiciones ácidas de manera preferida en este caso en presencia de un ácido, que se escoge entre el conjunto formado por los ácidos inorgánicos, HCl , H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , los ácidos fosfóricos, los ácidos carboxílicos y los ácidos hidroxicarboxílicos.

15. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 13, efectuándose la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina mediante una hidrólisis en condiciones básicas y efectuándose la hidrólisis en condiciones básicas de manera preferida en este caso a un pH de 7 a 14, de manera

especialmente preferida a un pH de 9 a 12, de manera muy especialmente preferida a un pH de 10 a 11, con el fin de obtener la DL-metionil-DL-metionina.

- 5 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, siendo ajustadas las condiciones básicas mediante utilización de una sustancia escogida entre el conjunto formado por unas bases nitrogenadas, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, una mezcla de NH_4OH y CO_2 , unas sales carbamatos, KHCO_3 , K_2CO_3 , unos carbonatos, unas bases de metales alcalinos y unas bases de metales alcalinotérreos.
- 10 17. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 hasta 16, llevándose a cabo la conversión química a una temperatura de 50°C a 200°C , de manera preferida de 80°C a 180°C y de manera especialmente preferida de 90°C a 160°C .
- 15 18. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 13, efectuándose la conversión química de la dicetopiperazina para dar la DL-metionil-DL-metionina mediante introducción de CO_2 en una solución de carácter básico, de manera preferida en una solución de carácter básico de hidróxido de amonio, potasio o sodio.
- 20 19. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 18, siendo aislada la dicetopiperazina antes de la hidrólisis y siendo aislada, en este caso, la dicetopiperazina de manera preferida mediante una cristalización a partir de la solución de reacción, de manera preferida a una temperatura de -30 a 120°C , de manera especialmente preferida a una temperatura de 10 a 70°C .
- 25 20. Procedimiento para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina mediante una cristalización desde unas soluciones de reacción de carácter básico, que se habían obtenido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 hasta 13 y 15 hasta 19.
- 30 21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, siendo ajustada la solución con un ácido a un valor del pH de 5 a 9, de manera preferida a un valor del pH de 5 a 7, de manera preferida a un valor del pH de aproximadamente 5,6.
- 35 22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, efectuándose la cristalización en presencia de un ácido, escogido entre el conjunto formado por los ácidos inorgánicos HCl , H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , los ácidos fosfóricos, los ácidos carboxílicos y los ácidos hidroxicarboxílicos.
- 40 23. Procedimiento para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros a base de DD/LL/DL/LD-metionil-metionina mediante una cristalización desde unas soluciones de reacción de carácter ácido, que se habían obtenido de acuerdo con la reivindicación 14, y siendo ajustada la solución en este caso con una base a un valor del pH de 5 a 9, de manera preferida a un valor del pH de 5 a 7, de manera especialmente preferida a un valor del pH de aproximadamente 5,6.
- 40 24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, siendo escogida la base entre el conjunto formado por NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, unas bases nitrogenadas, NH_4OH , unas sales carbamatos, KHCO_3 , K_2CO_3 , unos carbonatos, y unas bases de metales alcalinos o alcalinotérreos.

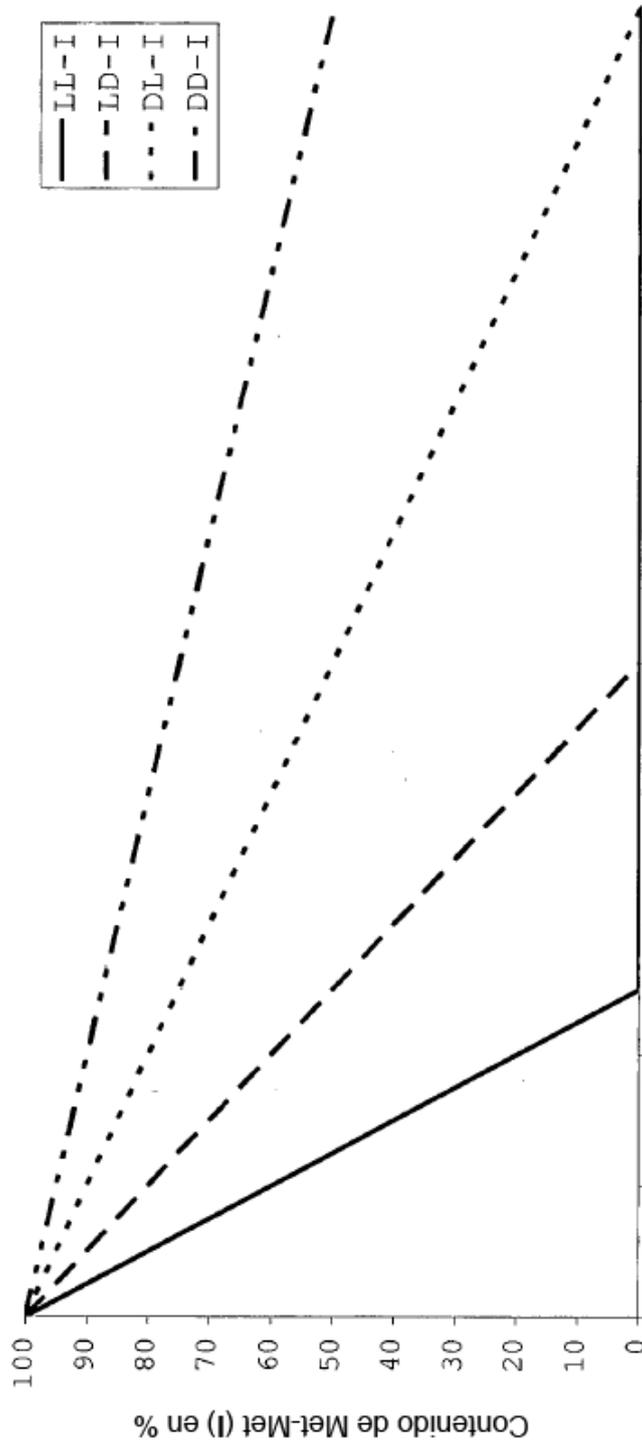
Representación esquemática del desdoblamiento enzimático de las mezclas de diastereoisómeros de metionilmetionina DD/LL-I, DL/LD-I y DD/LL/LD/DL-I



Periodo de tiempo de digestión en minutos

Figura 1

Representación esquemática del desdoblamiento enzimático de los cuatro diastereoisómeros de metionilmetionina DD-I, LL-I, DL-I y LD-I con diferentes velocidades de desdoblamiento



Periodo de tiempo de digestión en minutos

Figura 2

Representación esquemática de la liberación de metionina (D- y L-Met en común) a partir de los cuatro diastereoisómeros de metionilmetionina DD-I, LL-I, DL-I y LD-I

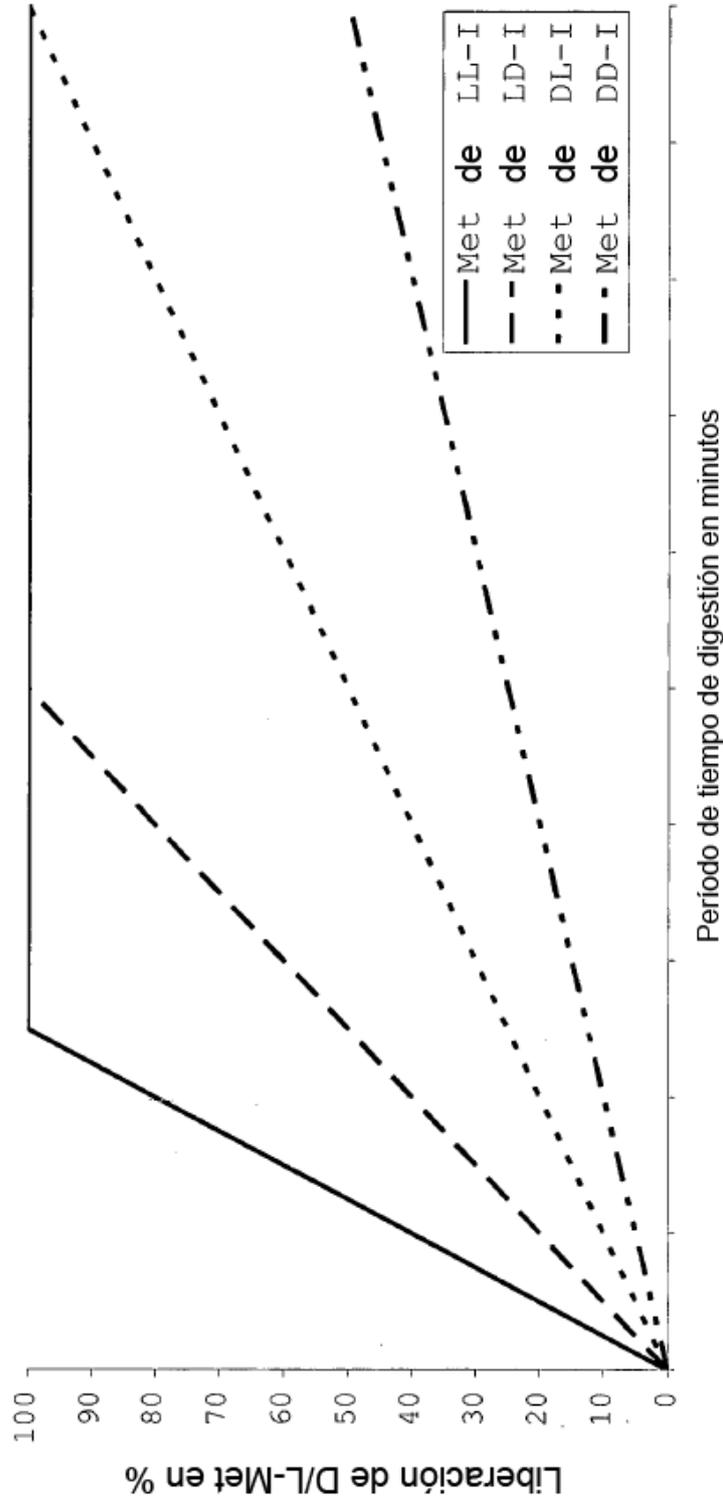
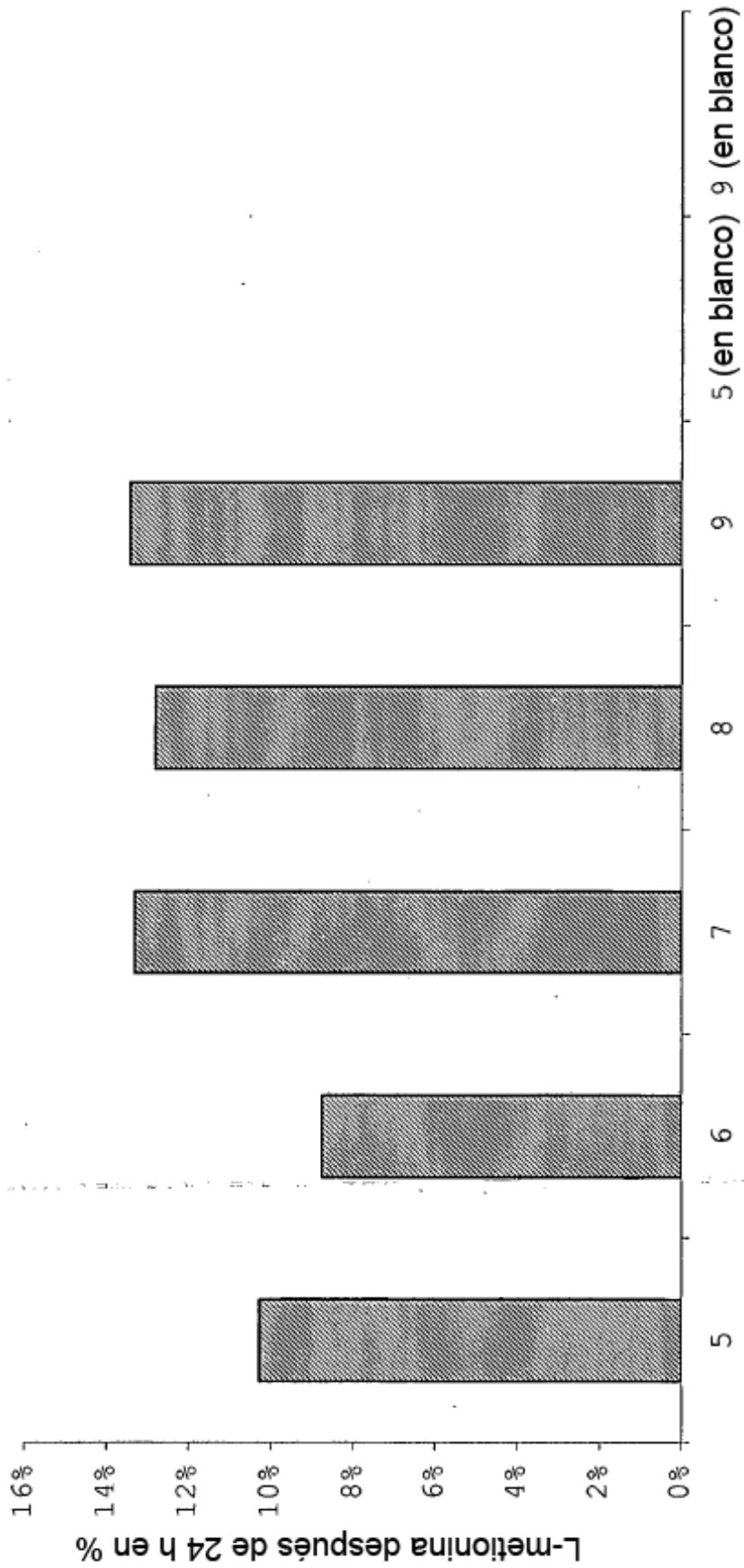


Figura 3

Biotransformación de D-metionina en L-metionina con un cóctel de enzimas procedente de carpas espejo



valor del pH

Figura 4

Comportamiento de lixiviación de las mezclas de diastereoisómeros de metionilmetionina DD/LL-I, DL/LD-I y LL/DD/LD/DL-I en comparación con metionina, MHA y MHA-Ca

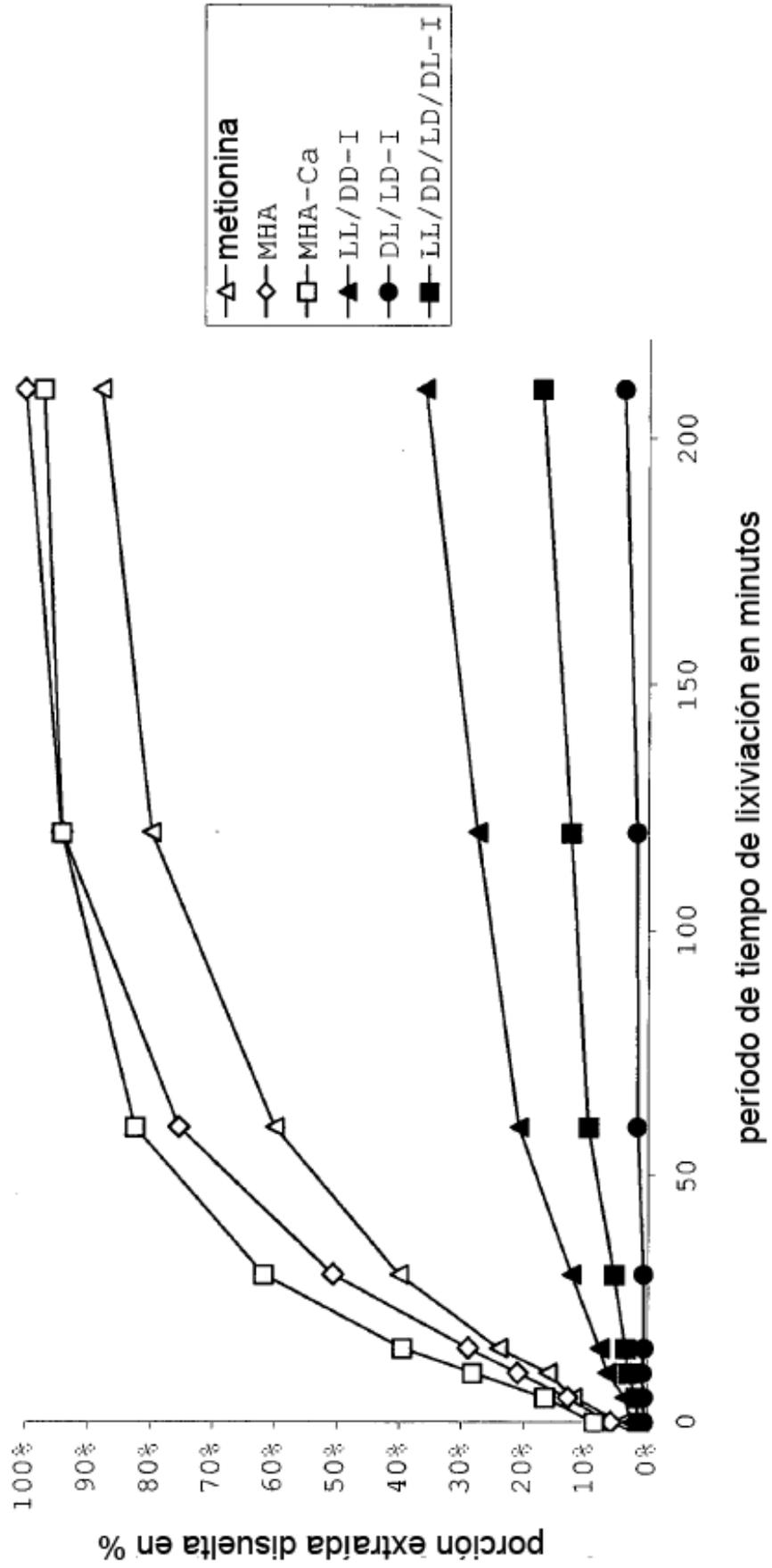
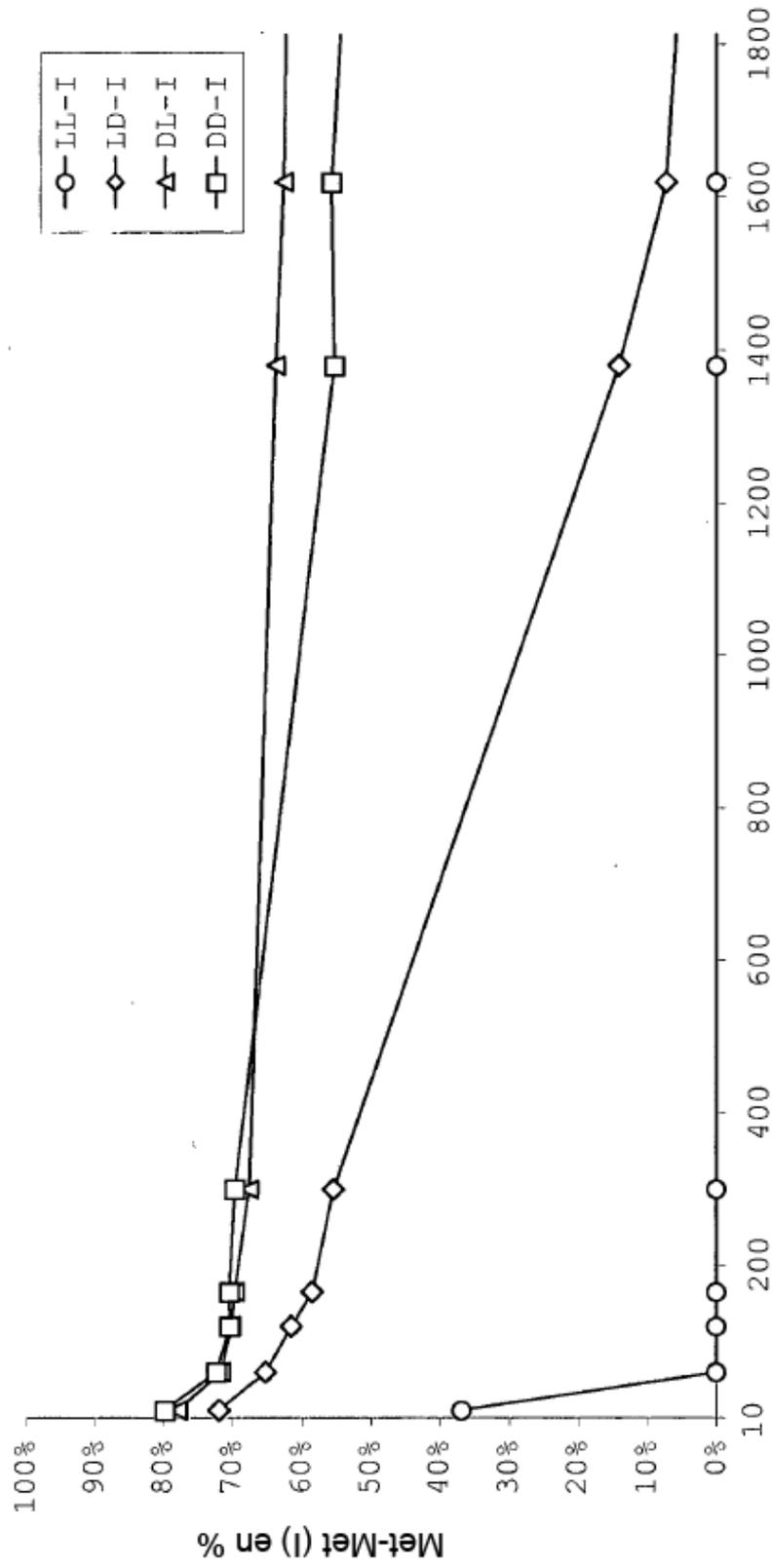


Figura 5

Digestión in vitro de cuatro diastereoisómeros diferentes de metionilmetionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con enzimas de digestión de la carpa espejo



Periodo de tiempo de digestión en minutos

Figura 6

Digestión in vitro de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionilmetionina LL/DD-I, DL/LD-I y LL/DD/LD/DL-I con enzimas de digestión de la carpa espejo

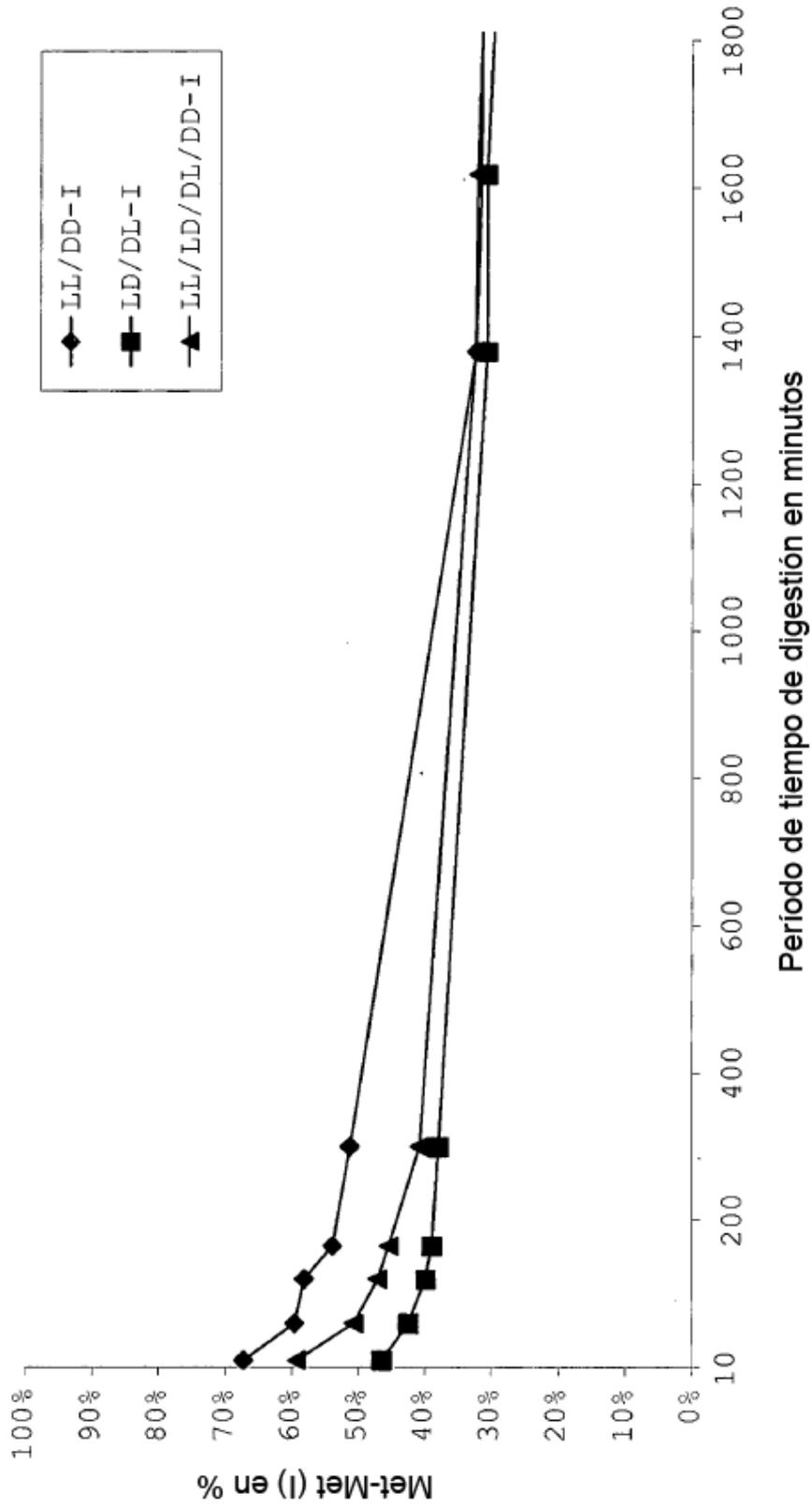


Figura 7

Digestión in vitro de cuatro diastereoisómeros diferentes de metionilmetionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con enzimas de digestión de la trucha arcoiris

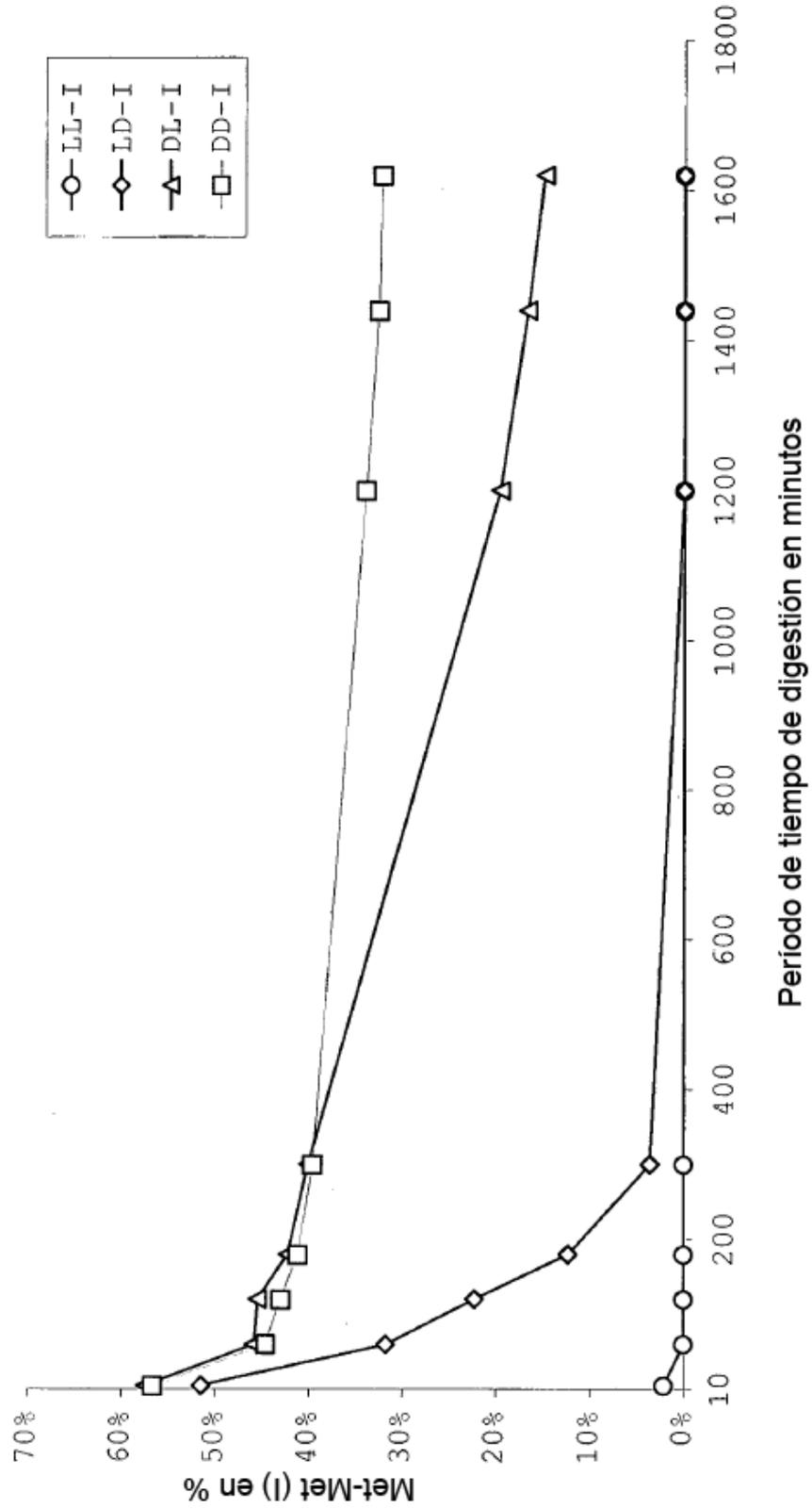


Figura 8

Digestión in vitro de las mezclas de diastereoisómeros de metionilmetionina LL/DD-I, DL/LD-I y LL/DD/LD/DL-I con enzimas de digestión de la trucha arcoiris

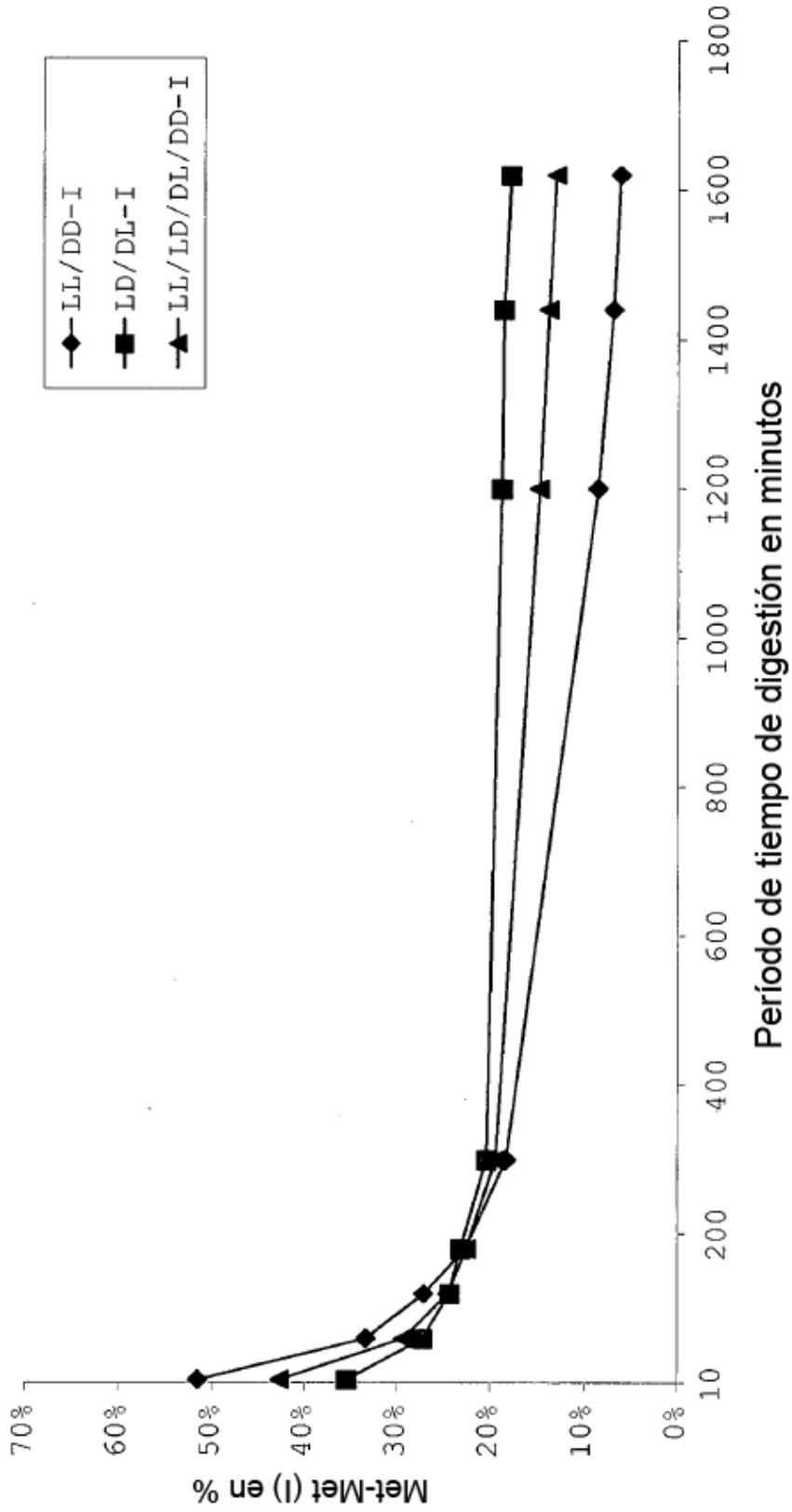


Figura 9

Digestión in vitro de cuatro diastereoisómeros diferentes de metionilmetionina LL-I, LD-I, DL-I y DD-I con enzimas de digestión del camarón patiblanco

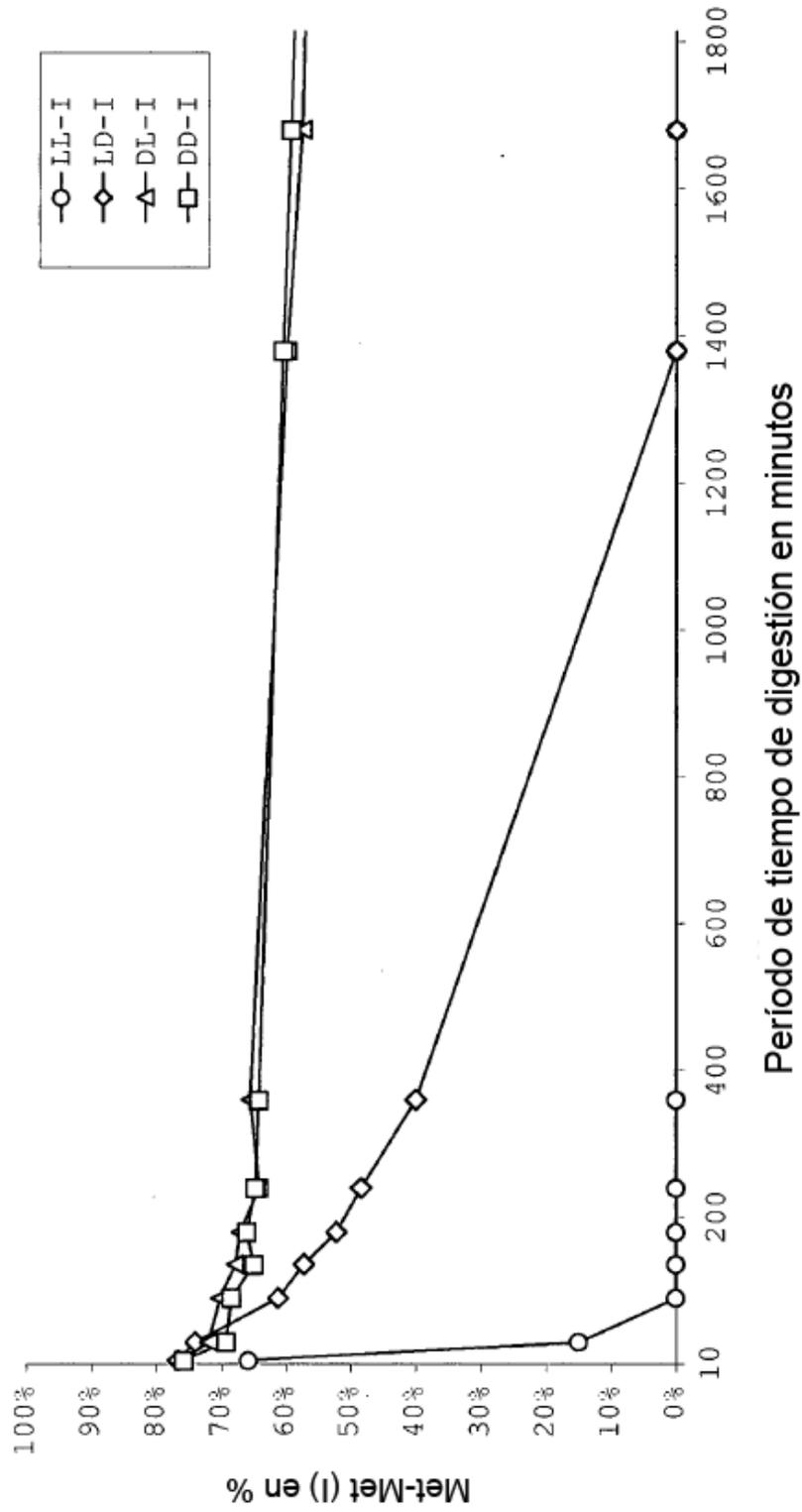


Figura 10

Digestión in vitro de diferentes mezclas de diastereoisómeros de metionilmetionina LL/DD-I, DL/LD-I y LL/DD/LD/DL-I con enzimas de digestión del camarón patiblanco

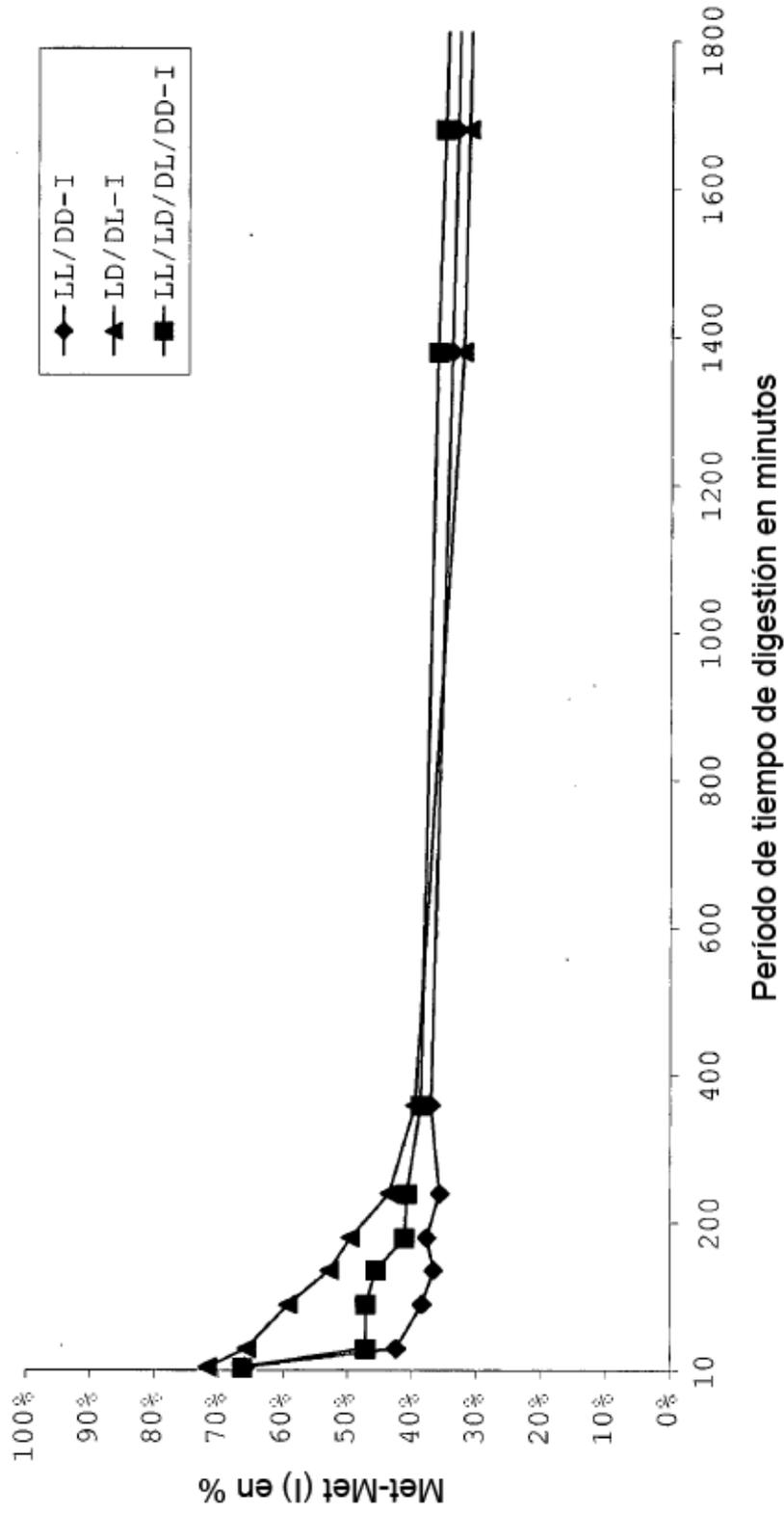


Figura 11