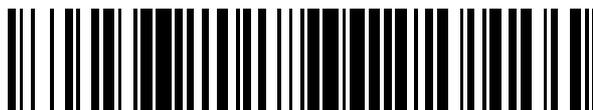


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 995**

51 Int. Cl.:

A23K 1/165 (2006.01)

A23K 1/17 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2010 E 10710031 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2413711**

54 Título: **Dipéptidos en calidad de aditivos para piensos**

30 Prioridad:

31.03.2009 DE 102009002044

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

23.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 511 995 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

Dipéptidos en calidad de aditivos para piensos

5 Introducción

La presente invención se refiere a nuevos dipéptidos no naturales y naturales unidos a metionina de aminoácidos esenciales tales como, p. ej., lisina, treonina y triptófano, los aminoácidos que contienen azufre cisteína y cistina, así como su síntesis y uso como aditivos para piensos para la alimentación de animales útiles tales como gallinas, cerdos, rumiantes, pero, en particular, también peces y crustáceos de acuicultura.

Estado conocido de la técnica

Los aminoácidos esenciales (EAA – siglas en inglés) metionina, lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y arginina, así como los dos aminoácidos con contenido en azufre cisteína y cistina son componentes muy importantes en piensos y juegan un papel importante en la crianza industrial de animales útiles tales como gallinas, cerdos y rumiantes. En particular, una óptima distribución y el suministro suficiente de EAAs son decisivos. Dado que los alimentos de fuentes de proteínas naturales tales como, p. ej., soja, maíz y trigo, es generalmente deficitaria en determinados EAAs, la suplementación preestablecida con EAAs sintéticos tales como, por ejemplo, DL-metionina, L-lisina, L-treonina o L-triptófano posibilita, por una parte, un crecimiento más rápido de los animales o bien una mayor producción de leche de vacas lecheras de alto rendimiento, pero, por otra parte, el aprovechamiento más eficiente del pienso en conjunto. Esto representa una ventaja económica muy grande. Los mercados de los aditivos para piensos son de gran importancia industrial y económica. Además son fuertes mercados en desarrollo, atribuible sobre todo a la creciente importancia de países como, por ejemplo, China e India.

Para muchas especies animales L-metionina (ácido (S) -2-amino-4-metilbutírico) representa el primer aminoácido limitante de todos los EAAs y, por lo tanto, juega uno de los papeles más importantes en la alimentación animal y como aditivo para piensos (Rosenberg et al., J. Agr. Food Chem. 1957, 5, 694-700). En la síntesis química clásica, sin embargo, la metionina precipita en forma de racemato, una mezcla 50:50 de D- y L-metionina. Este DL-metionina racémica puede, sin embargo, emplearse directamente como aditivo para piensos, ya que en algunas especies de animales en condiciones *in vivo* existe un mecanismo de conversión que transforma el D-enantiómero no natural de metionina en el L-enantiómero natural. La D-metionina se desamina primero con ayuda de una D-oxidasa no específica para formar α -ceto-metionina y, a continuación, continúa convirtiéndose con una L-transaminasa en L-metionina (Baker, D.H. en "Amino acids in farm animal nutrition", D 'Mello, J.P.F. (comp.), Wallingford (Reino Unido), CAB International, 1994, 37-61). Con ello aumenta la cantidad disponible de L-metionina en el organismo, que puede entonces estar disponible para el animal para su crecimiento. La conversión enzimática de D- en L-metionina se ha encontrado en gallinas, cerdos y vacas, pero también, en particular, en peces, camarones y langostinos. Por ejemplo, Sveier et al. (Aquacult. Nutr. 2001, 7 (3), 169-181) y Kim et al. (Aquaculture 1992, 101 (1-2), 95-103) demuestran que la conversión de D- en L-metionina es posible en salmones del Atlántico y truchas arco iris carnívoros. Lo mismo pudo ser demostrado por Robinson et al. (J. Nutr. 1978, 108 (12), 1932-1936) y Schwarz et al. (Aquaculture 1998, 161, 121-129) para especies de peces omnívoros, por ejemplo el bagre y la carpa. Además, Forster y Dominy (J. World Aquacul. Soc. 2006, 37 (4), 474-480) fueron capaces de demostrar, en ensayos de alimentación de camarones omnívoros de la especie *Litopenaeus vannamei*, que DL-metionina posee la misma eficacia que L-metionina. En el año 2007, se produjeron en todo el mundo más de 700.00 toneladas de DL-metionina cristalina o bien racémica, análogo de metionina hidroxilíquido (MHA, ácido *rac*-2-hidroxi-4-(metiltio)butanoico (HMB)) y MHA cálcico sólido y se emplearon con éxito directamente como aditivo en piensos para animales monogástricos, p. ej., aves de corral y cerdos.

A diferencia de metionina, de lisina, treonina y triptófano sólo se pueden utilizar en cada caso los enantiómeros L como aditivos para piensos, dado que los respectivos enantiómeros D de estos tres aminoácidos esenciales y limitantes no pueden ser convertidos por el organismo en condiciones fisiológicas en los correspondientes enantiómeros L. Por lo tanto, sólo el mercado mundial para L-lisina, el primer aminoácido limitante, por ejemplo en el caso de cerdos, para el año 2007 fue de más de un millón de toneladas. Para los otros dos aminoácidos esenciales limitantes L-treonina y L-triptófano el mercado mundial en 2007 era de más de 100.000 t y un poco menos de 3000 t, respectivamente.

En el caso de animales monogástricos tales como, p. ej., aves de corral y cerdos, habitualmente DL-metionina, MHA, pero también L-lisina, L-treonina y L-triptófano se utilizan directamente como aditivo para piensos. A diferencia de ello, la suplementación del pienso con EAAs tales como metionina, lisina, treonina o también MHA no es eficaz en el caso de los rumiantes, ya que la mayoría es degradada por microbios en el rumen de los rumiantes. En virtud de esta degradación, sólo una fracción de los EAAs suplementados accede al intestino delgado del animal, en donde, generalmente, tiene lugar la absorción en la sangre. Entre los EAAs, ante todo la metionina juega un papel decisivo en los rumiantes, dado que sólo en el caso de un abastecimiento óptimo se garantiza una alta producción de leche. Con el

fin de que la metionina pueda estar disponible para el rumiante con alta eficacia, debe emplearse una forma protegida estable en el rumen. Existen varias posibilidades de impartir estas propiedades a DL-metionina o *rac*-MHA. Una posibilidad consiste en lograr una alta estabilidad en el rumen mediante la aplicación de una capa protectora adecuada o mediante la distribución de la metionina en una matriz protectora. De esta forma, la metionina puede pasar a través del rumen prácticamente sin pérdida alguna. En el transcurso posterior, la capa protectora se retira a continuación, p. ej., en el abomaso por hidrólisis ácida y la metionina que se libera puede entonces ser absorbida en el intestino delgado del rumiante. Productos comercialmente disponibles son, p. ej., Mepron® de la razón social Evonik Degussa y Smartamine™ de la razón social Adisseo. La producción y/o el revestimiento de metionina representan generalmente un proceso técnicamente complicado y complejo y es, por lo tanto, caro. Además, el revestimiento de la superficie de los gránulos acabados puede ser fácilmente dañado por solicitación mecánica y la abrasión durante el procesamiento del pienso, que puede conducir a la reducción o incluso a la pérdida completa de la protección. Por lo tanto, tampoco es posible procesar los gránulos de metionina protegidos en un gránulo de pienso mixto mayor, ya que con ello de nuevo se rompería la capa de protección por la solicitación mecánica. Esto limita el uso de este tipo de productos. Otra posibilidad para aumentar la estabilidad en el rumen es la derivatización química de metionina o MHA. En este caso, los grupos funcionales de la molécula se derivatizan con grupos protectores adecuados. Esto puede tener lugar, p. ej., por esterificación de la función ácido carboxílico con alcoholes. Con ello se puede reducir la degradación en el rumen por parte de los microorganismos. Un producto adquirible en el comercio con protección química es, por ejemplo, Metasmart™, el éster *iso*-propílico *racémico* de MHA (HMBi). En el documento WO00/28835 se dio a conocer un valor biológico de al menos 50% para HMBi en rumiantes. El inconveniente de la derivatización química de metionina o bien MHA consiste, a menudo, en la peor biodisponibilidad y en el contenido de sustancia activa comparativamente bajo.

Junto a la problemática de la degradación en el rumen de EAAs suplementados tales como metionina, lisina o treonina en rumiantes, también puede haber, sin embargo, diferentes problemas en peces y crustáceos en la suplementación del pienso con EAAs. Debido al rápido desarrollo económico de la cría de peces y crustáceos en la acuicultura altamente industrializada, una posibilidad de suplementación óptima, rentable y eficaz de aminoácidos esenciales y limitantes adquiere, precisamente en este sector, en los últimos años un papel cada vez más importante (Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) Departamento de Pesca "State of World Aquaculture 2006", 2006, Roma. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias (IFPRI) "Fish 2020: Supply and Demand in Changing Markets", 2003, Washington, D.C.). Sin embargo, a diferencia de gallinas y cerdos, pueden surgir diversos problemas cuando se utiliza EAAs cristalinos como aditivos de pienso para determinadas especies de peces y crustáceos. Así, Rumsey y Ketola (J. Fish. Res. Bd. Can. 1975, 32, 422-426), informan que el uso de harina de soja en combinación con aminoácidos suplementados, cristalinos individualmente no condujo a ningún aumento en el crecimiento en el caso de truchas arco iris. Murai et al. (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1984, 50 (11), 1957) fueron capaces de demostrar que la alimentación diaria de dietas de peces con altas proporciones de aminoácidos suplementados, cristalinos en la carpa conducían a que más del 40% de los aminoácidos libres fuesen excretados a través de las agallas y los riñones. Debido a la rápida resorción de aminoácidos suplementados poco después de la ingesta de pienso, se produce un aumento muy rápido en la concentración de aminoácidos en el plasma sanguíneo de los peces (respuesta rápida). En este momento, sin embargo, los otros aminoácidos procedentes de fuentes de proteínas naturales tales como, p. ej., harina de soja, aún no se encuentran en el plasma, lo cual puede conducir a un asincronismo de la disponibilidad simultánea de todos los aminoácidos importantes. Como consecuencia de ello, una parte de los aminoácidos altamente concentrados se excreta rápidamente o bien se metaboliza rápidamente en el organismo y se utiliza, p. ej., como pura fuente de energía. Con ello, en el caso de la carpa se produce sólo pequeño aumento, o ninguno, en el crecimiento cuando se utilizan aminoácidos cristalinos como aditivos para piensos (Aoe et al., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1970, 36, 407-413). En el caso de crustáceos, la suplementación de EAAs cristalinos también puede conducir a problemas adicionales. Debido a la lenta conducta de alimentación de determinados crustáceos tales como, p. ej., camarones de la especie *Litopenaeus vannamei*, se produce, como consecuencia del largo tiempo que el alimento permanece bajo el agua, el desprendimiento (lixiviación) de los EAAs suplementados, solubles en agua, lo que conduce a la eutrofización del agua y no a un aumento en el crecimiento de los animales (Alam et al., Aquaculture 2005, 248, 13-16). La manutención eficaz de los peces y crustáceos, que son mantenidos en la acuicultura, requiere, por tanto, para determinadas especies y aplicaciones, una forma de producto especial de los EAAs tal como, p. ej. una forma correspondientemente protegida química o físicamente. El objetivo es en este caso, por una parte, que el producto permanezca lo suficientemente estable durante la alimentación en el medio acuoso y no sea lixiviado del pienso. Por otra parte, que el producto de aminoácido ingerido finalmente por el animal puede aprovechado de manera óptima y con alta eficacia en el organismo animal.

En el pasado, se han hecho muchos esfuerzos por desarrollar aditivos para piensos adecuados, en especial sobre la base de los aminoácidos esenciales metionina y lisina, para peces y crustáceos. Así, por ejemplo el documento WO8906497 describe el uso de dipéptidos y tripéptidos como aditivo para piensos para peces y crustáceos. Con ello se debe fomentar el crecimiento de los animales. Sin embargo, en este caso pasaron a emplearse preferiblemente dipéptidos y tripéptidos de aminoácidos no esenciales y tampoco limitantes tales como, p. ej., glicina, alanina y serina, que están presentes, de manera más que suficiente, en muchas fuentes de proteínas vegetales. Como dipéptidos con

5 contenido en metionina sólo se describieron DL-alanil-DL-metionina y DL-metionil-DL-glicina. Sin embargo, con ello en el dipéptido sólo está contenido eficazmente el 50% de sustancia activa (mol/mol), lo cual debe considerarse como muy desfavorable bajo puntos de vista de rentabilidad. En el documento WO02088667 se describe la síntesis enantioselectiva y el uso de oligómeros a base de MHA y aminoácidos tales como, p. ej., metionina, como aditivos para piensos, entre otros, también para peces y crustáceos. Con ello debe poder alcanzarse un crecimiento más rápido. Los oligómeros descritos se constituyen por una reacción catalizada por enzimas y presentan una muy amplia distribución de la longitud de cadena de los oligómeros individuales. Con ello, el procedimiento no es selectivo, es costoso y complejo en su ejecución y purificación. Dabrowski et al. describen en el documento US20030099689 el uso de péptidos sintéticos como aditivos para piensos para fomentar el crecimiento de animales acuáticos. En este caso, los péptidos pueden representar una proporción en peso de 6-50% de la formulación total del pienso. Los péptidos sintéticos se componen preferiblemente de EAAs. La síntesis enantioselectiva de este tipo de oligopéptidos y polipéptidos sintéticos es, sin embargo, muy compleja, costosa y difícil de aplicar a gran escala. Además, se discute la eficacia de los polipéptidos de un aminoácido individual, ya que éste a menudo sólo se convierte en aminoácidos libres muy lentamente, o no lo hace, en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, Baker et al. (J. Nutr. 1982, 112, 1130-1132) describe que la poli-L-metionina, en virtud de su insolubilidad absoluta en agua, no presenta un valor biológico alguno en gallinas, ya que no es posible una resorción por el organismo.

20 Junto al empleo de nuevos derivados químicos de EAAs tales como, p. ej., péptidos y oligómeros con contenido en metionina, se han investigado también diferentes posibilidades de protección físicas tales como, p. ej., revestimientos o bien la embutición de un EAA en una matriz protectora. Por ejemplo, Alam et al. (Aquacult. Nutr. 2004, 10, 309-316 y Aquaculture 2005, 248, 13-19) demostraron que metionina y lisina recubierta, en contraposición a las no recubiertas, tienen una influencia muy positiva sobre el crecimiento de camarones jóvenes Kuruma. A pesar de que el uso de un revestimiento especial se pudo impedir la lixiviación de metionina y lisina a partir del gránulo de pienso, existen algunos inconvenientes graves. La producción o bien el revestimiento de aminoácidos representa la mayoría de las veces un proceso técnicamente complicado y laborioso y es, por lo tanto, caro. Además, el revestimiento de la superficie del aminoácido recubierto acabado puede ser fácilmente dañado por solcitación mecánica y la abrasión durante el procesamiento del pienso, lo cual puede conducir a una reducción o incluso a la pérdida completa de la protección física. A ello se añade el que mediante un revestimiento o el uso de una sustancia matriz se reduce el contenido del aminoácido y, con ello a menudo, se vuelve no rentable.

30 Misión de la invención

35 Un problema general era proporcionar un pienso o un aditivo para piensos para la alimentación animal, basado en una nueva sustancia sustitutiva con contenido en metionina, en la que la metionina está unida de forma covalente a un aminoácido esencial y limitante tal como, p. ej., L-lisina, L-treonina y L-triptófano, y que se puede utilizar como aditivos para piensos para la alimentación de animales útiles tales como gallinas, cerdos, rumiantes, pero, en particular, también de peces y crustáceos en la acuicultura.

40 Ante los antecedentes de las desventajas del estado conocido de la técnica, el problema era ante todo proporcionar un producto protegido químicamente a base de la combinación unida de forma covalente a base de DL-metionina más EAA tal como, p. ej., L-lisina, L-treonina o L-triptófano para diversos animales útiles tales como gallinas, cerdos y rumiantes, pero también para muchas especies omnívoras, herbívoras y carnívoras de peces y crustáceos, que viven en agua salada o agua dulce. Junto a su función como fuente de metionina, este producto también debe actuar como una fuente de todos los otros EAAs. En particular, este producto debería poseer un mecanismo de "liberación lenta", por lo tanto proporcionar una liberación lenta y continua de metionina libre y EAA en condiciones fisiológicas. Además, la forma de producto químicamente protegida a base de metionina y EAA debe ser estable en el rumen y, con ello, adecuada para todos los rumiantes. Para la aplicación como aditivo para piensos para peces y crustáceos la forma de producto debe tener un bajo comportamiento de solubilidad (lixiviación) del gránulo o bien producto extrudido del pienso total en agua.

50 Otro problema consistía en encontrar una sustancia sustitutiva de EAAs cristalinos como pienso o bien un aditivo para piensos con un muy alto valor biológico, que debe tener una buena aptitud para la manipulación y capacidad de almacenamiento, así como estabilidad en las condiciones habituales del procesamiento de piensos mixtos, en particular de granulación y extrusión.

55 De esta manera, debe proporcionarse por ejemplo a gallinas, cerdos, rumiantes, peces y crustáceos, junto a EAAs cristalinos, otras fuentes eficaces de aminoácidos esenciales, que, en la medida de lo posible, no presenten las desventajas de los productos conocidos o sólo lo hagan en una medida reducida.

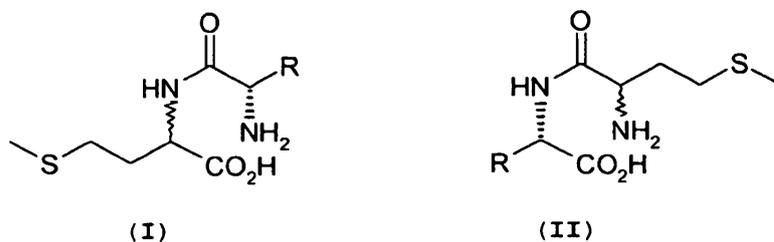
60 Además, deberían desarrollarse diversas vías de síntesis nuevas y flexibles para dipéptidos que contienen solamente un residuo metionina, en particular para L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II). Para una vía de síntesis deberían

utilizarse precursores y subproductos típicos del proceso de producción de DL-metionina comercial.

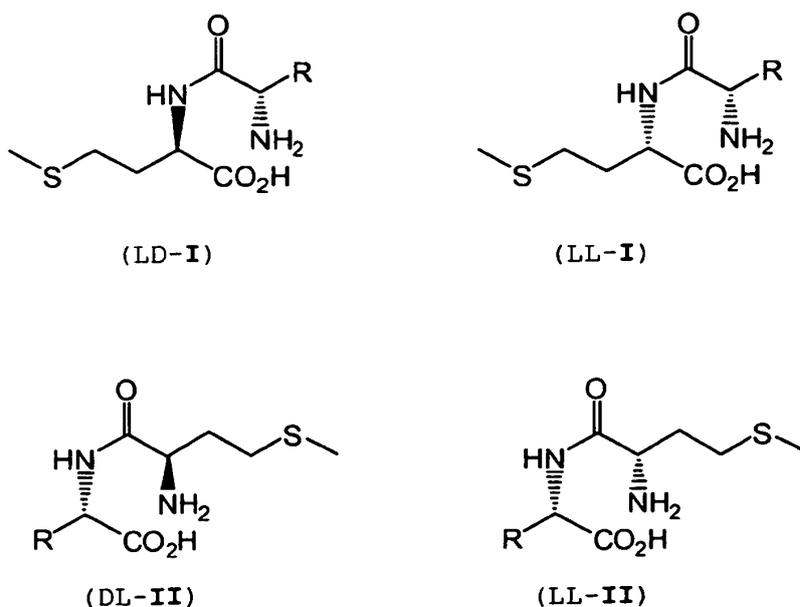
Descripción de la invención

- 5 El problema se resuelve con aditivos para piensos que contienen dipéptidos o sales de los mismos, en donde un residuo aminoácido del dipéptido es un radical DL-metionilo y el otro residuo aminoácido del dipéptido es un aminoácido en la configuración L seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.
- 10 De manera preferida, el aditivo para piensos contiene dipéptidos de la fórmula general DL-metionil-L-EAA (= mezcla a base de D-metionil-L-EAA y L-metionil-L-EAA) y/o L-EAA-DL-metionina (= mezcla a base de L-EAA-D-metionina y L-EAA-L-metionina), en donde L-EAA es un aminoácido en la configuración L seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.
- 15 Objeto de la invención es, además, una mezcla de piensos que contiene el aditivo para piensos mencionado.
- El aditivo para piensos que contiene L-EAA-DL-metionina y/o DL-metionil-L-EAA y sus sales es adecuado como aditivo para piensos en mezclas de piensos para aves de corral, cerdos, rumiantes, pero, en particular, también para peces y crustáceos en la acuicultura.
- 20 De manera preferida, la mezcla de piensos contiene 0,01 a 5% en peso, preferiblemente 0,05 a 0,5% en peso de L-EAA-DL-metionina y DL-metionil-L-EAA.
- El uso de L-EAA-DL-metionina y DL-metionil-L-EAA se ha manifestado en este caso particularmente ventajoso, debido a que estos dipéptidos presentan un buen comportamiento de lixiviación debido a la baja solubilidad.
- 25 Además, el compuesto muestra una buena estabilidad frente a la peletización y la extrusión en la producción de piensos. Los dipéptidos L-EAA-DL-metionina y DL-metionil-L-EAA son estables en mezclas con los componentes y piensos habituales tales como, p. ej., cereales (p. ej., maíz, trigo, triticale, cebada, mijo, entre otros), soportes de proteínas vegetales o animales (p. ej., soja y colza y sus productos de tratamiento posterior, leguminosas (p. ej., guisantes, judías, altramuces, etc.), harina de pescado, entre otros) y en combinación con aminoácidos esenciales suplementados, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, grasas y aceites.
- 30 Además, es ventajoso que debido a la alta proporción de sustancia activa de L-EAA-DL-metionina y DL-metionil-L-EAA por kg de sustancia, en comparación con DL-metionina y L-EAA, por cada mol de L-EAA-DL-metionina o bien DL-metionil-L-EAA se ahorra un mol de agua.
- 35 En un uso preferido, la mezcla de piensos contiene proteínas e hidratos de carbono, preferiblemente a base de harina de pescado, de soja o de maíz, y se puede complementar con aminoácidos esenciales, proteínas, péptidos, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, grasas y aceites.
- 40 En particular, es preferible que en la mezcla de piensos esté presente DL-metionil-L-EAA y L-EAA-DL-metionina, sola en forma de D-metionil-L-EAA, L-metionil-L-EAA, L-EAA-D-metionina o L-EAA-L-metionina, como mezcla entre sí o bien como mezcla con D-metionil-D-EAA, L-metionil-D-EAA, D-EAA-D-metionina o D-EAA-L-metionina, preferiblemente en cada caso adicionalmente en mezcla con DL-metionina, preferiblemente con una proporción de DL-metionina de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 0,1 a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 30% en peso, preferiblemente en cada caso adicionalmente en mezcla con un L-EAA tal como, por ejemplo, L-lisina, preferiblemente con una proporción de L-EAA de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 0,1 a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 30% en peso.
- 45 50 En un uso preferido, los animales criados en la acuicultura son peces y crustáceos de agua dulce y de agua salada seleccionados del grupo que comprende carpas, truchas, salmones, bagres, percas, lenguados, esturiones, atunes, anguilas, doradas, bacalaos, camarones, krill y gambas, de manera muy particular carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), carpa europea (*Cyprinus carpio*) y carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*), carpín (*Carassius carassius*), catla (*Catla catla*), labeo roho (*Labeo rohita*), salmón del Pacífico y del Atlántico (*Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), pez gato americano (*Ictalurus punctatus*), pez gato africano (*Clarias gariepinus*), panga (*Pangasius bocourti* y *Pangasius hypophthalmus*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), pez de leche (*Chanos chanos*), cobia (*Rachycentron canadum*), camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) y camarón gigante de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*).
- 55 60

Según la invención, L-EAA-DL-metionina (L-EAA-DL-Met) (I) y DL-metionil-L-EAA (DL-Met-L-EAA) (II) o sus sales alcalinas y alcalinotérreas tales como, p. ej. las sales de calcio o zinc escasamente solubles, se utilizan como aditivo en mezclas de piensos como D-metionil-L-EAA, L-metionil-L-EAA, L-EAA-D-metionina o L-EAA-L-metionina, o en las respectivas mezclas de diastereoisómeros, solas o en mezcla con DL-metionina, solas o en mezcla con L-EAA, preferiblemente para aves de corral, cerdos, ruminantes, y de manera particularmente preferida, para peces y crustáceos:



En este caso, de la L-EAA-DL-metionina (I) existen los dos diastereoisómeros L-EAA-D-Met (LD-I) y L-EAA-L-Met (LL-I). Del mismo modo, del dipéptido DL-metionil-L-EAA (II) hay en cada caso los dos estereoisómeros diferentes D-Met-L-EAA (DL-II) y L-Met-L-EAA (LL-II). En este caso, sólo los dos diastereoisómeros L-EAA-L-Met (LL-I) y L-Met-L-EAA (LL-II) son naturales, los otros dos L-EAA-D-Met (LD-I) y D Met-L-EAA (DL-II), sin embargo, son no naturales (véase el Esquema 1).



Esquema 1

En este caso, el residuo R del EAA significa:

15	la o bien IIa :	R = 1-metiletil-	(valina)
	lb o bien IIb :	R = 2-metilpropil-	(leucina)
	lc o bien IIc :	R = (1S)-1-metilpropil-	(isoleucina)
20	ld o bien II d :	R = (1R)-1-hidroxietyl	(treonina)
	le o bien IIe :	R = 4-aminobutil-	(lisina)
	lf o bien II f :	R = 3-[(aminoiminometil)amino]propil-	(arginina)
	lg o bien II g :	R = bencil-	(fenilalanina)
	lh o bien II h :	R = (1H-imidazol-4-il) metil-	(histidina)
25	lj o bien II j :	R = (1H-indol-3-il)metil-	(triptófano)

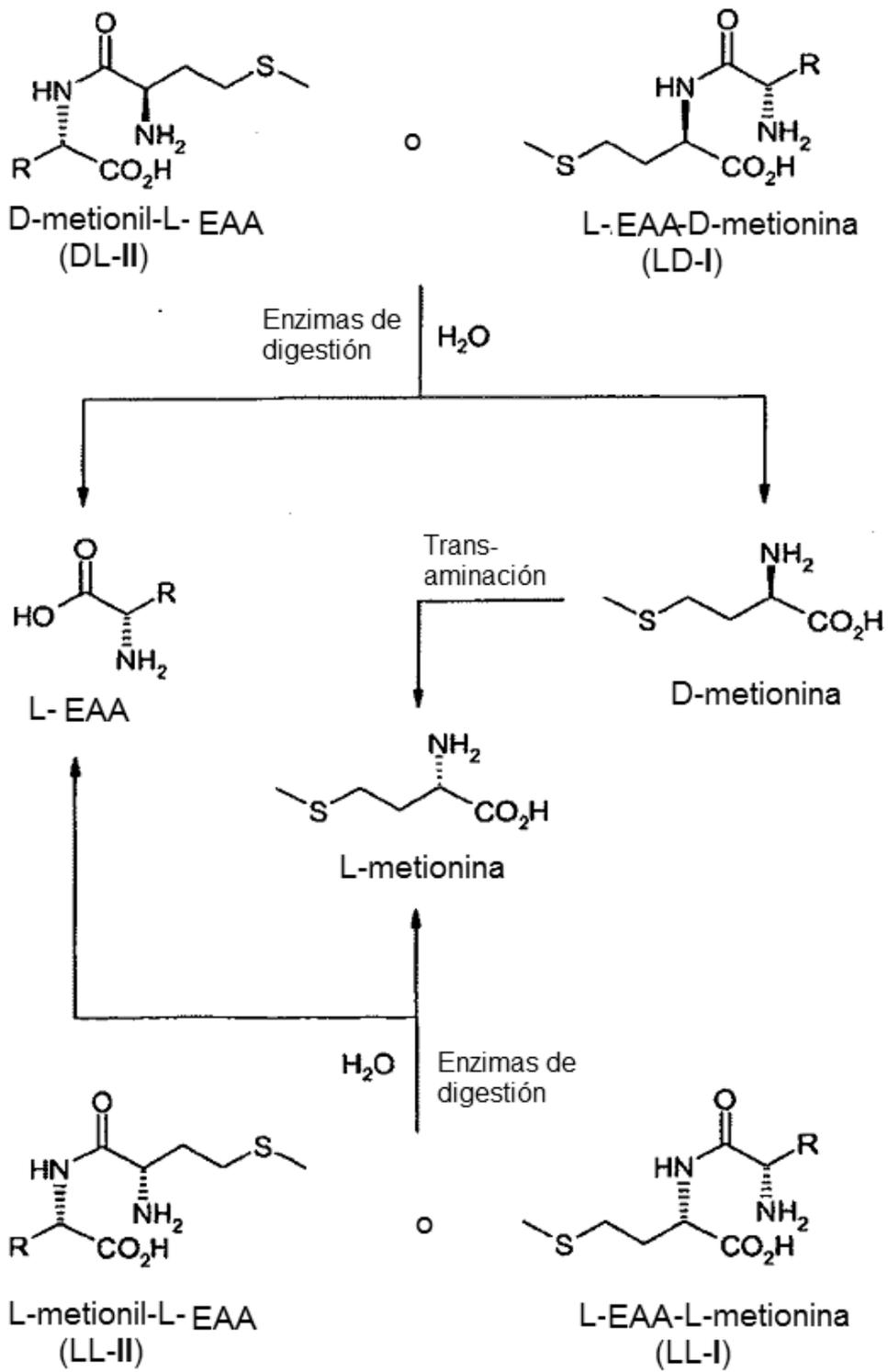
En este caso, los estereoisómeros L-EAA-D-metionina (LD-I), L-EAA-L-metionina (LL-I), D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-metionil-L-EAA (LL-II) pueden emplearse como aditivo para piensos, solos o en mezcla entre sí, preferiblemente para

aves de corral, cerdos, rumiantes, peces, crustáceos, y también para los animales domésticos.

5 Junto al desarrollo de una nueva vía de síntesis para la preparación de L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II), el objeto principal de la presente invención es el uso de I y II como mezcla de diastereoisómeros a base de una mezcla de D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-metionil-L-EAA (LL-II) o bien de una mezcla de L-EAA-D-metionina (LD-I) y L-EAA-L-metionina (LL-I) o en cada caso como diastereoisómero individual D-metionil-L-EAA (DL-II), L-metionil-L-EAA (LL-II), L-EAA-D metionina (LD-I) o L-EAA-L-metionina (LL-I) como promotor del crecimiento para aves de corral, cerdos, rumiantes, pero también para peces y crustáceos omnívoros, carnívoros y herbívoros en la acuicultura. Además, mediante el uso de L-EAA-DL-metionina (I) o DL-metionil-L-EAA (II) como aditivo para piensos, se puede aumentar la producción de leche de vacas lecheras de alto rendimiento.

10 Por lo tanto, se demostró, como una actividad inventiva, que L-EAA-DL-metionina (I) o bien DL-metionil-L-EAA (II) como una mezcla de diastereoisómeros a base de una mezcla 50:50 de L-EAA-D- metionina (LD-I) y L-EAA-L-metionina (LL-I) o bien de una mezcla 50:50 de D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-metionil-L-EAA (LL-II) o en cada caso como diastereoisómero individual puede escindir enzímicamente, en condiciones fisiológicas, de gallinas, cerdos, vacas, peces tales como, p. ej., carpas y truchas, pero también de crustáceos tales como, p. ej., *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) y *Macrobrachium rosenbergii* (camarón gigante de agua dulce) para formar D- o bien L-metionina libre, y en cada caso para formar L-EAA (véase el **Esquema 2**).

20 Para ello, se aislaron las enzimas digestivas correspondientes, por ejemplo de gallinas, carpas omnívoras, truchas carnívoras y camarones blancos omnívoros (*Litopenaeus vannamei*) y se hicieron reaccionar en ensayos *in vitro* optimizados bajo condiciones fisiológicamente equiparables con DL-metionil-L-EAA (II) como una mezcla de diastereoisómeros a base de una mezcla 50:50 de D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-metionil-L-EAA (LL-II) o bien L-EAA-DL-metionina (I) a base de una mezcla 50:50 de L-EAA-D-metionina (LD-I) y L-EAA-L-metionina (LL-I) o en cada caso como diastereoisómero individual D-metionil-L-EAA (DL-II), L metionil-L-EAA (LL-II), L-EAA-D-metionina (LD-I) o L-EAA-L-metionina (LL-I). La particularidad de acuerdo con la invención de la escisión de L-EAA-DL-metionina (I) o DL-metionil-L-EAA (II) estriba en que, junto a los dos diastereoisómeros naturales L-EAA-L-metionina (LL-I) y L-metionil-L-EAA (LL-II), también los dos diastereoisómeros no naturales L-EAA-D-metionina (LD-I) y D-metionil-L-EAA (DL-II) se pueden escindir en condiciones fisiológicas (véanse las **Figs. 1 a 17**). Esto se aplica tanto al uso de la mezcla de D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-metionil-L-EAA (LL-II), de la mezcla de D-metionil-L-EAA (DL-II) y L-EAA-D-metionina (LD-I) (véase la **Fig. 12**) o bien a la mezcla de L-metionil-L-EAA (LL-II) y L-EAA-D-metionina (LD-I) (véase la **Fig. 12**), pero también para la mezcla total de todos los diastereoisómeros, al igual que también en cada caso para los diastereoisómeros individuales (véanse las **Figs. 1 a 11 y 13 a 17**).



Esquema 2

Los dipéptidos naturales L-EAA-L-Met L (LL-I) y L-Met-L-EAA (LL-II) fueron digeridos con las enzimas de digestión de truchas arco iris carnívoras, carpas comunes omnívoras, camarones blancos omnívoros y gallinas (véase la **Tabla 1**).

Dipéptido \ Especie	Trucha (carnívora)	Carpa común (omnívora)	Camarón blanco (omnívoro)	Gallina (omnívora)
L-Met-L-Val (LL-IIa)	x	x	x	
L-Met-L-Leu (LL-IIb)	x	x	x	
L-Met-L-Ile (LL-IIc)	x	x	x	
L-Met-L-Thr (LL-IId)	x	x	x	
L-Met-L-Lys (LL-IIe)	x	x	x	
L-Met-L-Arg (LL-IIf)	x	x	x	
L-Met-L-Phe (LL-IIg)	x	x	x	
L-Met-L-His (LL-IIh)	x	x	x	
L-Met-L-Trp (LL-IIj)	x	x	x	
L-Val-L-Met (LL-Ia)	x	x	x	
L-Leu-L-Met (LL-Ib)	x	x	x	
L-Ile-L-Met (LL-Ic)	x	x	x	
L-Thr-L-Met (LL-Id)	x	x	x	x
L-Lys-L-Met (LL-Ie)	x	x	x	x
L-Arg-L-Met (LL-If)	x	x	x	
L-Phe-L-Met (LL-Ig)	x	x	x	
L-His-L-Met (LL-Ih)	x	x	x	
L-Trp-L-Met (LL-Ij)	x	x	x	

5

Tabla 1

Para ello, las enzimas fueron separadas de los tractos digestivos de los peces y camarones. Los dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-I) y L-Met-L-EAA (LL-II) se digirieron a continuación con las disoluciones enzimáticas obtenidas. Para una mejor comparabilidad de las digestibilidades de dipéptidos de diferentes especies, se seleccionaron las mismas condiciones para los ensayos de digestión *in vitro* (37°C, pH 9).

Todos los dipéptidos naturales son escindidos por las enzimas de digestión de la trucha arco iris carnívora (véanse las **Figs. 3 y 4**), de la carpa común omnívora (véanse las **Figs. 1 y 2**), del camarón blanco omnívoro (véanse las **Figs. 5 y 6**) y de la gallina (véase la **Fig. 16**). Las disociaciones de L-Met-L-EAA (LL-II) discurren, por regla general, algo más rápidamente que las disociaciones de los dipéptidos análogos L-EAA-L-Met (LL-I).

Con el fin de demostrar de la manera más completa posible la disociación enzimática de dipéptidos no naturales L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) por pares de enzimas de digestión de diversas especies de peces, se examinó una matriz experimental (véase la **Tabla 2**).

20

Especie	Dipéptido											
	D-Met-L-Trp (DL-IIj)	D-Met-L-Thr (DL-IIId)	D-Met-L-Lys (DL-IIe)	D-Met-L-Leu (DL-IIb)	D-Met-L-Ile (DL-IIc)	D-Met-L-Phe (DL-IIg)	L-Trp-D-Met (DL-Ij)	L-Thr-D-Met (DL-Id)	L-Lys-D-Met (DL-Ie)	L-Leu-D-Met (DL-Ib)	L-Ile-D-Met (DL-Ic)	L-Phe-D-Met (DL-Ig)
Trucha (carnívora)	x	x	x	x			x	x	x	x		
Carpa común (omnívora)	x	x	x		x		x	x	x		x	
Carpa herbívora (herbívora)	x	x	x			x	x	x	x			x
Camarón blanco (omnívoro)	x	x	x	x			x	x	x	x		
Tilapia (omnívora)	x		x				x		x			
Gallina (omnívora)		x	x		x			x	x		x	

Tabla 2

5 Para ello, las enzimas se aislaron de los tractos digestivos de los peces y camarones. Los dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) químicamente sintetizados se hicieron reaccionar luego con las disoluciones enzimáticas obtenidas. Para una mejor comparabilidad de las digestibilidades de dipéptidos de diversas especies, se eligieron las mismas condiciones para los ensayos de digestión *in vitro* (37°C, pH 9).

10 Todos los dipéptidos no naturales L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) son disociados por las enzimas de digestión de la carpa común omnívora (véase la Fig. 7), de la carpa herbívora (véase la Fig. 8), de la trucha arco iris carnívora (véase la Fig. 11), del camarón blanco omnívoro (véase la Fig. 10) y de la gallina (véase la Fig. 17). Las disociaciones de D-Met-L-EAA (DL-II) discurren algo más lentamente que las disociaciones de los dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) análogos. Con las enzimas de digestión de la Tilapia (véase la Fig. 9), por el contrario, los dipéptidos D-Met-L-EAA (DL-II) pudieron ser disociados más rápidamente que los dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I). Los dipéptidos D-Met-L-Lys (DL-IIe) y L-Lys-D-Met (LD-Ie) se digieren con especial rapidez. Después de sólo 5 horas, bajo condiciones de reacción *in vitro* pudo disociarse la mayor parte de los dipéptidos que contienen lisina por parte de todas las enzimas de digestión utilizadas.

20 Se desprende de los resultados obtenidos que cada uno de los dipéptidos no naturales empleado (véanse las Figs. 7 a 11 y 17) puede ser disociado con enzimas de digestión de diversas especies de peces, camarones y gallina. En este caso, mediante el empleo de enzimas de truchas arco iris carnívoras, carpas comunes omnívoras, tilapias, camarones blancos, carpas herbívoras, así como gallina, se demostró que los dipéptidos no naturales L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) pueden ser disociados *in vitro* por todos los animales que están dotados de sistemas de digestión claramente diferentes. Mediante la adición de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y/o D-Met-L-EAA (DL-II) al pienso, pueden por lo tanto aportarse dosificadamente de manera preestablecida aminoácidos esenciales deficientes (DL-Met y L - EAA).

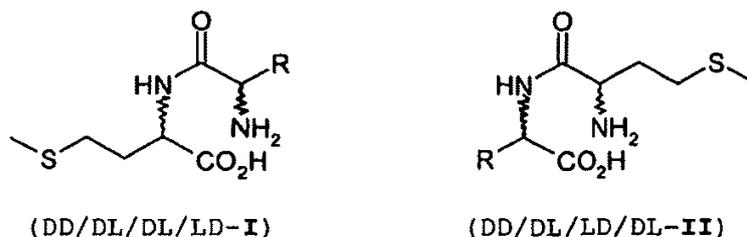
La disociación de mezclas de dipéptidos a base de dipéptidos naturales y no naturales se investigó en el ejemplo de los dipéptidos a partir de los aminoácidos L-triptófano y DL-metionina.

30 La mezcla de diastereoisómeros consistente en los dos dipéptidos no naturales L-Trp-D-Met (LD-Ij) y D-Met-L-Trp (DL-IIj) pudo ser disociada por completo, al igual que la mezcla a base del dipéptido natural L Met-L-Trp (LL-IIj) y el dipéptido no natural L-Trp-D-Met (LD-Ij). El efecto de "liberación lenta" es mucho más pronunciado en el caso de la mezcla de LD-Ij/DL-IIj que en el caso de la mezcla LD-Ij/LL-IIj, es decir, los aminoácidos triptófano y metionina son liberados mediante digestión enzimática de los dipéptidos más lentamente en relación uno con otro y durante un mayor espacio de tiempo.

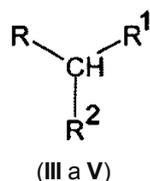
35

El problema se resuelve, además, mediante un dipéptido o una sal del mismo de fórmula general DL-metionil-DL-EAA o DL-EAA-DL-metionina, en donde EAA es un aminoácido, preferiblemente en la configuración L, seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina. El residuo metionilo es igualmente preferido en la configuración D o bien L. A ellos pertenecen los dipéptidos Met-Lys, Met-Thr, Met-Trp, Met-His, Met-Val, Met-Leu, Met-Ile, Met-Phe, Met-Arg, Met-Cys y Met-cistina, en cada caso en las configuraciones DD, LD, DL y LL, así como Lys-Met, Thr-Met, Trp-Met, His-Met, Val-Met, Leu-Met, Ile-Met, Phe-Met, Arg-Met, Cys-Met y cistina-Met, en cada caso en las configuraciones DD, LD, DL y LL.

5 El problema se resuelve, además, mediante un procedimiento para la preparación de un dipéptido que contiene solamente un residuo metionilo según la fórmula DD/LL/DL/LD-I o DD/LL/DL/LD-II:



por reacción de un aminoácido con un derivado de urea de las fórmulas generales III a V,



15 en donde R está definido como sigue:

- | | | |
|--------------------|--|----------------|
| Ia a Va: | R = 1-metiletil- | (valina) |
| Ib a Vb: | R = 2-metilpropil- | (leucina) |
| Ic a Vc: | R = (1S)-1-metilpropil- | (isoleucina) |
| 20 Id a Vd: | R = (1R)-1-hidroxietil | (treonina) |
| Ie a Ve: | R = 4-aminobutil- | (lisina) |
| If a Vf: | R = 3-[(aminoiminometil)amino]propil- | (arginina) |
| Ig a Vg: | R = bencil- | (fenilalanina) |
| Ih a Vh: | R = (1H-imidazol-4-il)metil- | (histidina) |
| 25 Ij a Vj: | R = (1H-indol-3-il)metil- | (triptófano) |
| Ik a Vk: | R = -CH ₂ -SH | (cisteína) |
| Im a Vm: | R = -CH ₂ -S-S-CH ₂ -C(H)NH ₂ -COOH | (cistina) |
| Iln a Vn: | R = -CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃ | (metionina) |

en donde los radicales R¹ y R² en los derivados de urea III, IV y V se definen como sigue:

- 30 en donde
- IIIa-n:** R¹ = COOH, R² = NHCONH₂
- IVa-n:** R¹ = CONH₂, R² = NHCONH₂
- Va-n:** R¹ - R² = -CONHCONH-

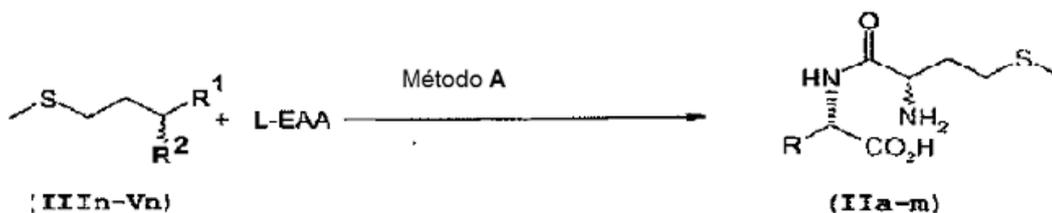
y

35 en donde R significa un residuo metionilo y el aminoácido añadido se selecciona del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína o cistina; o el aminoácido añadido es metionina y R es un residuo aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, o de cistina.

40 En una forma de realización preferida, se utiliza metionin-hidantoína o la hidantoína de un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina como producto de partida o se forma de forma intermedia como un producto intermedio.

45 En una forma de realización del procedimiento según la invención se prefiere hacer reaccionar una disolución que contiene metionin-hidantoína (Vn) y agua con el aminoácido en condiciones de carácter básico, o se hace reaccionar una disolución que contiene la hidantoína del aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina y agua con metionina en condiciones de carácter básico.

5 En otra forma de realización del procedimiento según la invención se prefiere en este caso utilizar metionin-hidantoína (**Vn**) como producto de partida o como un producto intermedio. En el **Esquema 3** se representa la preparación preferida de DL-metionil-L-EAA (**II**) directamente a partir de metionin-hidantoína (**Vn**), N-carbamoilmetionina (**III_n**) o bien N-carbamoilmetioninamida (**IV_n**) y comprende el método **A**.



Esquema 3

10 Además, se prefiere que el valor del pH de la disolución que contiene el derivado de urea se ajuste a 7 hasta 14, preferiblemente a 8 hasta 13 y de manera muy particularmente preferida a 9 hasta 12.

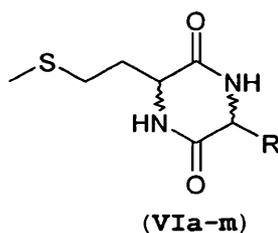
15 La reacción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 30 a 200°C, preferiblemente a una temperatura de 80 a 170°C. y de manera particularmente preferida a una temperatura de 120 a 160°C.

Además, se prefiere que la reacción se lleve a cabo bajo presión, preferiblemente a una presión de 2 a 100 bar, de manera particularmente preferida a una presión de 4 a 60 bar, de manera particularmente preferida a una presión de 8 a 40 bar.

20 En otro procedimiento preferido la disolución que contiene metionin-hidantoína y agua o la disolución que contiene la hidantoína del aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina y agua se ha formado previamente a partir de uno o más de los compuestos **III_a-n**, **IV_a-n** y **V_a-n**. Alternativamente, también se puede emplear el aminonitrilo correspondiente, cianhidrina o una mezcla a base del correspondiente aldehído, ácido cianhídrico y amoníaco o también a base del correspondiente aldehído, sales de amonio y cianuro como precursores de hidantoína.

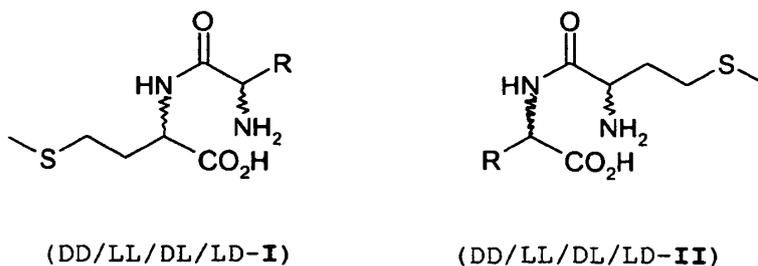
Otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención comprende las siguientes etapas:

30 a) Reacción del derivado de urea de acuerdo con las fórmulas **III_a-n**, **IV_a-n** o **V_a-n** con el aminoácido para dar una dicetopiperazina **VI_a-m** de la fórmula,



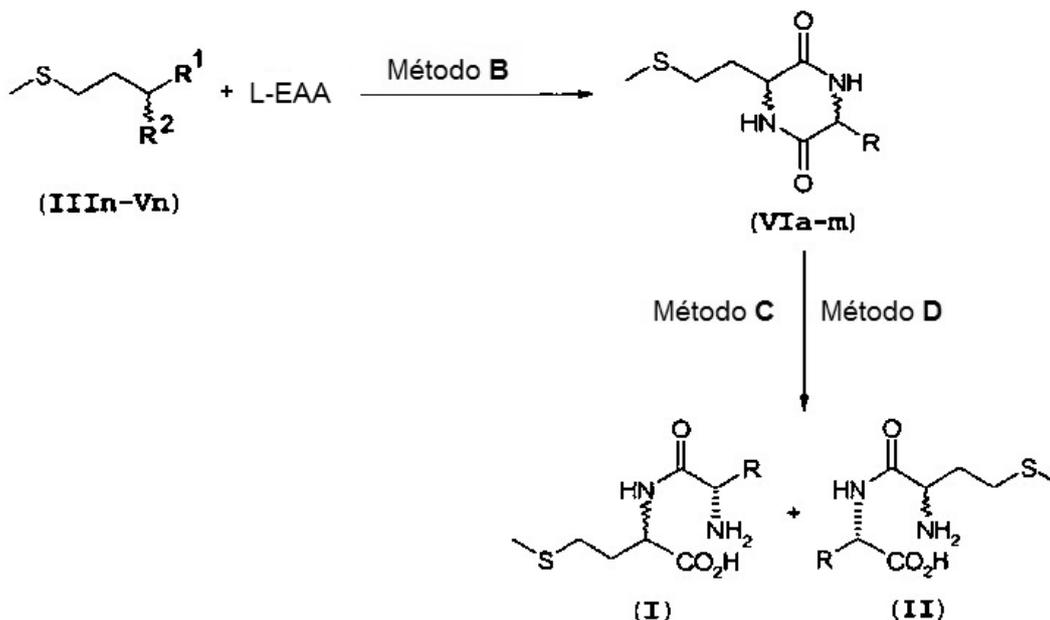
en donde R es como se define anteriormente;

35 b) reacción de la dicetopiperazina **VI** para dar una mezcla a base de dipéptidos con las fórmulas DD / LL / DL / LD-I y DD / LL / DL / LD-II:



en donde R es como se define anteriormente.

- 5 La reacción del derivado de urea de acuerdo con las fórmulas **III_n**, **IV_n** y **V_n** para dar una dicetopiperazina **VI_{a-m}** y la reacción ulterior de la dicetopiperazina para dar una mezcla de diastereoisómeros con los dipéptidos L-EAA-DL-metionina (**I**) y DL-metionil-L-EAA (**II**) preferidos se representa en el **Esquema 4**:



Esquema 4

- 10 La reacción de la dicetopiperazina **VI_{a-m}** para dar una mezcla a base de los dipéptidos L-EAA-DL-metionina (**I**) y DL-metionil-L-EAA (**II**) preferidos. Este procedimiento comprende los métodos **B**, **C** y **D** indicados en el **Esquema 4**. En estos procedimientos, la dicetopiperazina **VI_{a-m}** se forma en cada caso como un producto intermedio.

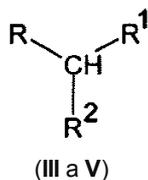
- 15 La reacción del derivado de urea con el aminoácido para dar la dicetopiperazina se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 20°C a 200°C, preferentemente de 40°C a 180°C, y de manera particularmente preferida de 100°C a 170°C.

- 20 En un procedimiento preferido, la reacción del derivado de urea con el aminoácido para dar la dicetopiperazina tiene lugar bajo presión, preferiblemente a una presión de 2 a 90 bar, de manera particularmente preferida a una presión de 4 a 70 bar, de manera muy particularmente preferida a una presión de 5 a 50 bar.

- 25 La reacción del derivado de urea con el aminoácido para dar la dicetopiperazina se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una base. En este caso, la base se selecciona preferiblemente del grupo de bases nitrogenadas, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, KHCO₃, K₂CO₃, mezcla de NH₄OH/CO₂, sales carbamato, bases alcalinas y alcalinotérreas.

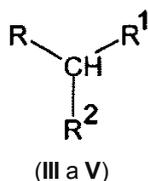
En otro procedimiento preferido, la reacción para dar la dicetopiperazina tiene lugar mediante reacción del derivado de

urea de fórmula,



5 en donde R significa un residuo metionilo, con un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína o cistina o

mediante reacción del derivado de urea de la fórmula,



10 en donde R es un residuo aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína o cistina, con el aminoácido metionina.

15 En el procedimiento preferido, en el que la reacción del derivado de urea para dar la dicetopiperazina tiene lugar mediante reacción con metionina, se prefiere particularmente una relación de derivado de urea a metionina de 1:100 a 1:0,5.

20 En otro procedimiento preferido, la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla a base de dipéptidos de las fórmulas I y II tiene lugar mediante hidrólisis de carácter ácido. Preferiblemente, la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla de L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II) tiene lugar mediante hidrólisis de carácter ácido.

25 La hidrólisis de carácter ácido se lleva a cabo en este caso en presencia de un ácido, que se elige preferiblemente del grupo de los ácidos minerales, HCl, H₂CO₃, CO₂/H₂O, H₂SO₄, ácidos fosfóricos, ácidos carboxílicos y ácidos hidroxicarboxílicos.

30 En otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla a base de dipéptidos de las fórmulas (I) y (II) se lleva a cabo por hidrólisis de carácter básico. Preferiblemente, la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla a base de L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II) se lleva a cabo mediante hidrólisis de carácter básico.

35 La hidrólisis de carácter básico se lleva a cabo preferiblemente a un pH de 7 a 14, de manera particularmente preferida a un pH de 8 a 13, de manera muy particularmente preferida a un pH de 9 a 12. En este caso, puede aparecer una racemización completa. Las condiciones de carácter básico se pueden ajustar mediante el uso de una sustancia que se selecciona preferiblemente del grupo de bases nitrogenadas, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, mezcla de NH₄OH/CO₂, sales carbamato, KHCO₃, K₂CO₃, carbonatos, bases alcalinas y alcalinotérreas.

40 La hidrólisis de carácter ácido o básico se lleva a cabo preferiblemente a temperaturas de 50°C a 200°C, preferentemente de 80°C a 180°C. y de manera particularmente preferida de 90°C a 160°C.

45 En un procedimiento preferido, el residuo aminoácido del derivado de urea III a V se presenta en la configuración D o L o en una mezcla a base de la configuración D y L, preferiblemente en una mezcla a base de una configuración D y L, cuando el derivado de urea se deriva de metionina.

En otro procedimiento preferido, el residuo aminoácido del derivado de urea III a V se presenta en la configuración D o L o en una mezcla a base de la configuración D y L, preferiblemente en la configuración L, cuando el derivado de urea se deriva de un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina.

50 En otro procedimiento preferido se obtienen dipéptidos que se presentan en forma de una mezcla de LL, DL, LD y DD,

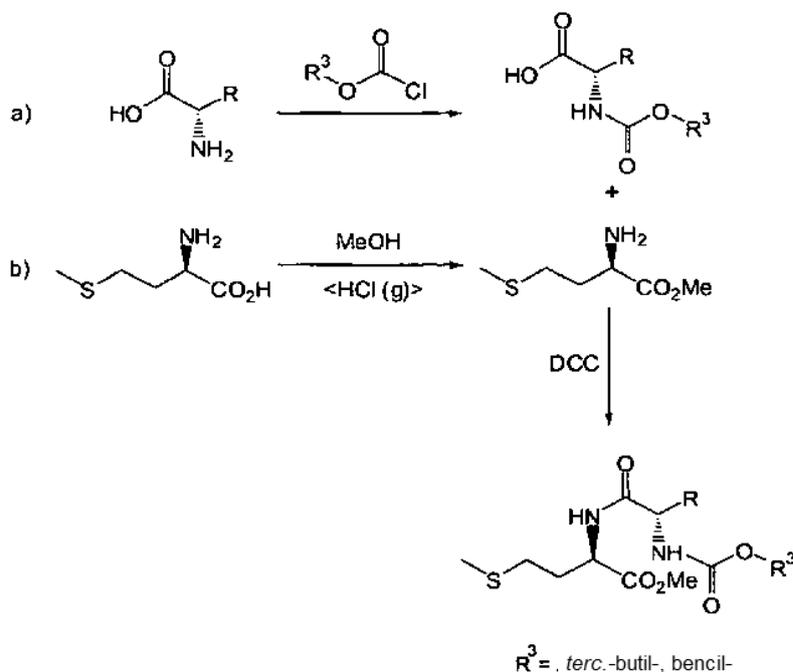
preferiblemente en forma de una mezcla de LL, LD, DL.

En un procedimiento preferido la dicetopiperazina se aísla antes de la hidrólisis. Es preferible que la dicetopiperazina sea aislada por cristalización en la disolución de reacción, preferiblemente a una temperatura de -30 hasta 120°C., de manera particularmente preferida a una temperatura de 10 a 70°C.

Para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros de los dipéptidos de las fórmulas DD/LL/DL/LD- (I) y DD/LL/DL/LD- (II), preferiblemente de la mezcla de diastereoisómeros a base de L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II), a partir de disoluciones de carácter básico, esta mezcla se acidifica y se obtiene por cristalización o precipitación. Se prefiere en este caso un valor del pH de 2 a 10, de manera particularmente preferida un valor del pH de 3 a 9, de manera muy particularmente preferida en el punto isoeléctrico correspondiente del respectivo dipéptido de las fórmulas I y II. En este caso, para la acidificación se pueden utilizar ácidos preferiblemente del grupo de los ácidos minerales, HCl, H₂CO₃, CO₂/H₂O, H₂SO₄, ácidos fosfóricos, ácidos carboxílicos y ácidos hidroxicarboxílicos.

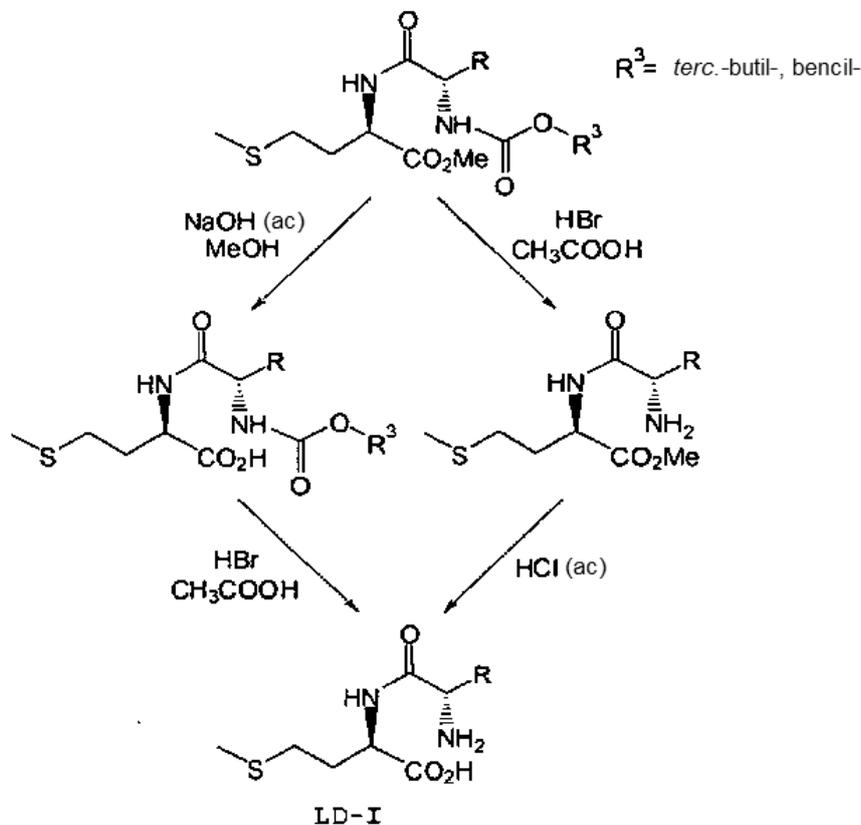
Para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros de los dipéptidos de las fórmulas DD/LL/DL/LD- (I) y DD/LL/DL/LD- (II), preferiblemente de la mezcla de diastereoisómeros a base de L-EAA-DL-metionina (I) y DL-metionil-L-EAA (II), a partir de disoluciones de carácter ácido, esta mezcla se neutraliza mediante la adición de bases y se obtiene por cristalización o precipitación. Se prefiere en este caso un valor del pH de 2 a 10, de manera particularmente preferida un valor del pH de 3 a 9, de manera muy particularmente preferida en el punto isoeléctrico correspondiente del respectivo dipéptido de las fórmulas I y II. En este caso se puede utilizar para la neutralización bases, preferiblemente del grupo de NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, bases nitrogenadas, NH₄OH, sales carbamato, KHCO₃, K₂CO₃, carbonatos, bases alcalinas y alcalinotérreas.

Otra forma de realización alternativa del procedimiento de acuerdo con la invención comprende la síntesis de los dipéptidos no naturales L-EAA-D-metionina **la-lj** o bien D-metionil-L-EAA **lla-llj** utilizando la técnica del grupo protector. Así, para la síntesis de los dipéptidos L-EAA-D-metionina (LD-I), el grupo amino de los L-EAA libres fue protegido primero con el grupo protector BOC (*terc.*-butoxicarbonil-). Alternativamente, también pudo emplearse con éxito el grupo protector Z (benzoxicarbonil-). La D-metionina fue esterificada con metanol, de modo que la función ácido quedó protegida. A continuación, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento del L-EAA BOC- o Z- protegido con éster metílico de D-metionina utilizando DCC (diciclohexilcarbodiimida) (véase el **Esquema 5**).



Esquema 5

Después de la purificación de BOC-L-EAA-D-metionina-OMe o bien Z-L-EAA-D-metionina-OMe, si disoció primero el éster metílico bajo condiciones de carácter básico suaves. Finalmente, el grupo protector BOC o Z se disoció en condiciones de carácter ácido con HBr en ácido acético glacial y el dipéptido libre L-EAA-D-metionina (LD-I) se purificó mediante precipitación y recristalización (véase el **Esquema 6**).



5

Esquema 6

Alternativamente, el éster metílico de dipéptido BOC-protégido BOC-L-EAA-D-metionina-OMe pudo también hacerse reaccionar primero con HBr en ácido acético glacial, separando así el grupo protector BOC. Después de la concentración por evaporación, el éster metílico ser disociado finalmente mediante la adición de una disolución diluida de ácido clorhídrico. El dipéptido L-EAA-D-metionina (LD-I) libre pudo ser purificado de nuevo mediante precipitación y recristalización (véase el **Esquema 6**).

También fue posible transferir la vía completa para los dipéptidos L-EAA-D-metionina **la-lj**. En este caso se emplearon los ésteres metílicos de L-EAA y D-metionina BOC- o bien Z-protégida.

Todos los procedimientos mencionados de la presente invención se llevan a cabo preferiblemente en un medio acuoso.

Además, los procedimientos de la presente invención se pueden realizar en los procedimientos por tandas o en procedimientos continuos, que son conocidos por una persona experta en la técnica.

Figuras

La **Figura 1** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-I) con enzimas de carpas comunes.

La **Figura 2** muestra la disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de carpas comunes.

La **Figura 3** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-I) con enzimas de la trucha arco iris.

La **Figura 4** muestra la disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de la trucha arco iris.

La **Figura 5** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-I) con enzimas del camarón blanco.

La **Figura 6** muestra la disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas del camarón blanco.

La **Figura 7** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de la carpa común.

La **Figura 8** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de la carpa herbívora.

La **Figura 9** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de la tilapia.

La **Figura 10** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas del camarón blanco.

La **Figura 11** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de la trucha arco iris.

La **Figura 12** muestra la disociación de mezclas de L-Trp-D-Met / D-Met-L-Trp (LD-Ij/DL-IIj) y L-Trp-D-Met / L-Met-L-Trp (LD-Ij/LL-IIj) con enzimas de la carpa común.

La **Figura 13** muestra la disociación *in vitro* de los dipéptidos naturales L-Ile-L-Met (LL-Ic) o bien L-Met-L-Ile (LL-IIc) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Ile-D-Met (LD-Ic) o bien D-Met-L-Ile (DL-IIc) con disolución enzimática al 10% de la carpa común.

La **Figura 14** muestra la disociación *in vitro* de los dipéptidos naturales L-Thr-L-Met (LL-Id) o bien L-Met-L-Thr (LL-IIId) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Thr-D-Met (LD-Id) o bien D-Met-L-Thr (DL-IIId) con disolución enzimática al 10% de la carpa común.

La **Figura 15** muestra la disociación *in vitro* de los dipéptidos naturales L-Lys-L-Met (LL-Ie) o bien L-Met-L-Lys (LL-IIe) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Lys-D-Met (LD-Ie) o bien D-Met-L-Lys (DL-IIe) con disolución enzimática al 10% de la carpa común.

La **Figura 16** muestra la disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de la gallina.

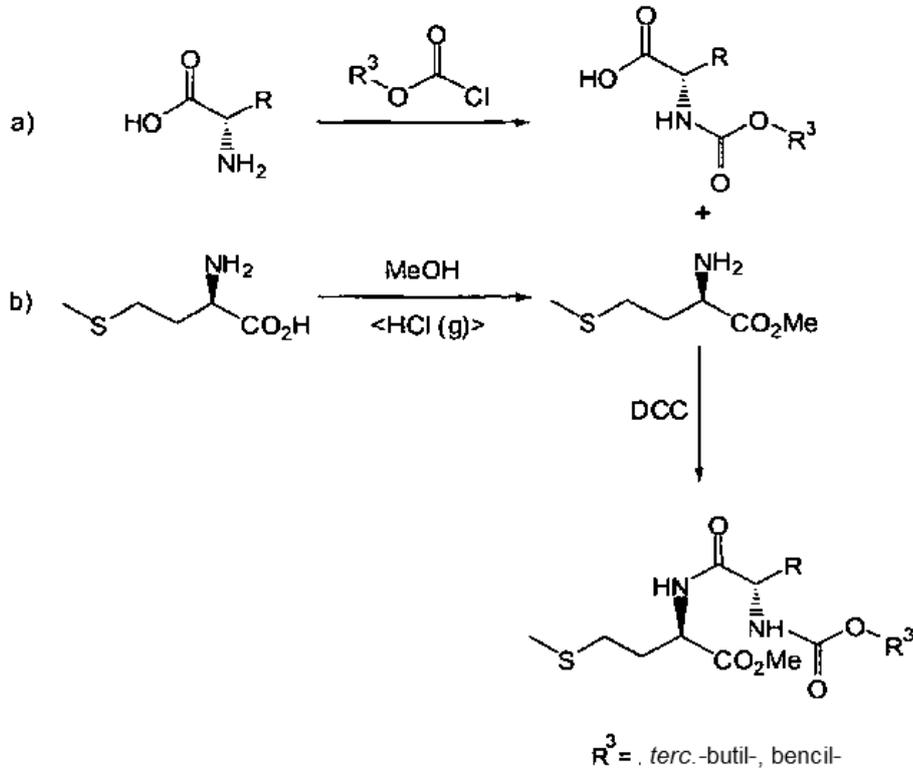
La **Figura 17** muestra la disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de la gallina.

Ejemplos

Ejemplo 1:

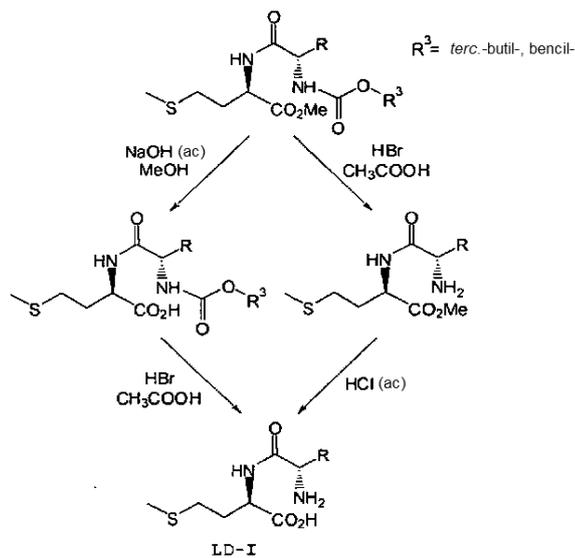
Procedimiento general para la síntesis de los dipéptidos no naturales L-EAA-D-metionina la-ij o bien D-metionil-L-EAA Ila-ij utilizando la técnica de grupos protectores:

En este caso, para la síntesis de los dipéptidos L-EAA-D-metionina (LD-I), el grupo amino de los L-EAA libres se protegió primero con el grupo protector BOC (*tert.*-butoxicarbonil-). Alternativamente, también se pudo utilizar con éxito el grupo protector Z (benzoxicarbonil-). La D-metionina se esterificó con metanol, con lo cual se protegió la función ácido. A continuación, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento del L-EAA BOC- o bien Z-prottegido con éster metílico de D-metionina utilizando DCC (diciclohexilcarbodiimida) (véase el **Esquema 5**).



Esquema 5

- 5 Después de la purificación de BOC-L-EAA-D-metionina-OMe o bien Z-L-EAA-D-metionina-OMe se disoció primero el éster metílico bajo condiciones básicas suaves. Finalmente, si disoció el grupo protector BOC o bien Z en condiciones ácidas con HBr en ácido acético glacial y el dipéptido L-EAA-D-metionina (LD-I) libre se purificó mediante precipitación y recristalización (véase el **Esquema 6**).



Esquema 6

Alternativamente, el éster metílico del dipéptido BOC-L-EAA-D-metionina-OMe BOC-protégido se pudo hacer reaccionar también primero con HBr en ácido acético glacial y, con ello, se pudo separar el grupo protector BOC. Después de la concentración por evaporación, el éster metílico se pudo disociar a continuación mediante la adición de una disolución diluida de ácido clorhídrico. El dipéptido L-EAA-D-metionina (LD-I) libre se pudo entonces purificar de nuevo mediante precipitación y recristalización (véase el **Esquema 6**).

También era posible transferir la vía completa para los dipéptidos L-EAA-D-metionina **la-lj**. En este caso se emplearon los ésteres metílicos de L-EAA y D-metionina BOC- o bien Z-protégida.

Ejemplo 2:

a) Prescripción para la síntesis de Z-D-Met

30,0 g (0,201 mol) de D-metionina y 42,4 g (0,4 mol) de Na₂CO₃ se dispusieron en 200 ml de agua y se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Después se añadieron lentamente 51,2 g (0,3 mol) de cloruro de carboxibenciloxi (Cbz-Cl) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se acidificó con ácido clorhídrico diluido y la disolución de reacción se extrajo tres veces, en cada caso con 50 ml de MTBE. Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron en el evaporador rotatorio. El residuo obtenido se recristalizó en éter dietílico / acetato de etilo y se secó en vacío a 30°C. Se aislaron 36,4 g (64%) de carboxibenciloxi-D-metionina (Z-D-Met) en forma de un sólido cristalino blanco.

b) Prescripción general para la síntesis de Z-L-EAA

50 mmol L-EAA y 10,6 g (100 mmol) de Na₂CO₃ se dispusieron en 50 ml de agua y se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Después se añadieron lentamente 12,8 g (75 mmol) de cloruro de carboxibenciloxi (Cbz-Cl) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se acidificó con ácido clorhídrico diluido y la disolución de reacción se extrajo tres veces, en cada caso con 25 ml de MTBE. Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron en el evaporador rotatorio. El residuo obtenido se recristalizó en vacío a 30°C.

Ejemplo 3:

Prescripción para la síntesis de D-Met-OMe x HCl

50,0 g (0,335 mol) de D-metionina se suspendieron en 500 ml de metanol y se hizo pasar HCl gas a una velocidad moderada hasta la saturación. Con ello, se disolvió la metionina y la disolución se calentó hasta 55°C. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, la mezcla se concentró hasta sequedad en el evaporador rotatorio a 40°C y el residuo obtenido se recristalizó dos veces en éter dietílico. Se aislaron 47,1 g (86%) de hidrocloreto de éster metílico de D metionina en forma de un sólido cristalino blanco.

Ejemplo 4:

Prescripción general para la síntesis de L-EAA-OMe x HCl

0,3 mol L-EAA se suspendieron en 500 ml de metanol y se hizo pasar HCl gas a una velocidad moderada hasta la saturación. Con ello, se disolvió el aminoácido y la disolución se calentó hasta 50-60°C. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, la mezcla se concentró hasta sequedad en el evaporador rotatorio a 40°C y el residuo obtenido se recristalizó dos veces en éter dietílico o éter dietílico/metanol.

Ejemplo 5:

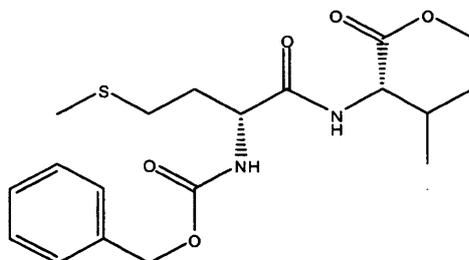
Prescripción general para la síntesis de compuestos del grupo PG-D-Met-L-EAA-OMe (PG-DL-II-OMe) (reacción de acoplamiento)

20,0 mmol de hidrocloreto de L-EAA-OMe se suspendieron en una mezcla a base de 30 ml de cloroformo y 5 ml de metanol, se mezclaron con 4,15 g (30 mmol) de K₂CO₃ y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la sal se separó por filtración y se lavó con algo de cloroformo. Después de la concentración del filtrado, el residuo obtenido se recogió en 50 ml de tetrahidrofurano, se mezcló con 4,37 g (21,0 mmol; 1,05 eq.) de DCC y 5,66 g (20,0 mmol) de Z-D-metionina y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se combinó con 3 ml de ácido acético glacial, se agitó durante 30 minutos y el sólido blanco precipitado (N,N'-

diciclohexilurea) se separó por filtración. El filtrado se concentró en el evaporador rotatorio y la N,N'-diciclohexilurea eventualmente precipitada se separó por filtración. El residuo oleoso se recristalizó a continuación dos veces en cloroformo / *n*-hexano y se secó en el vacío de la bomba de aceite.

5 PG: Grupo protector (grupo protector Z o BOC)

5a) Z-D-Met-L-Val-OMe (Z-DL-Ila-OMe)

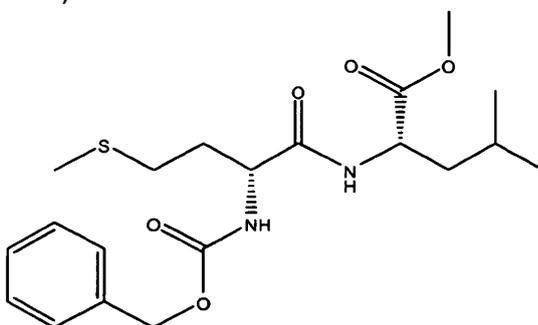


10 Fórmula empírica: C₁₉H₂₈N₂O₅S (396,50 g / mol), rendimiento: 4,60 g (58%), pureza: 97%, sólido blanco.

¹H-RMN de Z-D-Met-L-Val-OMe (Z-DL-Ila-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 0,88 (d, ³J = 6,8 Hz, 3H, CH₃); 0,93 (d, ³J = 6,8 Hz, 3H, CH₃); 1,90-2,20 (m, 3H, SCH₂CH₂, CH(CH₃)₂); 2,10 (s, 3H, SCH₃); 2,50-2,64 (m, 2H, SCH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,38-4,44 (m, 1H, CH); 4,48-4,54 (m, 1H, CH); 5,08-5,18 (m, 2H, OCH₂); 5,49 (s ancho, 1H, NH); 6,58 (s ancho, 1H, NH); 7,24-7,38 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN de Z-D-Met-L-Val-OMe (Z-DL-Ila-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,26; 17,74; 19,01; 30,13; 31,16; 31,67; 52,21; 57,24; 67,22; 128,16; 128,27; 128,58; 136,16; 156,13; 171,01; 171,95

20 5b) Z-D-Met-L-Leu-OMe (Z-DL-Ilb-OMe)

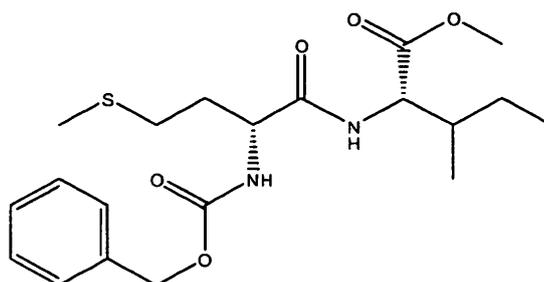


Fórmula empírica: C₂₀H₃₀N₂O₅S (410,53 g/mol), rendimiento: 5,40 g (66%), pureza: 97%, sólido blanco.

¹H-RMN de Z-D-Met-L-Leu-OMe (Z-DL-Ilb-OMe) (500 MHz, D₆-DMSO): δ = 0,90-0,95 (m, 6H, CH(CH₃)₂); 1,50-1,72 (m, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,90-2,15 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,09 (s, 3H, SCH₃); 2,48-2,64 (m, 2H, SCH₂); 3,71 (s, 3H, OCH₃); 4,36-4,44 (m, 1H, CH); 4,56-4,62 (m, 1H, CH); 5,12 (s, 2H, OCH₂); 5,56 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, OC(=O)NH); 6,59 (s ancho, 1H, NH); 7,26-7,36 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN de Z-D-Met-L-Leu-OMe (Z-DL-Ilb-OMe) (125 MHz, D₆-DMSO): δ = 15,27; 21,86; 22,78; 24,95; 30,11; 31,62; 33,96; 41,35; 50,86; 52,33; 67,20; 128,09; 128,25; 128,57; 156,97; 170,95; 173,01

5c) Z-D-Met-L-Ile-OMe (Z-DL-Ilc-OMe)

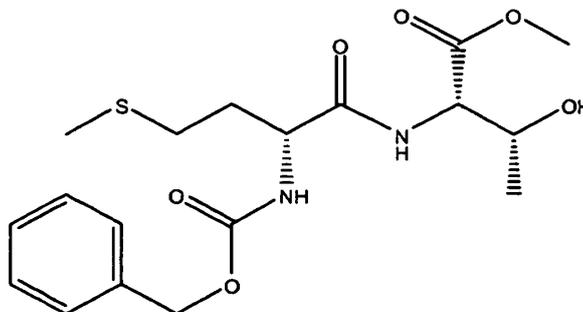


Fórmula empírica: $C_{20}H_{30}N_2O_5S$ (410,53 g/mol), rendimiento: 5,09 g (62%), pureza: 97%, sólido blanco.

5 1H -RMN de Z-D-Met-L-Ile-OMe (Z-DL-Ilc-OMe) (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,86-0,94 (m, 6H, $CH(CH_3)CH_2CH_3$); 1,10-1,45 (m, 2H, CH_2CH_3); 1,84-1,94 (m, 1H, $CH(CH_3)$); 1,94-2,16 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,10 (s, 3H, SCH_3); 2,49-2,64 (m, 2H, SCH_2); 3,72 (s, 3H, OCH_3); 4,36-4,44 (m, 1H, CH); 4,52-4,58 (m, 1H, CH); 5,08 - 5,18 (m, 2H, OCH_2); 5,46 (s ancho, 1H, NH); 6,58 (s ancho, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

10 ^{13}C -RMN de Z-D-Met-L-Ile-OMe (Z-DL-Ilc-OMe) (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 11,55; 15,26; 15,54; 25,19; 30,12; 31,70; 33,96; 37,79; 52,15; 45,07; 56,55; 67,18; 128,12; 128,24; 128,56; 156,13; 170,92; 171,96

5d) Z-D-Met-L-Thr-OMe (Z-DL-Ild-OMe)

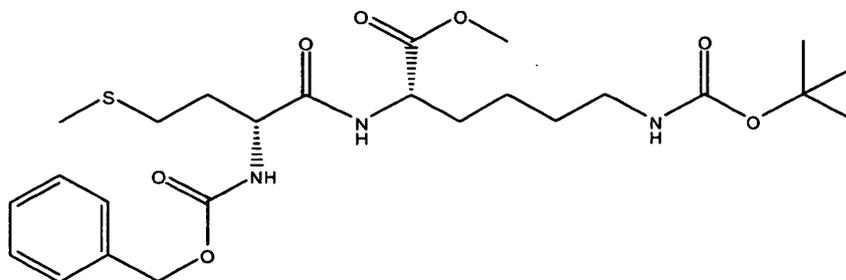


15 Fórmula empírica: $C_{18}H_{26}N_2O_6S$ (398,47 g/mol), rendimiento: 2,14 g (36%), pureza: 95%, sólido ligeramente amarillento.

20 1H -RMN de Z-D-Met-L-Thr-OMe (Z-DL-Ild-OMe) (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,10 - 1,25 (m, 3H, $CHCH_3$); 1,95-2,20 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,09 (s, 3H, SCH_3); 2,49 (s ancho, 1H, OH); 2,52-2,62 (m, 2H, SCH_2); 3,74 (s, 3H, OCH_3); 4,30-4,56 (m, 3H, 3 x CH); 5,12 (s, 2H, OCH_2); 5,70-5,78 (m, 1H, NH); 7,03 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

^{13}C -RMN de Z-D-Met-L-Thr-OMe (Z-DL-Ild-OMe) (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 15,15; 20,05; 30,10; 31,91; 52,66; 54,37; 57,44; 67,23; 67,82; 128,17; 128,26; 128,57; 136,16; 156,18; 171,25; 171,87

5e) Z-D-Met-L-Lys (BOC)-OMe (Z-DL-Ile (BOC) OMe)



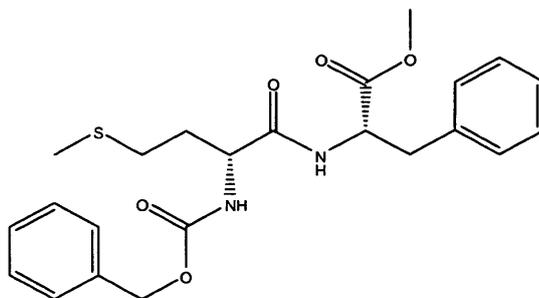
25 Fórmula empírica: $C_{25}H_{39}N_3O_7S$ (525,66 g/mol), rendimiento: 10,86 g (33%), pureza: 95%, sólido ligeramente amarillento.

1H -RMN de Z-D-Met-L-Lys (BOC) OMe (Z-DL-Ile (BOC)-OMe) (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,25-1,90 (m, 6H, 3 x CH_2 (Lys));

1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,92-2,16 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,09 (s, 3H, SCH₃); 2,48-2,62 (m, 2H, SCH₂); 3,02-3,12 (m, 2H, NCH₂); 3,72 (s, 3H, OCH₃); 4,35-4,65 (m, 3H, 2 x CH, NH); 5,13 (s, 2H, OCH₂); 5,58 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, NH); 6,75 (s ancho, 1H, NH); 7,28-7,36 (m, 5H, Ph)

5 ¹³C-RMN de Z-D-Met-L-Lys(BOC)-OMe (Z-DL-Ile (BOC)-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,31; 22,44; 28,45; 29,47; 30,12; 31,82; 52,08; 52,45; 67,20; 79,15; 128,08; 128,25; 128,34; 128,57; 156,07; 170,97; 172,38

5f) Z-D-Met-L-Phe-OMe (Z-DL-Ilg-OMe)

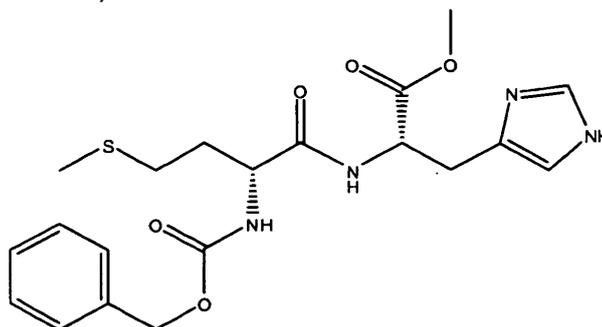


10 Fórmula empírica: C₂₃H₂₈N₂O₅S (444,54 g/mol), rendimiento: 3,73 g (42%), pureza: 95% (HPLC), sólido blanco.

¹H-RMN de Z-D-Met-L-Phe-OMe (Z-DL-Ilg-OMe) (500 MHz, D₆-DMSO/CDCl₃): δ = 1,72-1,94 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,01 (s, 3H, SCH₃); 2,30-2,38 (m, 2H, SCH₂); 2,94-3,14 (m, 2H, CH₂Ph); 3,70 (s, 3H, OCH₃); 4,25-4,32 (m, 1H, CHCH₂CH₂S); 4,70-4,78 (m, 1H, CHCH₂Ph); 5,00-5,10 (s ancho, 2H, OCH₂Ph); 6,60-6,70 (m, 1H, NH); 7,10-7,35 (m, 10H, 2 x Ph); 7,75-7,80 (s ancho, 1H, NH)

15

5g) Z-D-Met-L-His-OMe (Z-DL-Ilh-OMe)



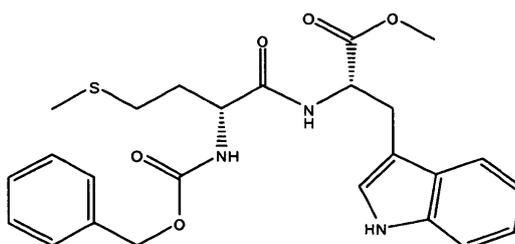
20 Fórmula empírica: C₂₀H₂₆N₄O₅S (434,51 g/mol), rendimiento: 2,35 g (27%), pureza: 95% (HPLC), sólido ligeramente amarillento.

¹H-RMN de Z-D-Met-L-His-OMe (Z-DL-Ilh-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,88-2,14 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,05 (s, 3H, SCH₃); 2,44-2,56 (m, 2H, SCH₂); 3,06 - 3,14 (m, 2H, CH₂-imidazolilo); 3,68 (s, 3H, OCH₃); 4,20-4,40 (m, 2H, NH, CH); 4,70-4,76 (m, 1H, CH); 5,11 (s, 2H, OCH₂); 5,91 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, NH); 6,76 (s ancho, 1H, CH(imidazolilo)); 7,26-7,45 (m, 5H, Ph); 7,73 (s ancho, 1H, CH(imidazolilo)); 9,30 (s ancho, 1H, NH)

25

¹³C-RMN de Z-D-Met-L-His-OMe (Z-DL-Ilh-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,27; 29,94; 31,81; 33,92; 52,46; 67,14; 116,88; 128,02; 128,12; 128,23; 128,49; 128,58; 133,23; 135,20; 136,21; 156,97; 171,17; 171,57

5h) Z-D-Met-L-Trp-OMe (Z-DL-Ilj-OMe)



30

Fórmula empírica: $C_{25}H_{29}N_3O_5S$ (483,58 g/mol), rendimiento: 5,71 g (59%), pureza: 98% (HPLC), sólido ligeramente amarillento.

5 1H -RMN de Z-D-Met-L-Trp-OMe (Z-DL-IIj-OMe) (500 MHz, D_6 -DMSO): δ = 1,60-1,80 (m, 2H, SCH_2CH_2); 1,95 (s, 1H, SCH_3); 2,25-2,35 (m, 2H, SCH_2); 3,02-3,20 (m, 2H, CH_2 -indolilo); 3,60 (s, 3H, OCH_3); 4,10 - 4,16 (m, 1H, CH); 4,50-4,60 (m, 1H, CH); 4,98-5,08 (m, 2H, OCH_2); 6,94-7,50 (m, 12H, indolilo, Ph, $OC(=O)NH$); 8,25 (d, 3J = 8,6 Hz, 1H, $CONH$ -Trp)

10 ^{13}C -RMN de Z-D-Met-L-Trp-OMe (Z-DL-IIj-OMe) (125 MHz, D_6 -DMSO): δ = 14,42; 27,01; 29,40; 31,59; 51,75; 52,78; 53,60; 65,36; 109,16; 111,31; 117,84; 118,31; 120,86; 123,60; 126,90; 127,59; 127,68; 128,21; 136,02; 136,89; 155,81; 171,32; 172,06

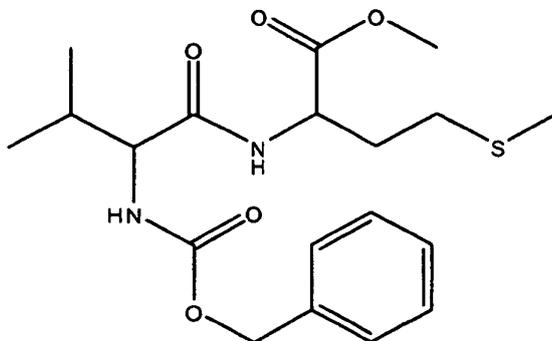
Ejemplo 6:

15 Prescripción general para la síntesis de compuestos del grupo PG-L-EAA-D-Met-OMe (PG-LD-I-OMe) (reacción de acoplamiento)

3,99 g (20,0 mmol) de hidrocloreto de éster metílico de D metionina se suspendieron en una mezcla a base de 30 ml de cloroformo y 5 ml de metanol, se mezclaron con 4,15 g (30 mmol) de K_2CO_3 y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la sal se separó por filtración y se lavó con un poco de cloroformo. Después de la concentración del filtrado, el residuo obtenido se recogió en 50 ml de tetrahidrofurano, se mezcló con 4,37 g (21,0 mmol; 1,05 eq. de DCC y 20,0 mmol del correspondiente PG-L-EAA (PG-L-aminoácido) y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 3 ml de ácido acético glacial a la mezcla de reacción, se agitó durante 30 minutos y el sólido blanco precipitado (N,N'-d ciclohexilurea) se separó por filtración. El filtrado se concentró en el evaporador rotatorio y la N,N'-d ciclohexilurea eventualmente precipitada se separó por filtración. El residuo oleoso se recristalizó a continuación dos veces en cloroformo / *n*-hexano y se secó en el vacío de la bomba de aceite.

PG: Grupo protector (grupo protector Z o BOC)

30 6a) Z-L-Val-D-Met-OMe (Z-LD-Ia-OMe)

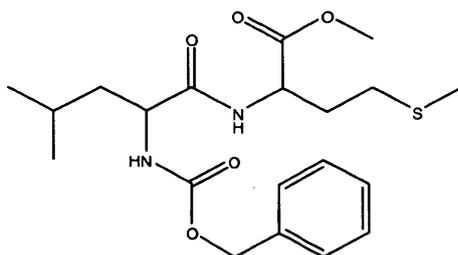


Fórmula empírica: $C_{19}H_{28}N_2O_5S$ (396,50 g/mol), rendimiento: 3,01 g (38%), pureza: 95% (HPLC), sólido blanco

35 1H -RMN de Z-L-Val-D-Met-OMe (Z-LD-Ia-OMe) (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,92 (d, 3J = 6,9 Hz, 3H, CH_3); 0,99 (d, 3J = 6,9 Hz, 3H, CH_3); 1,90-2,25 (m, 3H, SCH_2CH_2 , $CH(CH_3)_2$); 2,07 (s, 3H, SCH_3); 2,44-2,54 (m, 2H, SCH_2); 3,74 (s, 3H, OCH_3); 4,04-4,10 (m, 1H, CH); 4,67-4,74 (m, 1H, CH); 5,12 (s, 2H, OCH_2); 5,28 (s ancho, 1H, NH); 6,65 (d, 3J = 7,5 Hz, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

40 ^{13}C -RMN de Z-L-Val-D-Met-OMe (Z-LD-Ia-OMe) (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 15,45; 17,46; 19,30; 29,96; 30,87; 31,40; 51,57; 52,55; 60,37; 67,18; 128,08; 128,24; 128,57; 136,19; 156,38; 171,04; 172,04

6b) Z-L-Leu-D-Met-OMe (Z-LD-Ib-OMe)

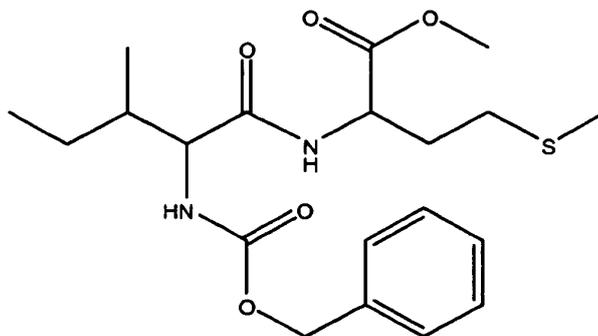


Fórmula empírica: C₂₀H₃₀N₂O₅S (410,53 g/mol), rendimiento: 4,48 g (55%), pureza: 96% (HPLC), sólido blanco

5 ¹H-RMN de Z-L-Leu-D-Met-OMe (Z-LD-lb-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 0,94 (d, ³J = 6,3 Hz, 6H, CH(CH₃)₂); 1,48-1,72 (m, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,90-2,20 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,07 (s, 3H, SCH₃); 2,42-2,52 (m, 2H, SCH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,20-4,30 (m, 1H, CH); 4,64-4,72 (m, 1H, CH); 5,12 (s, 2H, OCH₂); 5,23 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, NH); 6,84 (d, ³J = 7,2 Hz, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

10 ¹³C-RMN de Z-L-Leu-D-Met-OMe (Z-LD-lb-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,47; 22,97; 24,81; 29,97; 31,46; 51,58; 52,55; 67,23; 128,09; 128,26; 128,58; 136,16; 156,23; 172,02; 172,09

6c) Z-L-Ile-D-Met-OMe (Z-LD-lc-OMe)

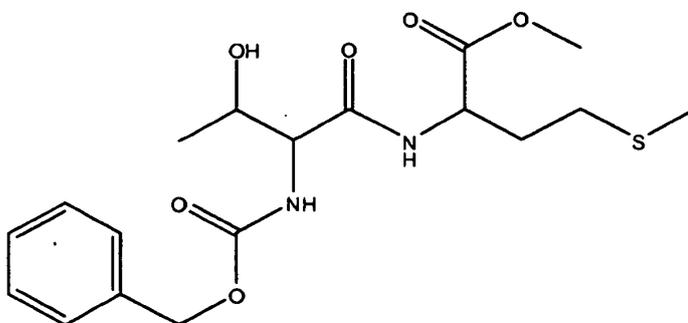


15 Fórmula empírica: C₂₀H₃₀N₂O₅S (410,53 g/mol), rendimiento: 3,89 g (47%), pureza: 97% (HPLC), sólido blanco

15 ¹H-RMN de Z-L-Ile-D-Met-OMe (Z-LD-lc-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 0,91 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 0,96 (d, ³J = 7,1 Hz; 3H, CH(CH₃)); 1,08-1,16 (m, 1H, CH'H"CH₃); 1,46-1,54 (m, 1H, CH'H"CH₃); 1,88-2,20 (m, 3H, CH(CH₃), SCH₂CH₂); 2,07 (s, 3H, SCH₃); 2,44-2,52 (m, 2H, SCH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,08-4,16 (m, 1H, CH); 4,66-4,74 (m, 1H, CH); 5,11 (s, 2H, OCH₂); 5,34 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H; NH); 6,74 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

20 ¹³C-RMN de Z-L-Ile-D-Met-OMe (Z-LD-lc-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 11,54; 15,46; 15,68; 24,66; 29,96; 31,42; 37,36; 51,59; 52,57; 59,83; 67,19; 128,10; 128,25; 128,58; 136,20; 156,34; 170,99; 172,03

6d) Z-L-Thr-D-Met-OMe (Z-LD-lid-OMe)

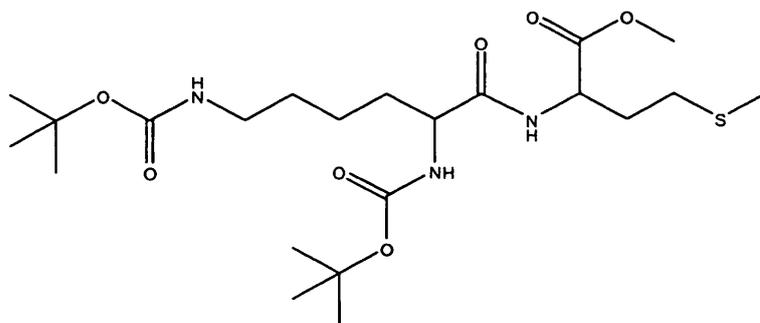


25 Fórmula empírica: C₁₈H₂₆N₂O₆S (398,47 g/mol), rendimiento: 2,47 g (31%), pureza: 99% (HPLC), sólido ligeramente amarillento

¹H-RMN de Z-L-Thr-D-Met-OMe (Z-LD-Id-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,19 (d, ³J = 6,4 Hz, 3H, CH₃); 1,94-2,20 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,06 (s, 3H, SCH₃); 2,45-2,55 (m, 2H, SCH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,18 (s ancho, 1H, CH); 4,39 (s ancho, 1H, CH); 4,66-4,74 (m, 1H, CH); 5,10-5,18 (m, 2H, OCH₂); 5,85 (s ancho, 1H, OC(=O)NH); 7,21 (s ancho, 1H, NH); 7,28-7,38 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN de Z-L-Thr-D-Met-OMe (Z-LD-Id-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,43; 18,48; 30,10; 30,91; 51,80; 52,66; 59,16; 66,99; 67,36; 128,04; 128,29; 128,59; 136,08; 156,94; 171,27; 172,25

10 **6e) BOC-L-Lys (Boc)-D-Met-OMe (BOC-LD-Ie (BOC) OMe)**

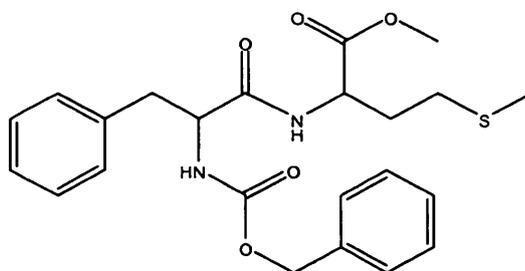


Fórmula empírica: C₂₂H₄₁N₃O₇S (491,64 g/mol), rendimiento: 5,22 g (53,1%), pureza: 97% (HPLC), sólido blanco amorfo

15 ¹H-RMN de BOC-L-Lys (Boc)-D-Met-OMe (BOC-LD-Ie(BOC)-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,32-1,42 (m, 2H, CH₂(Lys)); 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,46-1,56 (m, 2H, CH₂(Lys)); 1,60-1,72 (m, 1H, CHCH'H'' (Lys)); 1,82-1,92 (m, 1H, CHCH'CH''(Lys)); 1,92-2,03 (m, 1H, SCH₂CHH'H'''); 2,09 (s, 3H, SCH₃); 2,12-2,22 (m, 1H, SCH₂CH'H'''); 2,51 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, SCH₂); 3,08-3,16 (m, 2H, NCH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 4,02-4,12 (m, 1H, CH); 4,54-4,62 (m, 1H, NH); 4,66-4,74 (m, 1H, CH); 5,06-4,14 (m, 1H, NH); 6,81 (d, ³J = 7,4 Hz, 1H, NH)

20

6f) Z-L-Phe-D-Met-OMe (Z-LD-Ig-OMe)

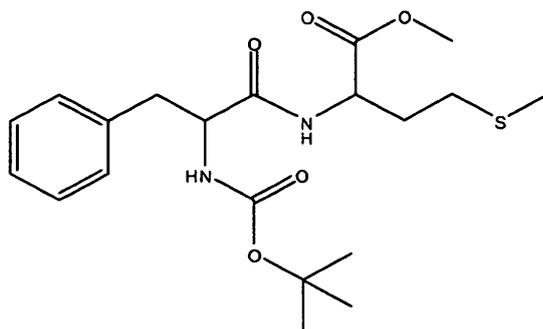


Fórmula empírica: C₂₃H₂₈N₂O₅S (444,54 g/mol), rendimiento: 3,51 g (40%), pureza: 99% (HPLC), sólido blanco

25 ¹H-RMN de Z-L-Phe-D-Met-OMe (Z-LD-Ig-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,78-2,04 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,02 (s, 3H, SCH₃); 2,20-2,30 (m, 2H, SCH₂); 3,02-3,14 (m, 2H, CH₂Ph); 3,71 (s, 3H, OCH₃); 4,40-4,50 (m, 1H, CH); 4,60-4,66 (m, 1H, CH); 5,09 (s, 2H, OCH₂); 5,31 (s ancho, 1H, OC(=O)NH); 6,42 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, NH); 7,16-7,36 (m, 10H, 2 x Ph)

30 ¹³C-RMN de Z-L-Phe-D-Met-OMe (Z-LD-Ig-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,37; 29,67; 31,35; 38,63; 51,52; 52,53; 56,36; 67,15; 127,18; 128,06; 128,24; 128,57; 128,83; 129,26; 136,13; 136,30; 155,90; 170,63; 171,88

6g) BOC-L-Phe-D-Met-OMe (BOC-LD-Ig-OMe)

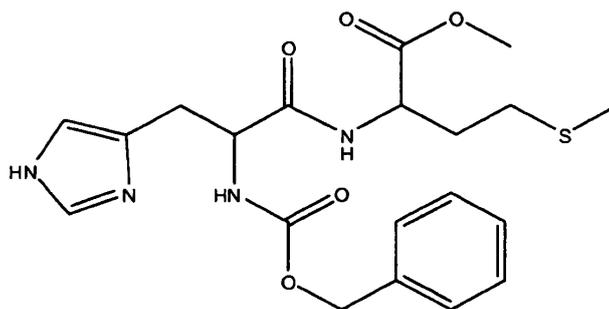


Fórmula empírica: $C_{20}H_{30}N_2O_5S$ (410,53 g/mol), rendimiento: 4,03 g (49%), pureza: 98% (HPLC), sólido blanco

5 1H -RMN de BOC-L-Phe-D-Met-OMe (BOC-LD-Ig-OMe) (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,42 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,80-2,08 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,04 (s, 3H, SCH_3); 2,24-2,34 (m, 2H, SCH_2); 3,07 (d, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2Ph); 3,73 (s, 3H, OCH_3); 4,30-4,42 (m, 1H, CH); 4,60-4,68 (m, 1H, CH); 4,90-5,02 (s ancho, 1H, NH); 6,44 (d, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, NH); 7,18-7,34 (m, 5H, Ph)

10 ^{13}C -RMN de BOC-L-Phe-D-Met-OMe (BOC-LD-Ig-OMe) (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 15,39; 28,29; 29,67; 31,51; 38,42; 51,47; 52,50; 56,00; 80,38; 127,07; 128,79; 129,27; 136,60; 156,42; 171,00; 171,94

6h) Z-L-His-D-Met-OMe (Z-LD-Ih-OMe)

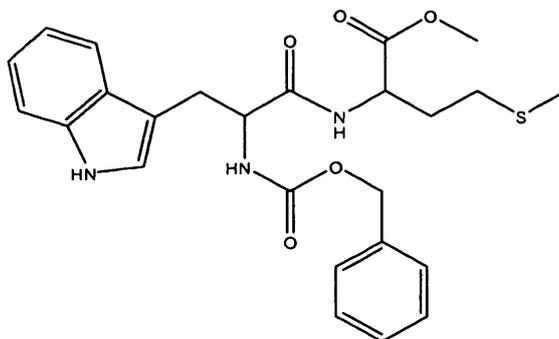


15 Fórmula empírica: $C_{20}H_{26}N_4O_5S$ (434,51 g/mol), rendimiento: 1,65 g (19%), pureza: 95% (HPLC), sólido ligeramente amarillento

20 1H -RMN de Z-L-His-D-Met-OMe (Z-LD-Ih-OMe) (500 MHz, D_6 -DMSO/ $CDCl_3$): δ = 1,82-1,98 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,01 (s, 3H, SCH_3); 2,30-2,44 (m, 2H, SCH_2); 2,76-2,94 (m, 2H, CH_2 -imidazolilo); 3,63 (s, 3H, OCH_3); 4,28-4,42 (m, 2H, 2 x CH); 5,01 (s, 2H, OCH_2); 6,78 (s ancho, 1H, CH(imidazolilo)); 7,25-7,37 (m, 6H, Ph, NH); 7,50 (s ancho, 1H, CH(imidazolilo)); 8,27 (s ancho, 1H, NH); 11,76 (s ancho, 1H, NH(imidazolilo))

^{13}C -RMN de Z-L-His-D-Met-OMe (Z-LD-Ih-OMe) (125 MHz, D_6 -DMSO/ $CDCl_3$): δ = 14,54; 29,40; 30,52; 50,78; 51,79; 54,61; 65,35; 127,47; 127,61; 128,20; 134,53; 136,92; 155,57; 171,39; 171,94

25 6i) Z-L-Trp-D-Met-OMe (Z-LD-Ij-OMe)

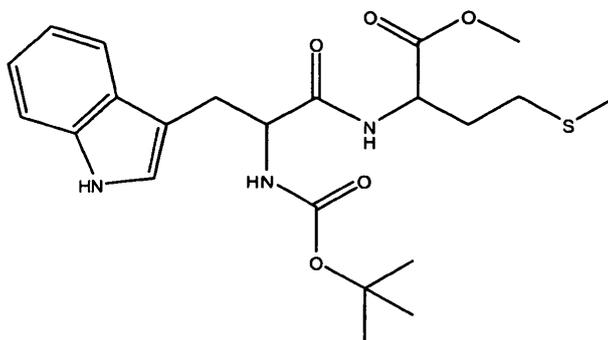


Fórmula empírica: C₂₅H₂₉N₃O₅S (483,58 g/mol), rendimiento: 5,50 g (57%), pureza: 99% (HPLC), sólido ligeramente amarillento

5 ¹H-RMN de Z-L-Trp-D-Met-OMe (Z-LD-lj-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,68-1,92 (m, 2H, SCH₂CH₂); 1,97 (s, 3H, SCH₃); 2,08-2,14 (m, 2H, SCH₂); 3,14-3,34 (m, 2H, CH₂-indolilo); 3,64 (s, 3H, OCH₃); 4,50-4,62 (m, 2H, 2 x CH); 5,10 (s, 2H, OCH₂); 5,44 (s ancho, 1H, NH); 6,32 (s ancho, 1H, NH); 7,00-7,38, 10H; aromat.); 8,17 (s ancho, 1H, NH)

10 ¹³C-RMN de Z-L-Trp-D-Met-OMe (Z-LD-lj-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,31; 29,48; 31,26; 33,97; 51,48; 52,45; 55,65; 67,10; 110,37; 111,34; 118,77; 119,94; 122,44; 123,14; 127,32; 128,09; 128,22; 128,56; 136,20; 136,28; 155,99; 171,15; 171,80

6j) BOC-L-Trp-D-Met-OMe (BOC-LD-lj-OMe)



15 Fórmula empírica: C₂₂H₃₁N₃O₅S (449,56 g/mol), rendimiento: 5,91 g (66%), pureza: 99% (HPLC), sólido blanco

20 ¹H-RMN de BOC-L-Trp-D-Met-OMe (BOC-LD-lj-OMe) (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 8H, C(CH₃)₃); 1,70-1,98 (m, 2H, SCH₂CH₂); 1,99 (s, 3H, SCH₃); 2,10-2,20 (m, 2H, SCH₂); 3,14-3,34 (m, 2H, CH₂-indolilo); 3,66 (s, 3H, OCH₃); 4,44-4,52 (m, 1H, CH); 4,56-4,62 (m, 1H, CH); 5,12 (s ancho, 1H, NH); 6,39 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, NH); 7,04-7,38 (m, 5H, indolil-CH); 8,17 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, NH)

¹³C-RMN de BOC-L-Trp-D-Met-OMe (BOC-LD-lj-OMe) (125 MHz, CDCl₃): δ = 15,28; 28,27; 29,43; 31,36; 33,93; 52,38; 55,25; 80,19; 110,54; 111,25; 118,78; 119,80; 122,31; 123,06; 127,40; 136,25; 155,40; 171,53; 171,85

25 Ejemplo 7:

Prescripción general para la síntesis de compuestos del grupo PG-L-EAA-D-Met (PG-LD-I) y PG-D-Met-L-EAA (PG-DL-II) (disociación de éster metílico)

30 10,0 mmol de PG-L-EAA-D-Met-OMe (PG-LD-I-OMe) o PG-D-Met-L-EAA-OMe (PG-DL-II-OMe) se suspendieron en 15 ml de agua y 200 ml de metanol y se mezclaron con 1,2 eq. (12,0 mmol) de NaOH (12,0 ml de NaOH 1N). Después de agitar durante dos horas, la disolución de reacción homogénea se acidificó con ácido clorhídrico diluido y el metanol se destiló en el evaporador rotatorio. El sólido blanco que cristalizó en este caso se separó por filtración, se lavó con 20 ml de agua y se recristalizó.

35 PG: Grupo protector (grupo protector Z o BOC)

Ejemplo 8:

40 Prescripción general para la síntesis de compuestos del grupo L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) (disociación del grupo protector Z N-terminal)

45 5,0 mmol de Z-L-EAA-D-Met (Z-LD-I) o Z-D-Met-L-EAA (Z-LD-II) se disolvieron en 50 ml de ácido acético glacial y se mezclaron con 18,5 ml (15,6 g; 250 mmol; 50 eq) de sulfuro de dimetilo y 5,0 g (3,6 ml) de HBr al 33% en ácido acético (1,65 g; 4,0 eq.). Al término de la reacción, la disolución de reacción se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en aprox. 50 ml de metanol y se mezcló con 3,5 g (50 mmol; 10 eq.) de metanotiolato de sodio. Después de agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la disolución se neutralizó con ácido clorhídrico concentrado y la

disolución se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se recogió en 40 ml de agua y se extrajo tres veces en cada caso con 40 ml de dietil-éter. La fase acuosa se concentró en el evaporador rotatorio, precipitando un sólido voluminoso de color blanco. El dipéptido se filtró con succión, se lavó con un poco de agua y se secó en vacío.

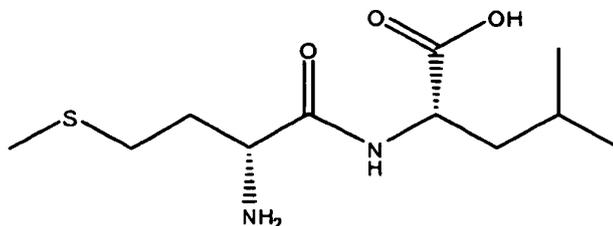
5 Ejemplo 9:

Prescripción general para la síntesis de compuestos del grupo L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) (disociación del grupo protector BOC N-terminal)

10 5,0 mmol de BOC-L-EAA-D-Met (BOC-LD-I) o BOC-D-Met-L-EAA (Z-LD-II) se disolvieron en 50 ml de ácido acético glacial y se mezclaron con 5,0 g (3,6 ml) de HBr al 33% en ácido acético (1,65 g; 4,0 eq.). Al término de la reacción, la disolución de reacción se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se recogió en 40 ml de agua y se extrajo tres veces en cada caso con 40 ml de dietil-éter. La fase acuosa se neutralizó lentamente en el baño de hielo durante enfriamiento constante con disolución de NaOH al 20%. La disolución se lavó tres veces en cada caso con 40 ml de dietil-éter y la fase acuosa se concentró en el evaporador rotatorio, precipitando un sólido voluminoso de color blanco.

15 El dipéptido se filtró con succión, se lavó con un poco de agua y se secó en vacío.

9a) D-Met-L-Leu (DL-IIb)



20 Rendimiento: 860 mg (66%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

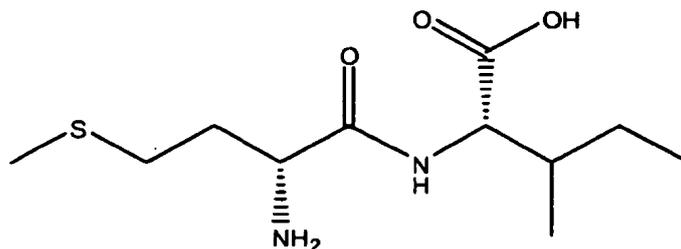
$^1\text{H-RMN}$ de H-D-Met-L-Leu (**DL-IIb**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{HCl}$): $\delta = 0,85$ (d, $^3J = 6,3$ Hz, 3H, CH_3); 0,90 (d, $^3J = 6,3$ Hz, 3H, CH_3); 1,50-1,70 (m, 3H, SCH_2CH_2 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,00-2,10 (m, 5H, SCH_3 , CH_2CH); 2,45-2,55 (m, 2H, SCH_2); 3,88-3,94 (m, 1H, CH); 4,22-4,30 (m, 1H, CH); 8,40-8,60 (m, 3H, NH_3^+); 8,95 (d, $^3J = 8,3$ Hz, 1H, NH)

25 $^{13}\text{C-RMN}$ de D-Met-L-Leu (**DL-IIb**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 14,56$; 21,16; 22,95; 24,50; 28,21; 31,22; 50,66; 51,77; 168,16; 173,50

HRMS (PESI):

30 Calculado: 263,14294 $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (MH^+)
Encontrado: 263,14224

9b) D-Met-L-Ile (DL-IIc)



35 Rendimiento: 900 mg (69%), pureza: 99% (HPLC), sólido voluminoso blanco

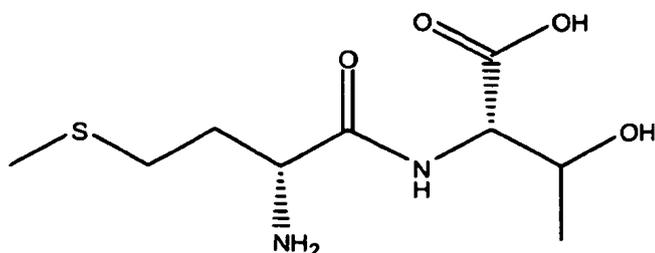
$^1\text{H-RMN}$ de D-Met-L-Ile (**DL-IIc**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{HCl}$): $\delta = 0,82\text{-}0,90$ (m, 6H, 2 x CH_3); 1,16-1,44 (m, 2H, SCH_2CH_3); 1,80-1,90 (m, 1H, CH); 2,00-2,10 (m, 2H, CH_2); 2,05 (s, 3H, SCH_3); 2,46-2,54 (m, 2H, SCH_2); 3,96-4,02 (m, 1H, CH); 4,24-4,30 (m, 1H, CH); 8,36-8,44 (m, 3H, NH_3^+); 8,79 (d, $^3J = 8,5$ Hz, 1H, NH)

40 $^{13}\text{C-RMN}$ de D-Met-L-Ile (**DL-IIc**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{HCl}$): $\delta = 11,44$; 14,86; 15,96; 24,95; 28,58; 31,71; 36,75; 52,00; 56,82; 168,64; 172,74

HRMS (PESI):

Calculado: 263,14294

Encontrado: 263,14215

 $C_{11}H_{23}N_2O_3S$ (MH^+)5 **9c) D-Met-L-Thr (DL-Ild)**

Rendimiento: 640 mg (51%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

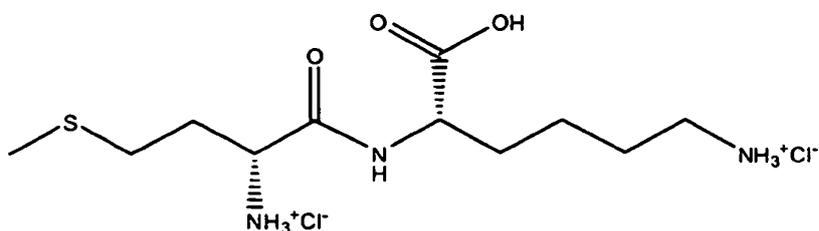
10 1H -RMN de D-Met-L-Thr (**DL-Ild**) (500 MHz, D_6 -DMSO + HCl): δ = 1,10 (d, 3J = 6,2 Hz, 3H, CHCH₃); 2,06 (s, 3H, SCH₃); 2,06-2,14 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,48-2,60 (m, 2H, SCH₂); 4,00-4,28 (m, 4H, 2 x CH, CHO); 8,40-8,46 (m, 3H, NH₃⁺); 8,77 (d, 3J = 8,6 Hz, 1H, NH)

15 ^{13}C -RMN de D-Met-L-Thr (**DL-Ild**) (500 MHz, D_6 -DMSO + HCl): δ = 15,14; 20,94; 28,74; 31,94; 52,44; 58,81; 66,97; 169,22; 172,20

HRMS (PESI):

Calculado: 251,10655

Encontrado: 251,10583

 $C_9H_{19}N_2O_4S$ (MH^+)20 **9d) D-Met-L-Lys * 2 HCl (DL-Ile-2HCl)**

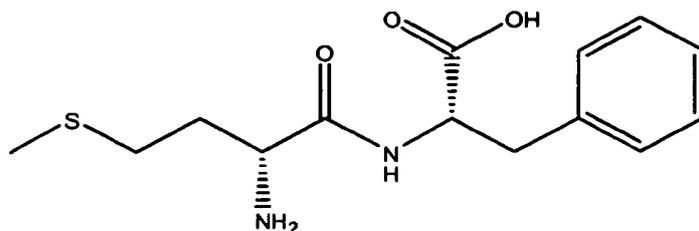
Rendimiento: 613 mg (49%), pureza: 97% (HPLC), sólido amarillento

25 1H -RMN de D-Met-L-Lys x 2HCl (**DL-Ile-2HCl**) (500 MHz, DMSO): δ = 1,32-1,42 (m, 2H, CH₂(Lys)); 1,52-1,62 (m, 2H, CH₂(Lys)); 1,64-1,80 (m, 2H, CH₂(Lys)); 2,00-2,10 (m, 5H, SCH₂CH₂, SCH₃); 2,46-2,56 (m, 2H, SCH₂); 2,70-2,82 (m, 2H, NCH₂); 3,92-4,00 (m, 1H, CH); 4,16-4,24 (m, 1H, CH); 7,9 (s ancho, 3H, NH₃⁺); 8,3 (s ancho, 3H, NH₃⁺); 8,92 (d, 3J = 7,7 Hz, 1H, NH)

HRMS (PESI):

Calculado: 278,15384

Encontrado: 278,15288

 $C_{11}H_{24}O_3S$ (MH^+)30 **9e) D-Met-L-Phe (DL-Ilg)**

35 Rendimiento: 930 mg (63%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

¹H-RMN de D-Met-L-Phe (**DL-IIg**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 1,64-1,82 (m, 2H, SCH₂CH₂); 1,95 (s, 3H, SCH₃); 2,10-2,26 (m, 2H, SCH₂); 2,80-3,20 (m, 2H, CH₂Ph); 3,70 (t, ³J = 6,1 Hz, 1H, CHCH₂Ph); 4,42-4,50 (m, 1H, CHCH₂CH₂S); 7,16-7,28 (m, 5H, Ph); 8,50-8,60 (s ancho, 1H, NH)

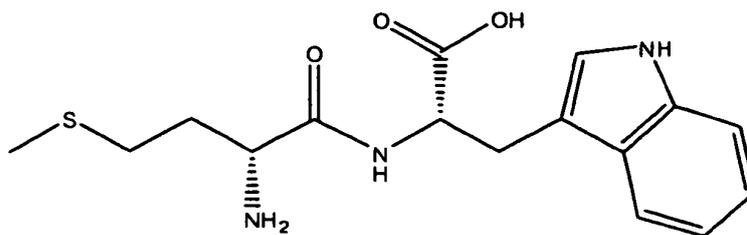
¹³C-RMN de D-Met-L-Phe (**DL-IIg**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 14,28; 28,08; 31,63; 37,03; 51,84; 53,78; 126,28; 127,97; 129,08; 137,69; 168,90; 172,65

HRMS (PESI):

Calculado: 297,12729
Encontrado: 297,12643

C₁₄H₂₁N₂O₃S (MH⁺)

9f) D-Met-L-Trp (DL-IIj)



Rendimiento: 1,38 g (82%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

¹H-RMN de D-Met-L-Trp (**DL-IIj**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 1,50-1,80 (m, 2H, SCH₂CH₂); 1,93 (s, 3H, SCH₃); 2,30-2,40 (m, 2H, SCH₂); 3,02-3,22 (m, 2H, CH₂); 3,34-3,40 (m, 1H, SCH₂CH₂CH); 4,38-4,40 (m, 1H, CH); 6,90-7,60 (m, 5H, indolilo); 8,05-8,15 (s ancho, 1H, CONH); 10,80 (s ancho, 1H, NH)

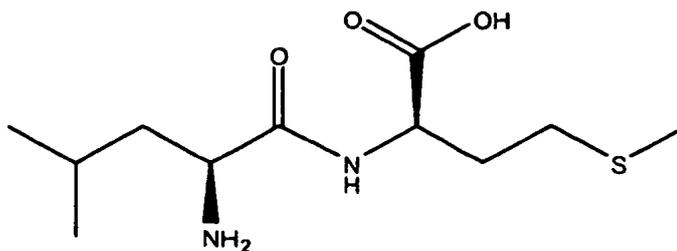
¹³C-RMN de D-Met-L-Trp (**DL-IIj**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 14,37; 27,38; 29,12; 33,28; 53,00; 53,49; 110,26; 111,17; 118,07; 118,26; 120,64; 123,36; 127,52; 135,98; 171,87; 173,53

HRMS (PESI):

Calculado: 336,13819
Encontrado: 336,13718

C₁₆H₂₂N₃O₃S (MH⁺)

9g) L-Leu-D-Met (LD-Ib)



Rendimiento: 710 mg (54%), pureza: 99% (HPLC), sólido voluminoso blanco

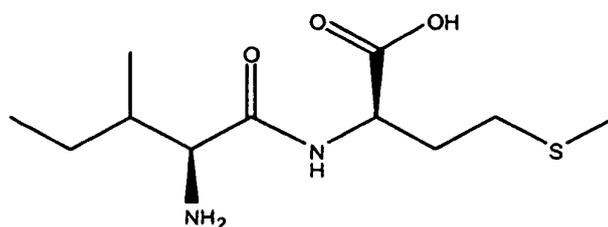
¹H-RMN de H-L-Leu-D-Met (**LD-Ib**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 0,91 (t, ³J = 5,4 Hz, 6H, 2 x CH₃); 1,62 (t, ³J = 6,8 Hz, 2H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,60-1,75 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 1,88-2,04 (m, 2H, SCH₂CH₂); 2,04 (s, 3H, SCH₃); 2,40-2,54 (m, 2H, SCH₂); 3,78-3,86 (m, 1H, CH); 4,32-4,40 (m, 1H, CH); 8,36 (d, ³J = 4,0 Hz, 3H, NH₃⁺); 9,03 (d, ³J = 7,8 Hz, 1H, NH)

¹³C-RMN de H-L-Leu-D-Met (**LD-Ib**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 14,56; 22,78; 23,33; 23,93; 29,89; 30,58; 41,03; 51,40; 51,56; 169,41; 173,03

HRMS (PESI):

Calculado: 263,14294
Encontrado: 263,14218

C₁₁H₂₃N₂O₃S (MH⁺)

9h) L-Ile-D-Met (LD-1c)

Rendimiento: 790 mg (59%), pureza: 97% (HPLC), sólido voluminoso blanco

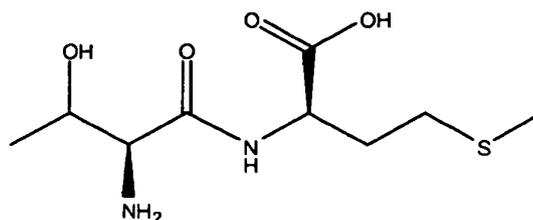
5 $^1\text{H-RMN}$ de L-Ile-D-Met (**LD-1c**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ = 0,82 (t, 3J = 7,4 Hz, 3H, CH_3CH_2); 0,86 (2, 3J = 6,6 Hz, 3H, CH_3CH); 1,02-1,12 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}^{\text{H}''}$); 1,36-1,46 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}^{\text{H}''}$); 1,64-1,72 (m, 1H, CH_3CH); 1,80-1,98 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,00 (s, 3H, SCH_3); 2,36-2,44 (m, 2H, SCH_2); 3,27 (d, 3J = 5,1 Hz, 1H, CH); 3,99 (t, 3J = 5,3 Hz; 1H, CH); 7,92 (s ancho, 1H, NH)

10 $^{13}\text{C-RMN}$ de L-Ile-D-Met (**LD-1c**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ = 11,57; 14,54; 15,60; 23,58; 29,69; 32,42; 37,90; 53,06; 58,79; 172,09; 173,37

HRMS (PESI):

15 Calculado: 263,14294
Encontrado: 263,14224

$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (MH^+)

9i) L-Thr-D-Met (LD-1d)

20 Rendimiento: 690 mg (55%), pureza: 99% (HPLC), sólido voluminoso blanco

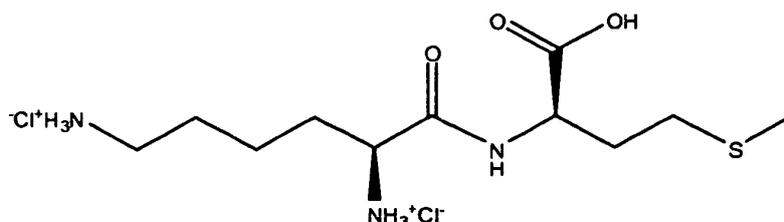
25 $^1\text{H-RMN}$ de L-Thr-D-Met (**LD-1d**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{CDCl}_3$): δ = 1,08 (d, 3J = 6,6 Hz, 3H, CH_3); 1,82-2,08 (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,02 (s, 3H, SCH_3); 2,38-2,50 (m, 2H, SCH_2); 3,06 (d, 3J = 4,2 Hz, 1H, CH); 3,88-3,94 (m, 1H, CH); 3,98-4,04 (m, 1H, CH); 7,91 (d, 3J = 7,3 Hz, 1H, NH)

$^{13}\text{C-RMN}$ de L-Thr-D-Met (**LD-1d**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{CDCl}_3$): δ = 14,75; 19,70; 30,07; 32,45; 53,71; 60,22; 67,45; 172,58; 174,24

HRMS (PESI):

30 Calculado: 251,10655
Encontrado: 251,10586

$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (MH^+)

9j) L-Lys-D-Met x 2 HCl (LD-1e-2HCl)

35 Rendimiento: 676 mg (54%), pureza: 96% (HPLC), cristales incoloros

5 $^1\text{H-RMN}$ de L-Lys-D-Met x 2HCl (**LD-le-2HCl**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 1,30\text{-}1,44$ (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{Lys})$); $1,54\text{-}1,64$ (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{Lys})$); $1,72\text{-}1,84$ (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{Lys})$); $1,90\text{-}2,04$ (m, 2H, SCH_2CH_2); 2,05 (s, 3H, SCH_3); $2,44\text{-}2,58$ (m, 2H, SCH_2); $2,70\text{-}2,80$ (m, 2H, NCH_2); $3,82\text{-}3,90$ (m, 1H, CH); $4,34\text{-}4,42$ (m, 1H, CH); 7,9 (s ancho, 3H, NH_3^+); 8,3 (s ancho, 3H, NH_3^+); 8,91 (d, $^3\text{J} = 7,9$ Hz, 1H, NH)

HRMS (PESI):

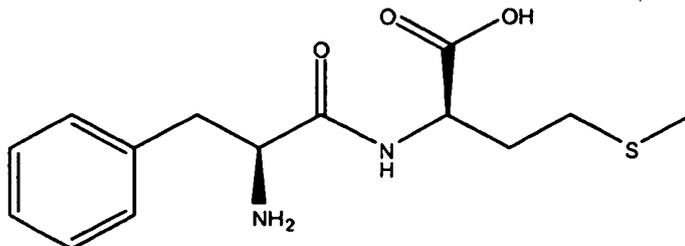
Calculado: 278,15384

Encontrado: 278,15290

$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{S}$ (MH^+)

10

9k) L-Phe-D-Met (LD-Ig)



Rendimiento: 880 mg (59%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

15 $^1\text{H-RMN}$ de L-Phe-D-Met (**LD-Ig**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{D}_2\text{O}$): $\delta = 1,60\text{-}2,02$ (m, 4H, SCH_2CH_2); 2,05 (s, 3H, SCH_3); $3,08\text{-}3,32$ (m, 2H, PhCH_2); $4,12\text{-}4,16$ (m, 1H, CH); $4,20\text{-}4,26$ (m, 1H, CH); $7,30\text{-}7,50$ (m, 5H, Ph)

20 $^{13}\text{C-RMN}$ de L-Phe-D-Met (**LD-Ig**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO} + \text{D}_2\text{O}$): $\delta = 15,37$; 30,72; 32,10; 38,09; 55,40; 55,96; 129,24; 130,50; 130,71; 136,55; 169,47; 178,42

20

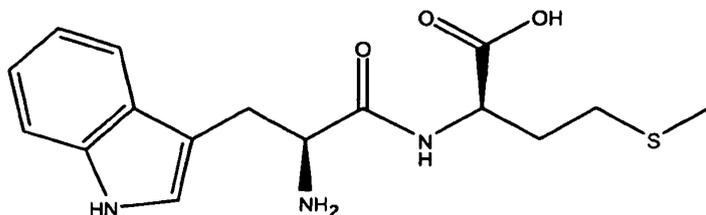
HRMS (PESI):

Calculado: 297,12729

Encontrado: 297,12646

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (MH^+)

25 **9l) L-Trp-D-Met (LD-Ij)**



Rendimiento: 1,40 g (83%), pureza: 98% (HPLC), sólido voluminoso blanco

30 $^1\text{H-RMN}$ de L-Trp-D-Met (**LD-Ij**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 1,68\text{-}1,88$ (m, 2H, SCH_2CH_2); 1,94 (s, 3H, SCH_3); 2,24 (d, $^3\text{J} = 7,9$ Hz, 2H, SCH_2); $2,80\text{-}2,88$ (m, 1H, CH); $3,10\text{-}3,16$ (m, 1H, CH); $3,70\text{-}3,76$ (m, 1H, CH); $4,00\text{-}4,06$ (m, 1H, CH); $6,90\text{-}7,60$ (m, 5H, indolilo); 8,10 (s ancho, 1H, NH); 10,90 (s ancho, 1H, NH)

35 $^{13}\text{C-RMN}$ de L-Trp-D-Met (**LD-Ij**) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 14,51$; 29,56; 29,90; 32,09; 52,78; 54,59; 109,82; 111,26; 118,15; 118,30; 120,80; 123,82; 127,20; 136,16; 172,03; 173,02

35

HRMS (PESI):

Calculado: 336,13819

Encontrado: 336,13724.

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (MH^+)

40 **Ejemplo 10:**

Síntesis química de la mezcla de diastereoisómeros de Met-Ile (Iic) a partir de 5 [2 (metiltio) etil]-2,4-imidazolidinadiona (metionin-hidantoína) (Vn) y L-isoleucina con KOH

11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,2 g (0,09 mol, pureza: 91%) de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (**Vn**) y 11,9 g (0,8 mol) de KOH al 85% se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión hasta 8 bar. Al término de la reacción el autoclave se enfrió, el sólido precipitado se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. Un flujo moderado de CO₂ se hizo pasar a través del filtrado. El sólido precipitado en este caso se filtró una vez más con succión, se lavó con un poco de agua fría y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C; peso final: 7,3 g (31% del teórico) de un sólido blanco. El ¹H-RMN coincidía con la espectros de ¹H-RMN superpuestos de L-Met-L-Ile (**LL-Ilc**) y D-Met-L-Ile (**DL-Ilc**) (véase el **Ejemplo 9b**).

10 Ejemplo 11:

Síntesis química de la mezcla de diastereoisómeros de Met-Ile (**Ilc**) a partir de N-carbamoilmetionina (**III_n**) y L-isoleucina con KOH

15 11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,5 g (0,09 mol, pureza: 99%) de N-carbamoilmetionina (**III_n**) y 11,9 g (0,18 mol) de KOH al 85% se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión hasta 7 bar. Al término de la reacción el autoclave se enfrió, el sólido precipitado se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. El filtrado se neutralizó con ácido sulfúrico al 10% y el sólido precipitado en este caso se filtró con succión, se lavó con un poco de agua fría y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C, peso final: 6,4 g (27% del teórico) de un sólido blanco. La ¹H-RMN coincidió con los espectros ¹H-RMN superpuestos de L-Met-L-Ile (**LL-Ilc**) y D-Met-L-Ile (**DL-Ilc**) (véase el **Ejemplo 9b**).

25 Ejemplo 12:

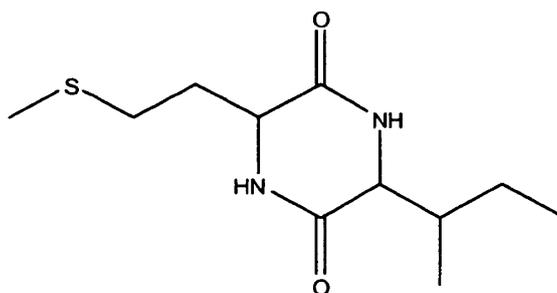
Síntesis química de la mezcla de diastereoisómeros de Met-Ile (**Ilc**) a partir de amida del ácido 2-[(aminocarbonil)amino]-4-(metiltio)butanoico (N-carbamoilmetioninamida) (**IV_n**) y L-isoleucina con KOH

30 11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,4 g (90 mmol, pureza: 98,5%) de amida del ácido 2-[(aminocarbonil)amino]-4-(metiltio)butanoico (**IV_n**) y 11,9 g (0,8 mol) de KOH al 85% se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión hasta 7 bar. Al término de la reacción, el autoclave se enfrió, el sólido precipitado se separó por filtración y se lavó con un poco de agua. El filtrado se neutralizó con ácido clorhídrico semi-concentrado y el sólido que precipitó se filtró con succión, se lavó con un poco de agua fría y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C, peso final: 8,0 g (34% del teórico) de un sólido blanco. La ¹H-RMN coincidió con los espectros ¹H-RMN superpuestos de L-Met-L-Ile (**LL-Ilc**) y D-Met-L-Ile (**DL-Ilc**) (véase el **Ejemplo 9b**).

40 Ejemplo 13:

Síntesis química de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) a partir de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidindiona (metionin-hidantoína) (**Vn**) y L-isoleucina

45 11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,2 g (0,09 mol, pureza: 91%) de 5-[2-(metiltio)etil]-2,4-imidazolidinadiona (**Vn**) y 7,1 g (0,9 mol) de (NH₄)HCO₃ se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión. Mediante la liberación de gas de vez en cuando, la presión se mantuvo constante en 8 bar. Al término de la reacción, el autoclave se enfrió en un baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el sólido separado por filtración se lavó varias veces con agua y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C, peso final: 9,9 g (45% del teórico) de **Vlc** en forma de un sólido blanco.



50

¹H-RMN de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) (500 MHz, D₆-DMSO): δ = 0,85 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, CH₂CH₃); 0,90 (d, ³J = 7,4 Hz, 3H, CHCH₃); 1,10-1,50 (m, 2H, SCH₂CH₂); 1,80-1,90 (m, 1H, CH); 1,90-2,00 (m, 2H, CH₂); 2,04 (s, 3H, SCH₃); 2,42-2,58 (m, 2H, SCH₂); 3,64-3,68 (m, 1H, CH); 3,94-3,98 (m, 1H, CH); 8,08-8,16 (m, 2H, 2 x NH)

¹³C-RMN de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) (500 MHz, D₆-DMSO + HCl): δ = 12,02; 14,85; 15,27; 24,61; 28,74; 32,15; 39,90; 52,92; 59,34; 167,90; 168,10

Ejemplo 14:

Síntesis química de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) a partir de N-carbamoilmetionina (**Illn**) y L-isoleucina

11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,5 g (0,09 mol, pureza: 99%) de N-carbamoilmetionina (**Illn**) y 7,1 g (0,9 mol) de (NH₄)HCO₃ se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión. Mediante la liberación de gas de vez en cuando, la presión se mantuvo constante en 8 bar. Al término de la reacción, el autoclave se enfrió en un baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el sólido separado por filtración se lavó varias veces con agua y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C, peso final: 9,1 g (41,3% del teórico) de compuesto **Vlc** en forma de un sólido blanco. La RMN coincidió con la RMN del **Ejemplo 13**.

Ejemplo 15:

Síntesis química de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) a partir de amida del ácido 2-[(aminocarbonil)amino]-4-(metiltio)butanoico (N-carbamoilmetioninamida) (**IVn**) y L-isoleucina

11,8 g (0,09 mol) de L-isoleucina, 17,4 g (90 mmol, pureza: 98,5%) de amida del ácido 2-[(aminocarbonil)amino]-4-(metiltio)butanoico (**IVn**) y 7,1 g (0,9 mol) de (NH₄)HCO₃ se disolvieron en 150 ml de agua y se agitó en un autoclave de acero Roth de 200 ml con agitación magnética durante 5 horas a 150°C, ascendiendo la presión. Mediante la liberación de gas de vez en cuando, la presión se mantuvo constante en 8 bar. Al término de la reacción, el autoclave se enfrió en un baño de hielo. La suspensión obtenida se filtró a continuación, el sólido separado por filtración se lavó varias veces con agua y se secó en el vacío de la bomba de aceite durante varias horas a 30°C, peso final: 10,3 g (47% del teórico) de un sólido blanco **IVc**. La RMN coincidió con la RMN del **Ejemplo 13**.

Ejemplo 16:

Síntesis de la mezcla de diastereoisómeros de Ile-Met (**Ic**) Met-Ile (**Iic**) a partir de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) con ácido clorhídrico concentrado

24,4 g (100 mmol) de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) se suspendieron con 66 g de agua. Con agitación se añadieron lentamente, gota a gota, 11 g de ácido clorhídrico conc. y a continuación se calentó a reflujo con cuidado, agitando muy intensamente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 8 horas, con lo cual todo el sólido pasó a disolución. Durante el enfriamiento subsiguiente, precipitó una pequeña cantidad de dicetopiperazina que no había reaccionado, la cual se separó por filtración. Después, el filtrado se ajustó a pH 5-6 con agua amoniacal al 32% en un vaso de precipitados con un baño de hielo. En este caso precipita una mezcla de DL-Met-DL-Ile (mezcla de diastereoisómeros de **Iic**) y DL-Ile-DL-Met (mezcla de diastereoisómeros de **Ic**) en forma de un sólido voluminoso blanco. El sólido se secó en un armario de secado a 40 °C en el vacío de la bomba de chorro de agua, rendimiento: 21,5 g (82,0%).

Ejemplo 17:

Síntesis de la mezcla de diastereoisómeros de Ile-Met (**Ic**) y Met-Ile (**Iic**) a partir de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**) en condiciones alcalinas con amoniaco

19,6 g (0,8 mol) de 3-[2-(metiltio)etil]-6-(1-(metil)propil)-2,5-piperazinadiona (**Vlc**), 22,4 ml de disolución de amoniaco al 25% y 160 ml de agua se calientan en un autoclave a 150°C durante 2 horas. Después de enfriar, la dicetopiperazina que no ha reaccionado se filtra con succión. Ésta se puede utilizar de nuevo en una siguiente tanda. El filtrado se concentró en el evaporador rotatorio a una temperatura del agua de 80°C hasta que precipitaron los primeros cristales. Después de enfriar y dejar reposar durante la noche, después de la filtración y el secado, se pudo aislar una mezcla de DL-Met-DL-Ile (mezcla de diastereoisómeros de **Iic**) y DL-Ile-DL-Met (mezcla de diastereoisómeros de **Ic**) en forma de

un sólido voluminoso blanco, rendimiento: 12,2 g (58%).

Ejemplo 18:

5 Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-L-Met (LL-I) o bien L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de digestión de carpas omnívoras

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

10 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejaron al descubierto los intestinos de cinco carpas comunes (*Cyprinus carpio morpha noblis*) de un año de edad, se enjuagaron con agua, se practicaron cortes longitudinales y en cada caso se separó mediante raspado la mucosa intestinal. Ésta se trituró en una batidora junto con hielo picado. La suspensión resultante se trató con una varilla de ultrasonidos para disgregar cualquier célula que estuviera todavía intacta. Para separar los componentes celulares y la grasa, la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 4°C, el homogeneizado se separó por decantación y se esterilizó con una traza de Thimerosal. De 5 carpas comunes se obtuvieron 296,3 ml de disolución enzimática de la mucosa intestinal. La disolución se almacenó en la oscuridad a 4°C.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

20 L-Met-L-EAA (LL-II) o bien L-EAA-L-Met (LL-I) se recogió en solución tampón TRIS/HCl y se mezcló con la disolución enzimática. Como comparación y para evaluar la velocidad de disociación puramente química, en cada caso se aplicó un valor ciego sin disolución enzimática (véase la **Tabla 3**). De vez en cuando se tomó una muestra y su composición se detectó y cuantificó con ayuda de una HPLC calibrada. La conversión se determinó como el cociente del contenido de metionina y el contenido de L-Met-L-EAA (LL-II) o L-EAA-L-Met (LL-I) (véanse las **Figs. 1 y 2**).

		Muestra	Valor ciego	
30	Muestra	Sustrato (LL-I o bien LL-II)	0,15 mmol	0,15 mmol
		Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	7,5 ml	8,1 ml
35	Inicio de la reacción	Disolución enzimática (disolución $\hat{=}$ al 1,5% de carpa)	589 μ l	----
40	Reacción		37 °C	37 °C
	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%		

Tabla 3

Ejemplo 19:

50 Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-D-Met (LD-I) o bien D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de digestión de carpas omnívoras

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

55 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejaron al descubierto los intestinos de cinco carpas comunes (*Cyprinus carpio morpha noblis*) de un año de edad y se elaboraron como se describe en el **Ejemplo 18**.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

60 D-Met-L-EAA (DL-II) o bien L-EAA-D-Met (DL-I) se recogió en solución tampón TRIS/HCl y se mezcló con la disolución

enzimática. Como comparación y para evaluar la velocidad de disociación puramente química, en cada caso se aplicó un valor ciego sin disolución enzimática (véase la **Tabla 4**). De vez en cuando se tomó una muestra y su composición se detectó y cuantificó con ayuda de una HPLC calibrada. La conversión se determinó como el cociente de la superficie de metionina y la superficie de D-Met-L-EAA (DL-II) o L-EAA-D-Met (DL-I) (véase la **Fig. 7**).

		Muestra	Valor ciego
5	Muestra	0,15 mmol	0,15 mmol
	Sustrato (LD-I o bien DL-II)		
10		7,5 ml	13,4 ml
	Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5		
15	Inicio de la reacción	5,89 ml	----
	Disolución enzimática (disolución $\hat{=}$ al 15% de carpa)		
	Reacción	37 °C	37 °C
20	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

Tabla 4**Ejemplo 20:**

25 **Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-L-Met (LL-I) o bien L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de digestión de truchas carnívoras**

30 a) Aislamiento de las enzimas de digestión de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejaron al descubierto los intestinos de seis truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de un año de edad y se elaboraron como se describe en el **Ejemplo 18**.

35 b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo análogamente al **Ejemplo 18** (véanse la **Tabla 5**, **Figs. 3 y 4**).

		Muestra	Valor ciego
40	Muestra	0,15 mmol	0,15 mmol
	Sustrato (LL-I o bien LL-II)		
45		7,5 ml	7,9 ml
	Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5		
	Inicio de la reacción	424 μ l	----
	Disolución enzimática (disolución $\hat{=}$ al 1,0% de trucha)		
50	Reacción	37 °C	37 °C
	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

55 **Tabla 5****Ejemplo 21:**

60 **Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-D-Met (LD-I) o bien D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de digestión de truchas carnívoras**

a) Aislamiento de las enzimas de digestión de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

5 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejaron al descubierto los intestinos de seis truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de un año de edad y se elaboraron como se describe en el **Ejemplo 18**.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

10 Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo análogamente al **Ejemplo 19** (véanse la **Tabla 6**, **Fig. 11**).

		Muestra	Valor ciego	
15	Muestra	Sustrato (LD-I o bien DL-II)	0,143 mmol (40,1 mg)	0,143 mmol (40,1 mg)
		Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	5,7 ml	9,9 ml
20	Inicio de la reacción	Disolución enzimática (disolución \approx al 10% de trucha)	4,2 ml	---
25	Reacción		37 °C	37 °C
	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%		

Tabla 6

30 **Ejemplo 22:**

Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-L-Met (LL-I) o bien L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de digestión de camarones omnívoros

35 a) Aislamiento de las enzimas de digestión de camarones blancos (*Litopenaeus vannamei*)

40 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de Ezquerro y García-Carreño (J. Food Biochem. 1999, 23, 59-74). Para ello, se retiró el hepatopáncreas de cinco camarones blancos de kilogramo (*Litopenaeus vannamei*) y se desmenuzó junto con hielo picado en una batidora. El tratamiento ulterior se llevó a cabo análogamente al **Ejemplo 18**.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

45 Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo análogamente al **Ejemplo 18** (véanse la **Tabla 7**, **Figs. 5 y 6**).

		Muestra	Valor ciego
	Muestra	Sustrato (LL-I o bien LL-II)	0,15 mmol
5		Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	7,5 ml
10	Inicio de la reacción	Disolución enzimática (\approx 2 camarones)	258 μ l
	Reacción		37 °C
15	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

Tabla 7

Ejemplo 23:

Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-D-Met (LD-I) o bien D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de digestión de camarones omnívoros

a) Aislamiento de las enzimas de digestión de camarones blancos (*Litopenaeus vannamei*)

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de Ezquerro y García-Carreno (J. Food Biochem. 1999, 23, 59-74). Para ello, se retiró el hepatopáncreas de cinco camarones blancos de kilogramo (*Litopenaeus vannamei*) y se desmenuzó junto con hielo picado en una batidora. El tratamiento ulterior se llevó a cabo análogamente al **Ejemplo 18**.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo análogamente al **Ejemplo 19** (véanse la **Tabla 8**, **Fig. 10**).

		Muestra	Valor ciego
	Muestra	Sustrato (LD-I o bien DL-II)	0,143 mmol (40,1 mg)
40		Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	5,7 ml
45	Inicio de la reacción	Disolución enzimática (\approx 8 camarones)	2,2 ml
	Reacción		37 °C
50	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

Tabla 8

Ejemplo 24:

Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-L-Met (LL-I) o bien L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de digestión de gallinas

a) Aislamiento de las enzimas de digestión de gallinas

El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejó al descubierto el intestino de una gallina, se enjuagó con agua, se practicó un corte longitudinal y en cada caso se separó mediante raspado la mucosa intestinal. Ésta se trituró en una batidora junto con hielo picado. La suspensión resultante se trató con una varilla de ultrasonidos, para disgregar cualquier célula que estuviera todavía intacta. Para separar los componentes celulares y la grasa, la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 4°C, el homogeneizado se separó por decantación y se esterilizó con una traza de Thimerosal. De una gallina se obtuvieron 118,9 ml de disolución enzimática de la mucosa intestinal. La disolución se almacenó en la oscuridad a 4°C.

10 b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

L-Met-L-EAA (LL-II) o bien L-EAA-L-Met (LL-I) se recogió en solución tampón TRIS/HCl y se mezcló con la disolución enzimática. Como comparación y para evaluar la velocidad de disociación puramente química, en cada caso se aplicó un valor ciego sin disolución enzimática. De vez en cuando se tomó una muestra y su composición se detectó y cuantificó con ayuda de una HPLC calibrada. La conversión se determinó como el cociente del contenido de metionina y el contenido de L-Met-L-EAA (LL-II) o L-EAA-L-Met (LL-I) (véanse la **Tabla 9, Fig. 16**).

		Muestra	Valor ciego
20	Muestra	0,15 mmol	0,15 mmol
	Sustrato (LL-I o bien LL-II)		
	Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	11,3 ml	12,5 ml
25	Inicio de la reacción	Disolución enzimática (disolución $\hat{=}$ al 1,0% de gallina)	1,19 ml

30	Reacción	37 °C	37 °C
	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

35 **Tabla 9**

Ejemplo 25:

40 **Ensayos de digestión *in vitro* de L-EAA-D-Met (LD-I) o bien D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de digestión de gallinas**

a) Aislamiento de las enzimas de digestión de gallinas

45 El aislamiento de las enzimas de digestión se llevó a cabo en base al método de EID y MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Para ello, se dejó al descubierto el intestino de una gallina, y se trató como se describe en el **Ejemplo 24**.

b) Realización de los ensayos de digestión *in vitro*

50 D-Met-L-EAA (DL-II) o bien L-EAA-D-Met (LD-I) se recogió en solución tampón TRIS/HCl y se mezcló con la disolución enzimática. Como comparación y para evaluar la velocidad de disociación puramente química, en cada caso se aplicó un valor ciego sin disolución enzimática. De vez en cuando se tomó una muestra y su composición se detectó y cuantificó con ayuda de una HPLC calibrada. La conversión se determinó como el cociente de la superficie de metionina y la superficie de D-Met-L-EAA (DL-II) o L-EAA-D-Met (LD-I) (véanse la **Tabla 10, Fig. 17**).

ES 2 511 995 T3

		Muestra	Valor ciego
5	Muestra	0,15 mmol	0,15 mmol
	Sustrato (LD-I o bien DL-II)		
	Solución tampón TRIS/HCl, pH 9,5	11,3 ml	12,5 ml
10	Inicio de la reacción	1,19 ml	----
	Disolución enzimática (disolución ≙ al 1% de gallina)		
15	Reacción	37 °C	37 °C
	Interrupción de la reacción	0,2 ml de disolución de reacción se recogieron en 9,8 ml de disolución de H ₃ PO ₄ al 10%	

Tabla 10

20

REIVINDICACIONES

1. Aditivo para piensos que contiene dipéptidos o sus sales, en donde un residuo aminoácido del dipéptido es un residuo DL-metionilo y el otro residuo aminoácido del dipéptido es un aminoácido en la configuración L, seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.

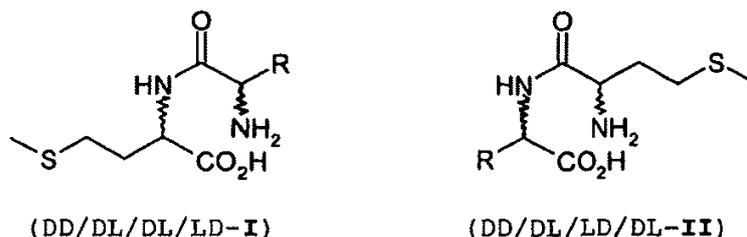
2. Aditivo para piensos según la reivindicación 1, que contiene dipéptidos de la fórmula general DL-metionil-L-EAA y/o L-EAA-DL-metionina, en donde L-EAA es un aminoácido en la configuración L, seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.

3. Mezcla de piensos que contiene un aditivo para piensos según la reivindicación 1 ó 2.

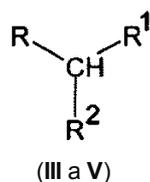
4. Mezcla de piensos según la reivindicación 3, que contiene DL-metionil-L-EAA y/o L-EAA-DL-metionina, solos en forma de D-metionil-L-EAA, L-metionil-L-EAA, L-EAA-D-metionina o L-EAA-L-metionina, como mezcla entre sí o también como mezcla con D-metionil-D-EAA, L-metionil-D-EAA, D-EAA-D-metionina o D-EAA-L-metionina, preferiblemente en cada caso adicionalmente en mezcla con DL-metionina, preferiblemente con una proporción de DL-metionina de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 0,1 a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 30% en peso, preferiblemente en cada caso adicionalmente en mezcla con un L-EAA tal como, por ejemplo, L-lisina, preferiblemente con una proporción de L-EAA de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 0,1 a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 1 a 30% en peso.

5. Dipéptido o una sal del mismo de la fórmula general DL-metionil-DL-EAA o DL-EAA-DL-metionina, en donde EAA es un aminoácido, preferiblemente en la configuración L, seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.

6. Un procedimiento para la preparación de un dipéptido que contiene solamente un residuo metionilo según la fórmula DD/LL/DL/LD-I o DD/LL/DL/LD-II:



por reacción de un aminoácido con un derivado de urea de las fórmulas generales III a V,



en donde R está definido como sigue:

- la a Va:** R = 1-metiletil- (valina)
- lb a Vb:** R = 2-metilpropil- (leucina)
- lc a Vc:** R = (1S)-1-metilpropil- (isoleucina)
- ld a Vd:** R = (1R)-1-hidroxietil (treonina)
- le a Ve:** R = 4-aminobutil- (lisina)
- lf a Vf:** R = 3-[(aminoiminometil)amino]propil- (arginina)
- lg a Vg:** R = bencil- (fenilalanina)
- lh a Vh:** R = (1H-imidazol-4-il)metil- (histidina)
- lj a Vj:** R = (1H-indol-3-il)metil- (triptófano)
- lk a Vk:** R = -CH₂-SH (cisteína)
- lm a Vm:** R = -CH₂-S-S-CH₂-C(H)NH₂-COOH (cistina)
- lln a Vn:** R = -CH₂-CH₂-S-CH₃ (metionina)

en donde los radicales R¹ y R² en los derivados de urea III, IV y V se definen como sigue:

en donde **IIIa-n: R¹ = COOH, R² = NHCONH₂**



y

5 en donde R significa un residuo metionilo y el aminoácido añadido se selecciona del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina,

o

el aminoácido añadido es metionina y R es un residuo aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína y cistina.

10 7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que se utiliza metionin-hidantoína o la hidantoína de un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina como producto de partida o se forma de forma intermedia como un producto intermedio.

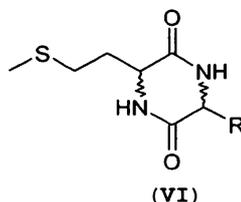
15 8. El procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que se hace reaccionar una disolución que contiene metionin-hidantoína y agua con el aminoácido en condiciones de carácter básico, o se hace reaccionar una disolución que contiene la hidantoína del aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina y agua con metionina en condiciones de carácter básico.

20 9. El procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el valor del pH de la disolución que contiene el derivado de urea se ajusta a 7 hasta 14, y/o la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 30 a 200°C, y/o la reacción se lleva a cabo a una presión de 2 a 100 bar.

25 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la disolución que contiene metionin-hidantoína y agua o la disolución que contiene la hidantoína del aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina y agua se ha formado previamente a partir de uno o más de los compuestos III, IV y V.

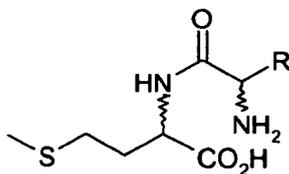
11. El procedimiento según la reivindicación 6, que comprende las siguientes etapas:

30 a) reacción del derivado de urea de acuerdo con las fórmulas III, IV o V con el aminoácido para dar una dicetopiperazina VI de la fórmula,

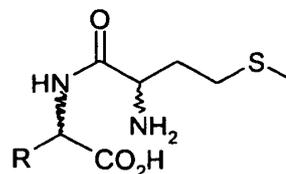


en donde R es como se define en la reivindicación 6;

35 b) reacción de la dicetopiperazina VI para dar una mezcla a base de dipéptidos con las fórmulas DD / LL / DL / LD-I y DD / LL / DL / LD-II:



(DD/LL/DL/LD-I)



(DD/LL/DL/LD-II)

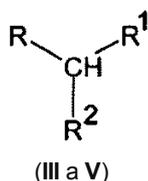
en donde R es como se define en la reivindicación 6.

40 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la reacción del derivado de urea con el aminoácido para dar la dicetopiperazina tiene lugar a una temperatura de 20°C a 200°C y/o bajo presión, preferiblemente a una presión de 2 a 90 bar.

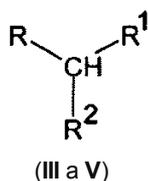
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que la reacción del derivado de urea

con el aminoácido para dar la dicetopiperazina tiene lugar en presencia de una base, preferiblemente de una base seleccionada del grupo de bases nitrogenadas, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, KHCO_3 , K_2CO_3 , mezcla de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, sales carbamato, bases alcalinas y alcalinotérreas.

- 5 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la reacción para dar la dicetopiperazina tiene lugar mediante reacción del derivado de urea de fórmula,



- 10 en donde R significa un residuo metionilo, con un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína o cistina
o
mediante reacción del derivado de urea de la fórmula,



- 15 en donde R es un residuo aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína o cistina, con el aminoácido metionina.

- 20 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla a base de dipéptidos de las fórmulas I y II tiene lugar mediante hidrólisis de carácter ácido, preferiblemente en presencia de un ácido seleccionado del grupo de los ácidos minerales, HCl , H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , ácidos fosfóricos, ácidos carboxílicos y ácidos hidroxicarboxílicos.

- 25 16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la reacción de la dicetopiperazina para dar una mezcla a base de dipéptidos de las fórmulas I y II tiene lugar mediante hidrólisis de carácter básico, preferiblemente a un pH de 7 a 14, preferiblemente utilizando una base del grupo de bases nitrogenadas, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, mezcla de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, sales carbamato, KHCO_3 , K_2CO_3 , carbonatos, bases alcalinas y alcalinotérreas.

- 30 17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, en el que el derivado de urea III a V se presenta en la configuración D, en la configuración L o en una mezcla a base de las configuraciones D y L, preferiblemente en una mezcla a base de las configuraciones D y L, cuando el derivado de urea se deriva de metionina (IIIa a Vn), o

- 35 en el que el derivado de urea III a V se presenta en la configuración D, en la configuración L o en una mezcla a base de las configuraciones D y L, preferiblemente en la configuración L, cuando el derivado de urea III a V se deriva de un aminoácido seleccionado del grupo de lisina, treonina, triptófano, histidina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, cisteína, cistina.

- 40 18. Un procedimiento para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros de los dipéptidos de las fórmulas I y II mediante cristalización en disoluciones de reacción de carácter básico que se obtuvieron según la reivindicación 16, preferiblemente por que la disolución se ajusta con un ácido a un valor del pH de 2 a 10, de manera particularmente preferida a un valor del pH de 3 a 9, de manera muy particularmente preferida al punto isoeléctrico correspondiente del respectivo dipéptido de la fórmula I o bien II, y el ajuste del pH tiene lugar preferiblemente con un ácido seleccionado del grupo de los ácidos minerales, HCl , H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , ácidos fosfóricos, ácidos carboxílicos y ácidos hidroxicarboxílicos.

- 45 19. Un procedimiento para el aislamiento de la mezcla de diastereoisómeros de los dipéptidos de las fórmulas I y II, mediante cristalización en disoluciones de reacción de carácter ácido que se obtuvieron según la reivindicación 15, preferiblemente por que la disolución se ajusta mediante la adición de una base a un valor del pH de 2 a 10, de manera particularmente preferida a un valor del pH de 3 a 9, de manera muy particularmente preferida al punto isoeléctrico correspondiente del respectivo dipéptido de la fórmula I o bien II, en donde la base se selecciona preferiblemente del

- 50

grupo de NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, bases nitrogenadas, NH_4OH , sales carbamato, KHCO_3 , K_2CO_3 , carbonatos, bases alcalinas y alcalinotérreas.

- 5 20. Uso de los compuestos I y II según la reivindicación 6 como aditivo para piensos para animales útiles, preferiblemente para aves de corral, cerdos, rumiantes, peces de agua dulce o agua salada, crustáceos o animales domésticos.

Disociación de dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-L) con enzimas de la carpa común

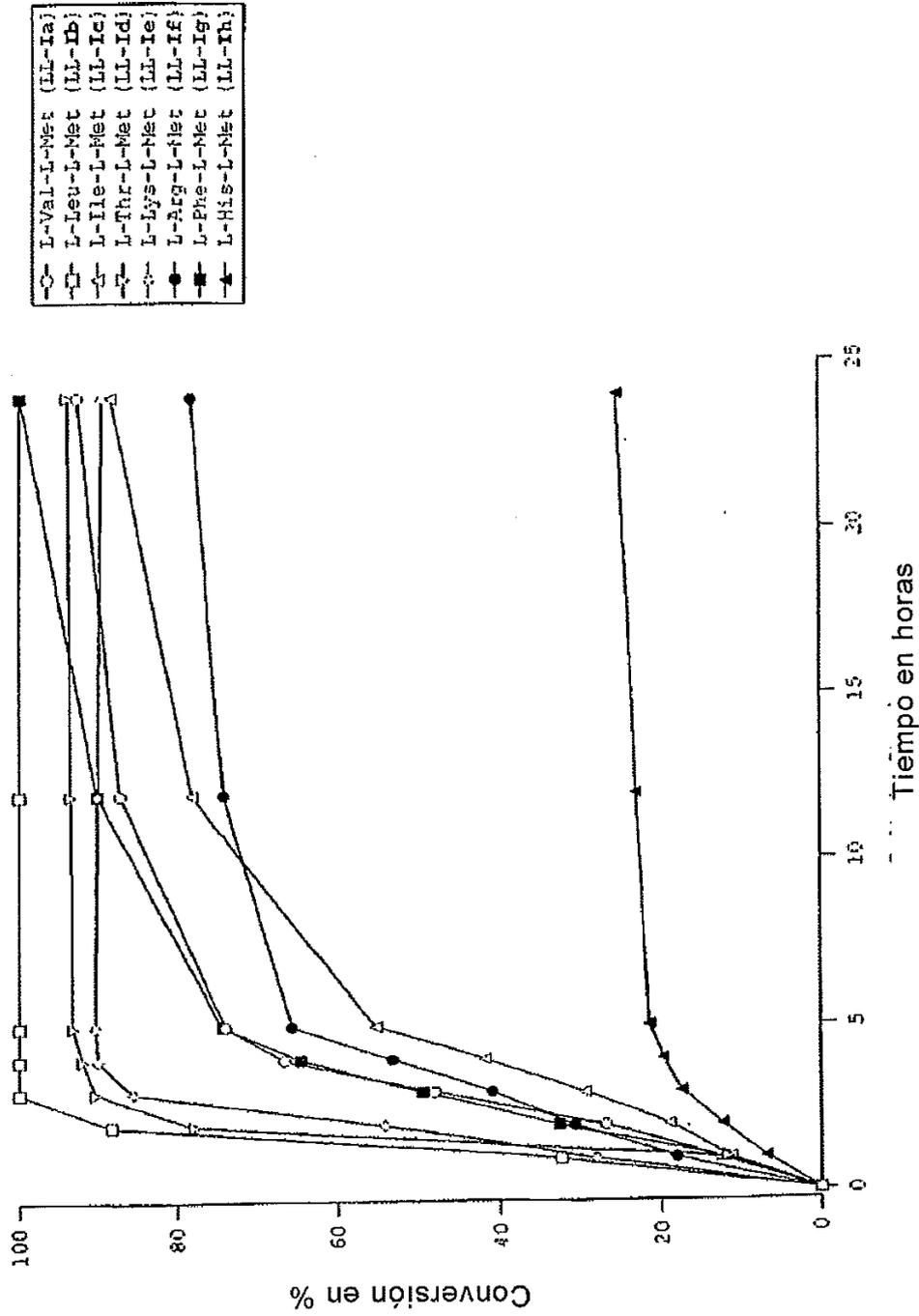


Figura 1

Disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de carpa común

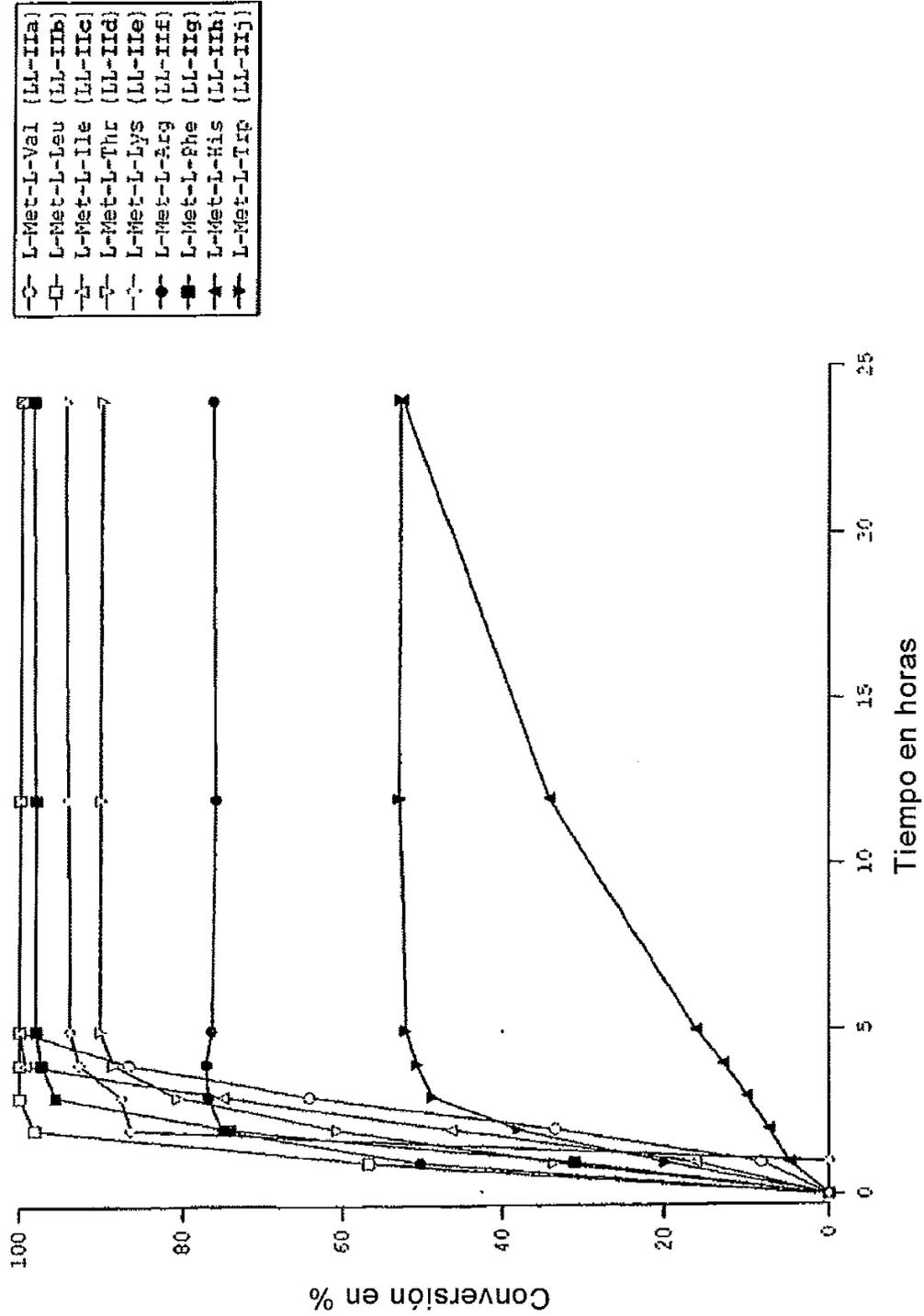


Figura 2

Disociación de dipéptidos de L-EAA-L-Met (LL-I) con enzimas de la trucha arco iris

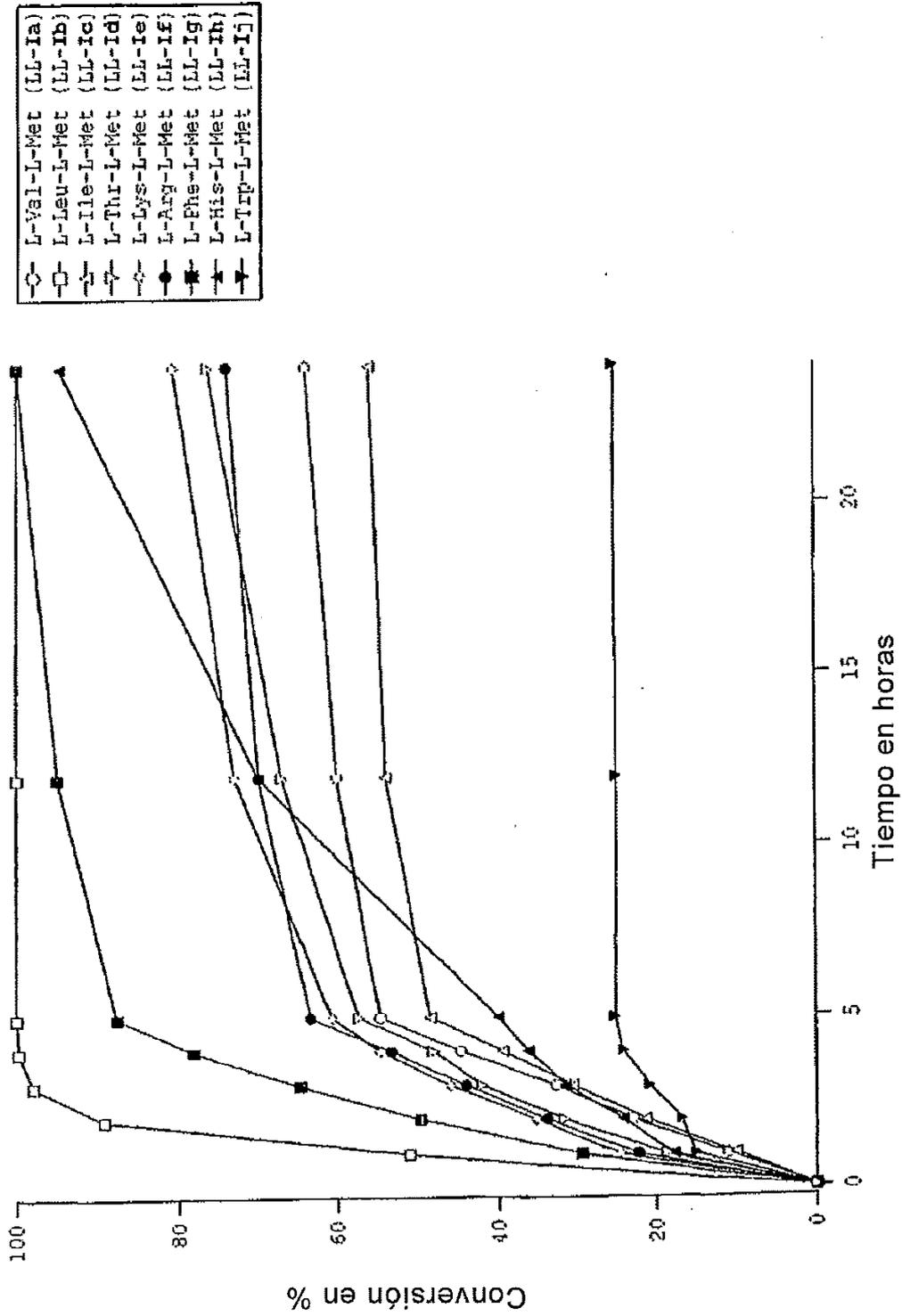


Figura 3

Disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de la trucha arco iris

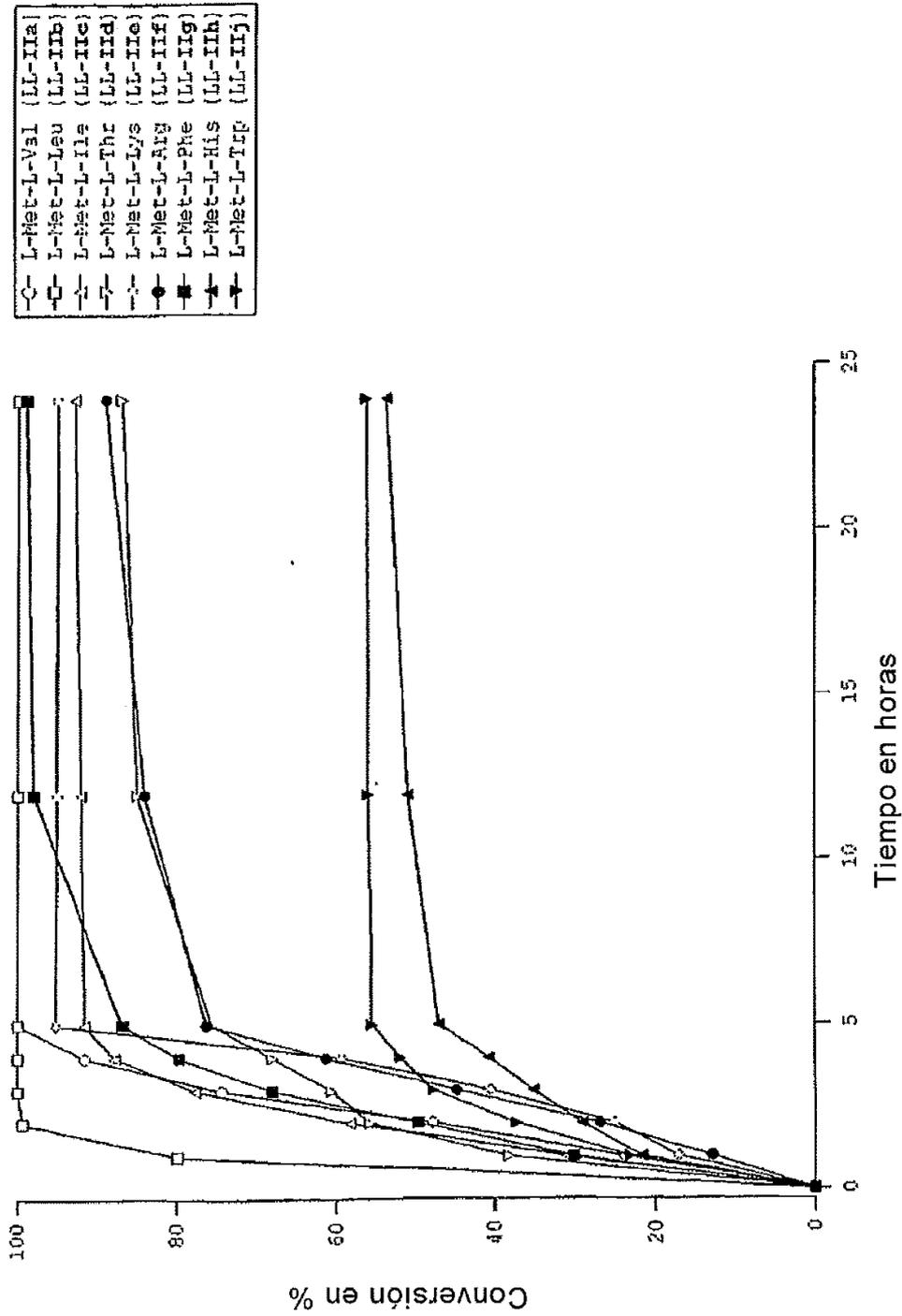


Figura 4

Disociación de dipéptidos L-EAA-L-Met (LL-I) con enzimas del camarón blanco

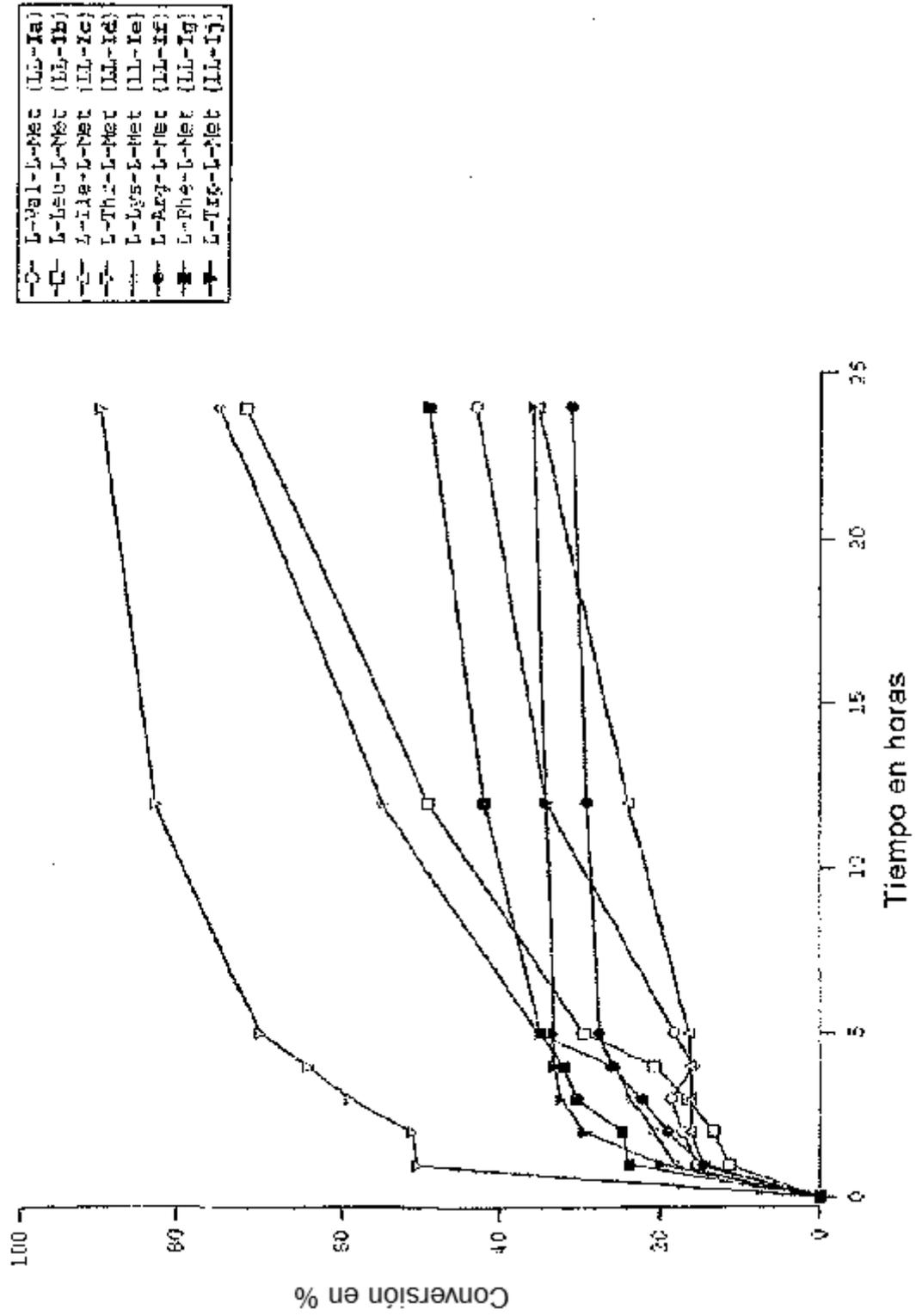


Figura 5

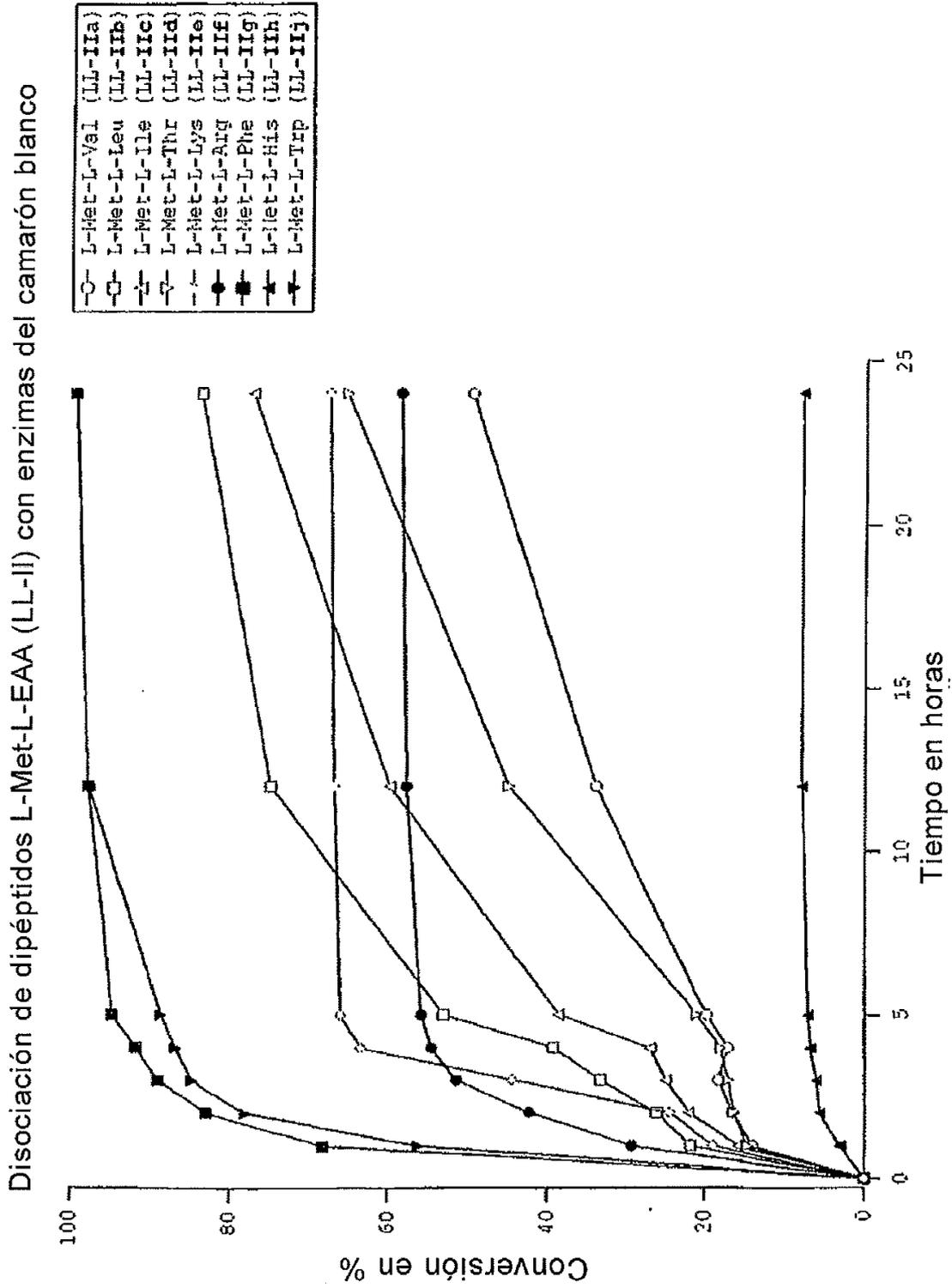


Figura 6

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de carpa común

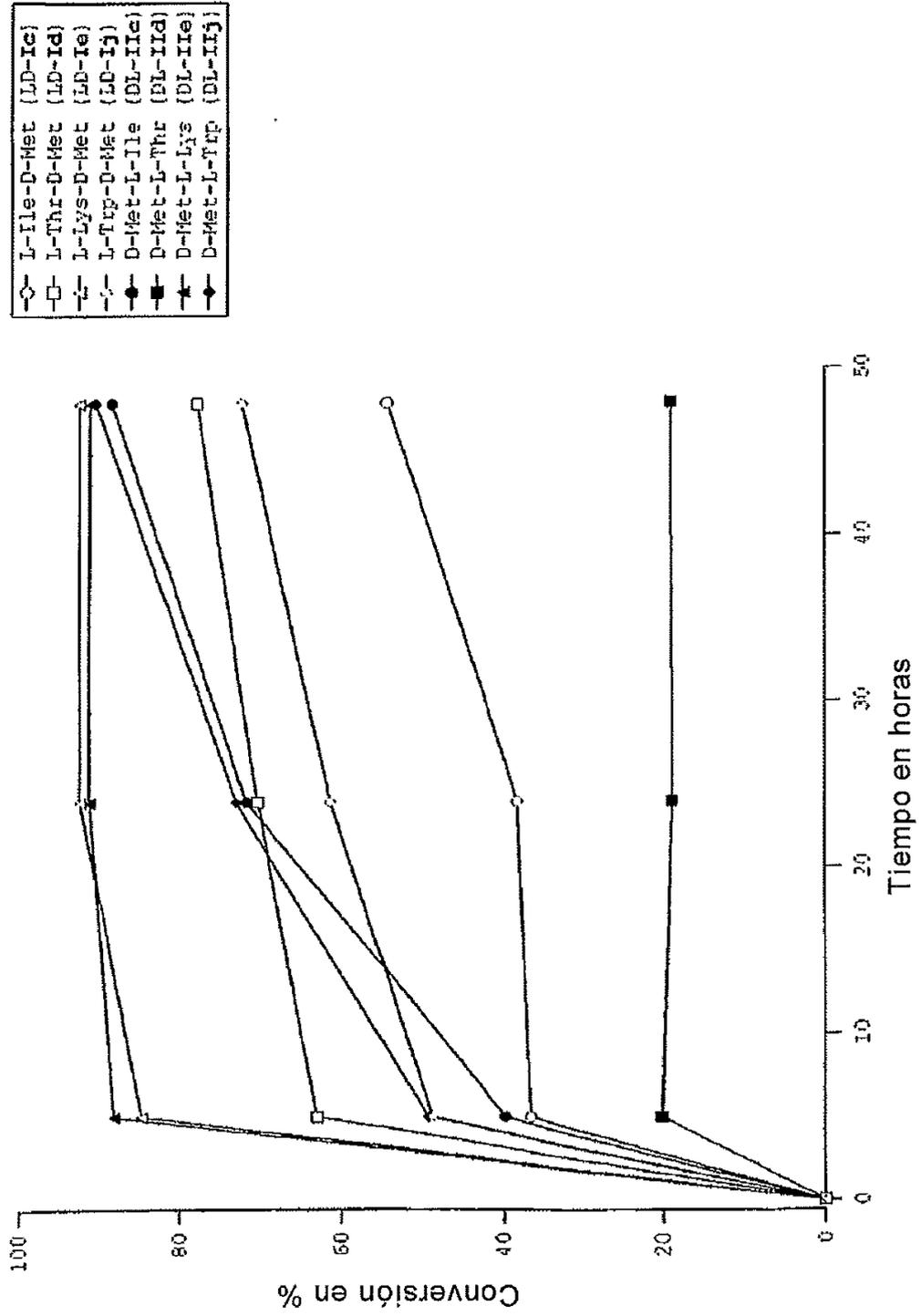


Figura 7

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de carpa herbívora

- L-Thr-D-Met (LD-IId)
- △ L-Lys-D-Met (LD-Ie)
- L-Phe-D-Met (LD-Ig)
- ◐ L-Trp-D-Met (LD-Ij)
- D-Met-L-Thr (DL-IIId)
- ▲ D-Met-L-Lys (DL-IIe)
- D-Met-L-Phe (DL-IIg)
- ▼ D-Met-L-Trp (DL-IIj)

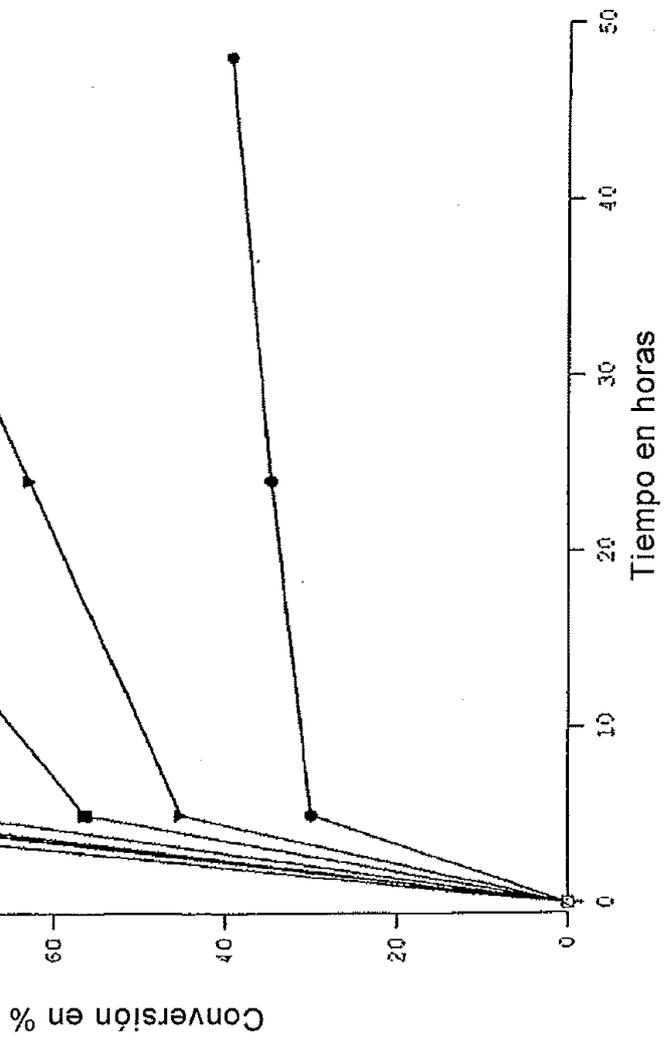


Figura 8

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de tilapia

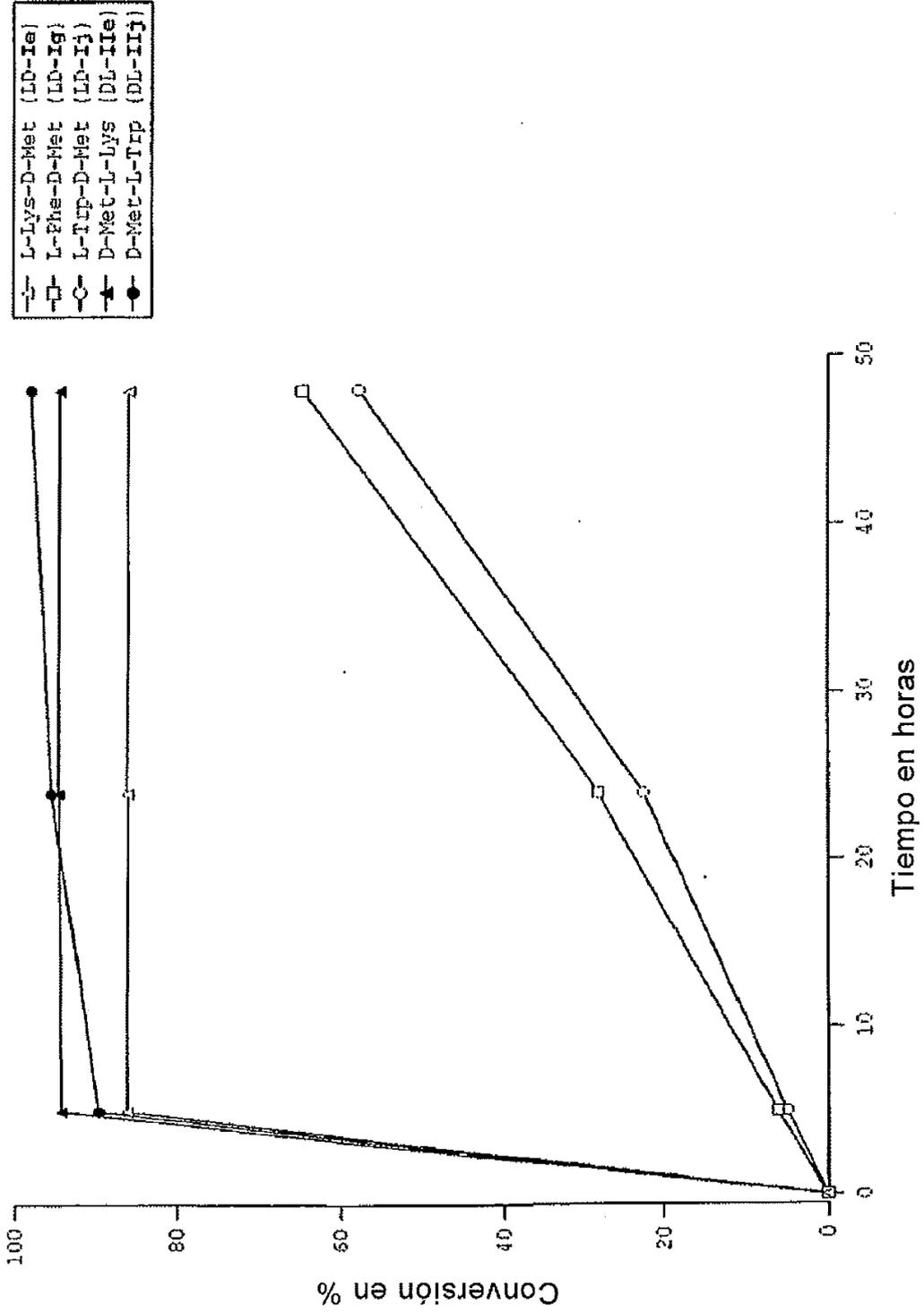


Figura 9

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas del camarón blanco

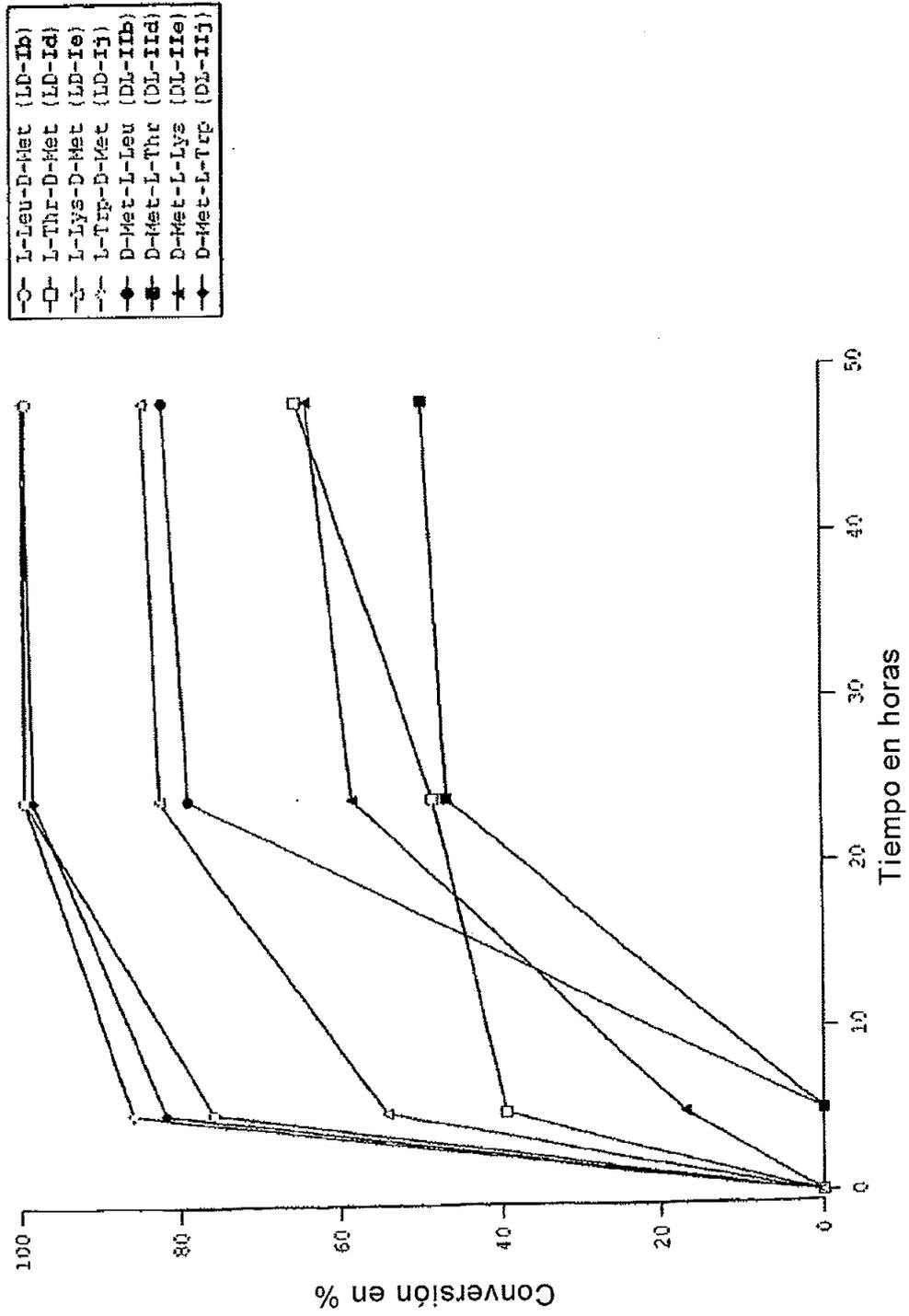


Figura 10

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de trucha arco iris

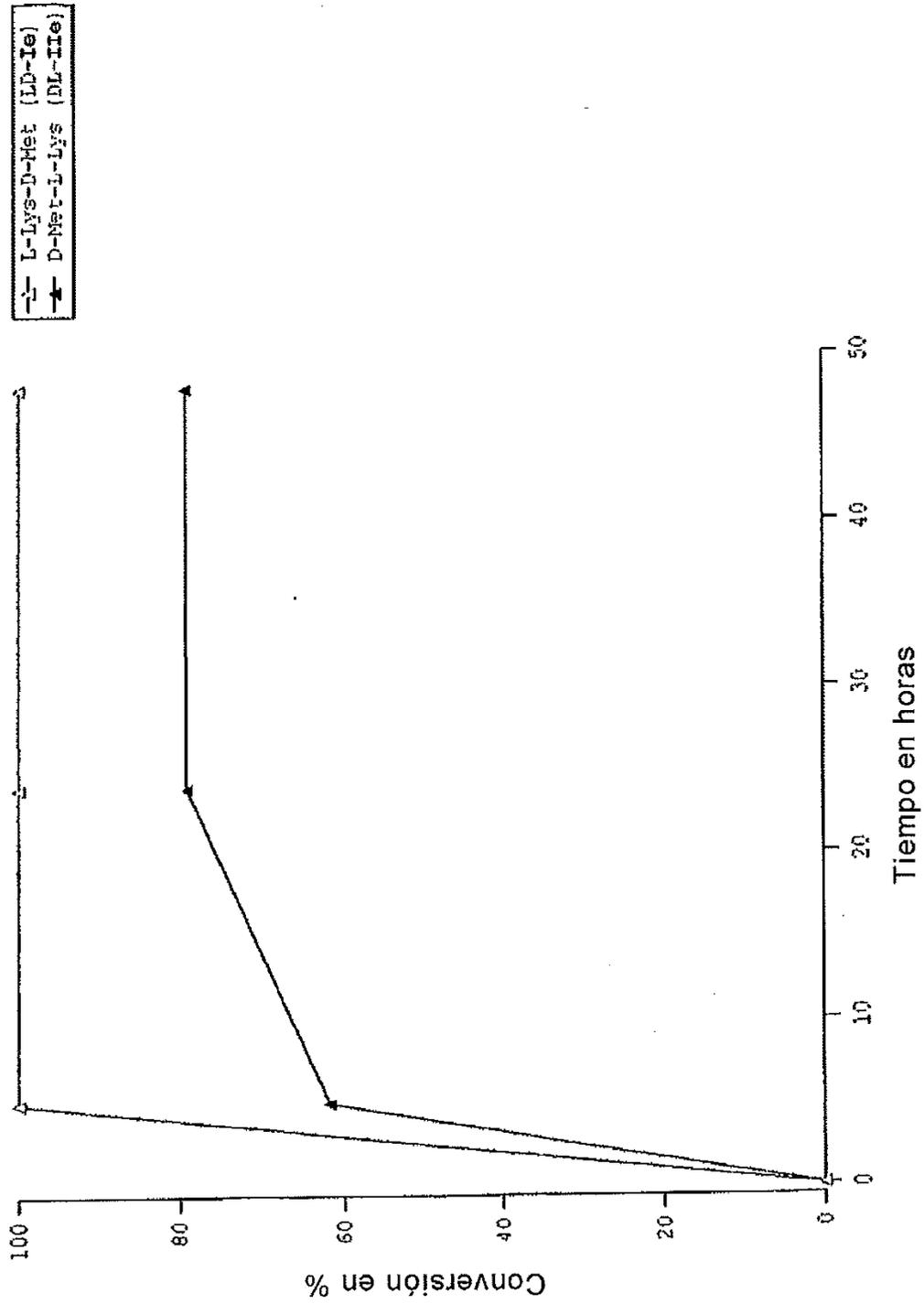


Figura 11

Disociación de mezclas a base de L-Trp-D-Met/L-Met-L-Trp (LD-lj/LL-lj) y L-Trp-D-Met/D-Met-L-Trp (LD-lj/DL-lj) con enzimas de carpa común

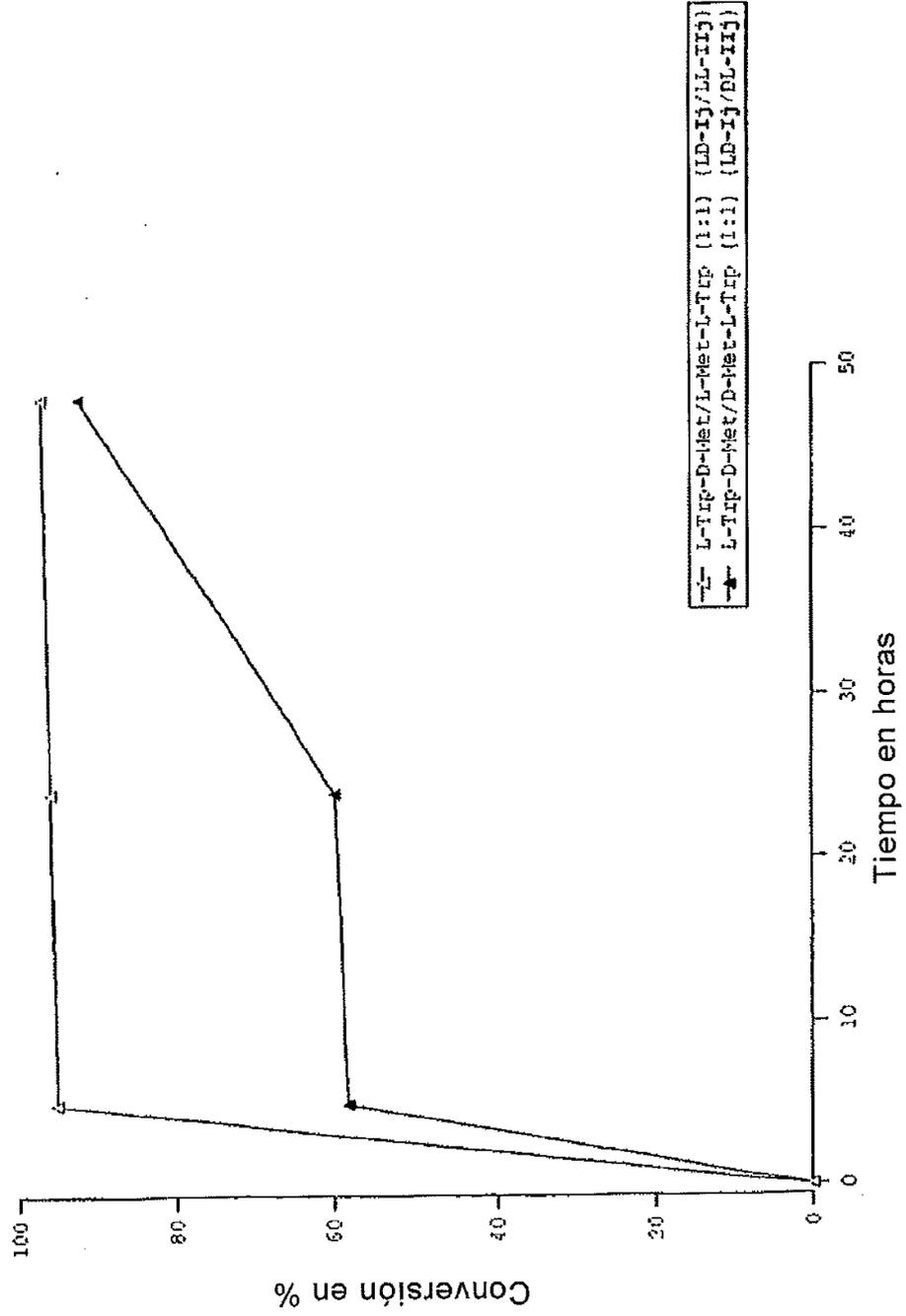


Figura 12

Disociación in vitro de los dipéptidos naturales L-Ile-L-Met (LL-Ic) o bien L-Met-L-Ile (LL-IIc) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Ile-D-Met (LD-Ic) o bien D-Met-L-Ile (DL-IIc) con disolución enzimática al 10% de carpa común

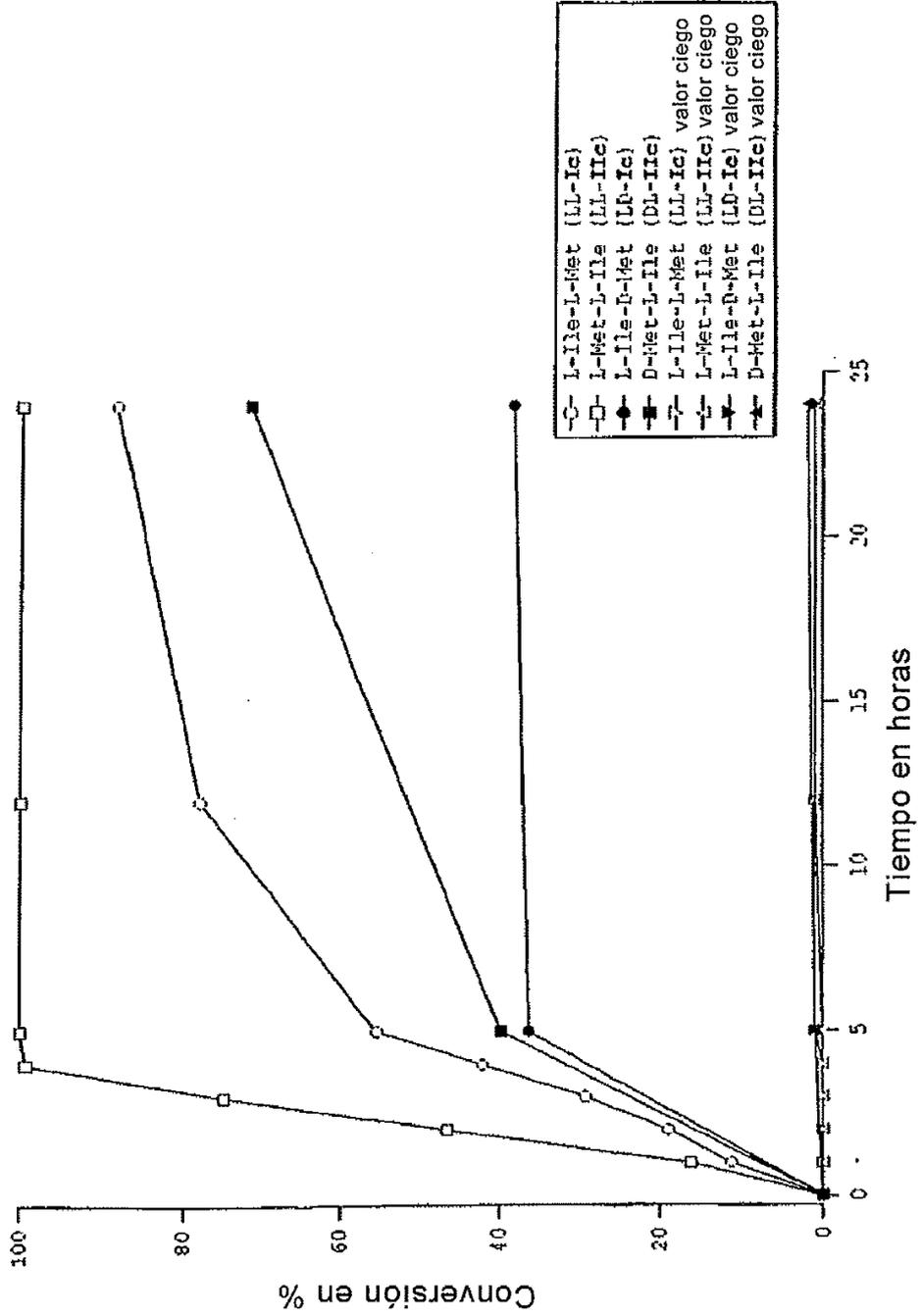


Figura 13

Disociación *in vitro* de los dipéptidos naturales L-Thr-L-Met (LL-Id) o bien L-Met-L-Thr (LL-Id) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Thr-D-Met (LD-Id) o bien D-Met-L-Thr (DL-Id) con disolución enzimática al 10% de carpas comunes

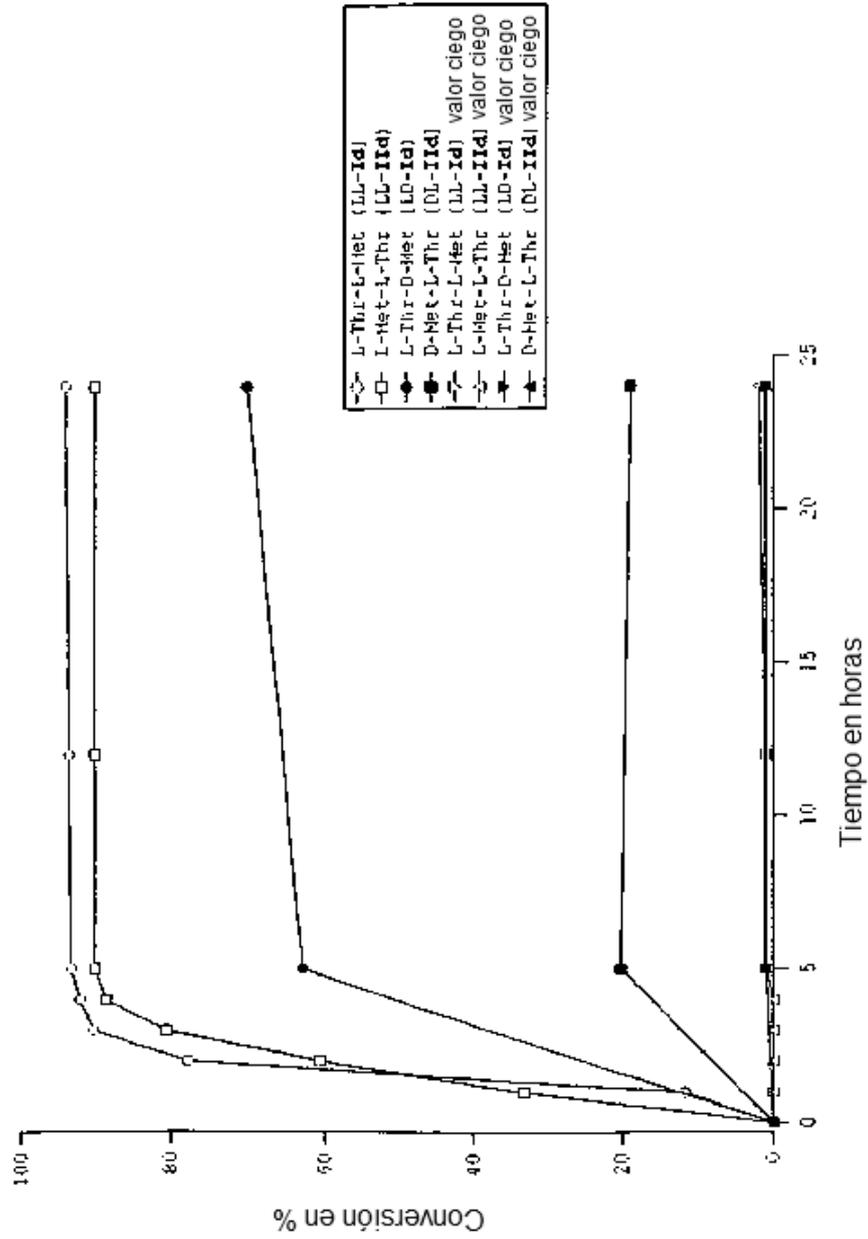


Figura 14

Disociación *in vitro* de los dipéptidos naturales L-Lys-L-Met (LL-le) o bien L-Met-L-Lys (LL-ll) con disolución enzimática al 1% y de los dipéptidos no naturales L-Lys-D-Met (LD-le) o bien D-Met-L-Lys (DL-ll) con disolución enzimática al 10% de carpas comunes

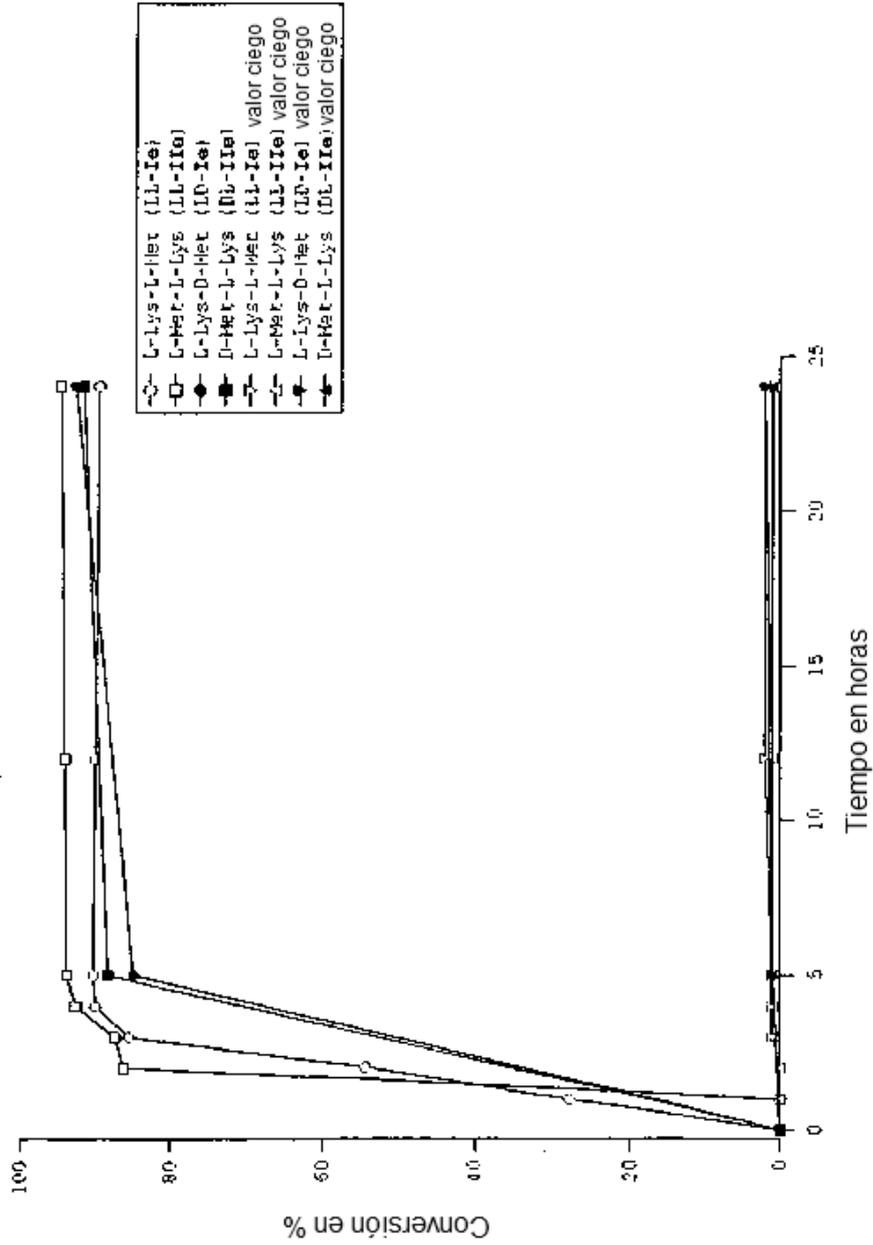


Figura 15

Disociación de dipéptidos L-Met-L-EAA (LL-II) con enzimas de gallina

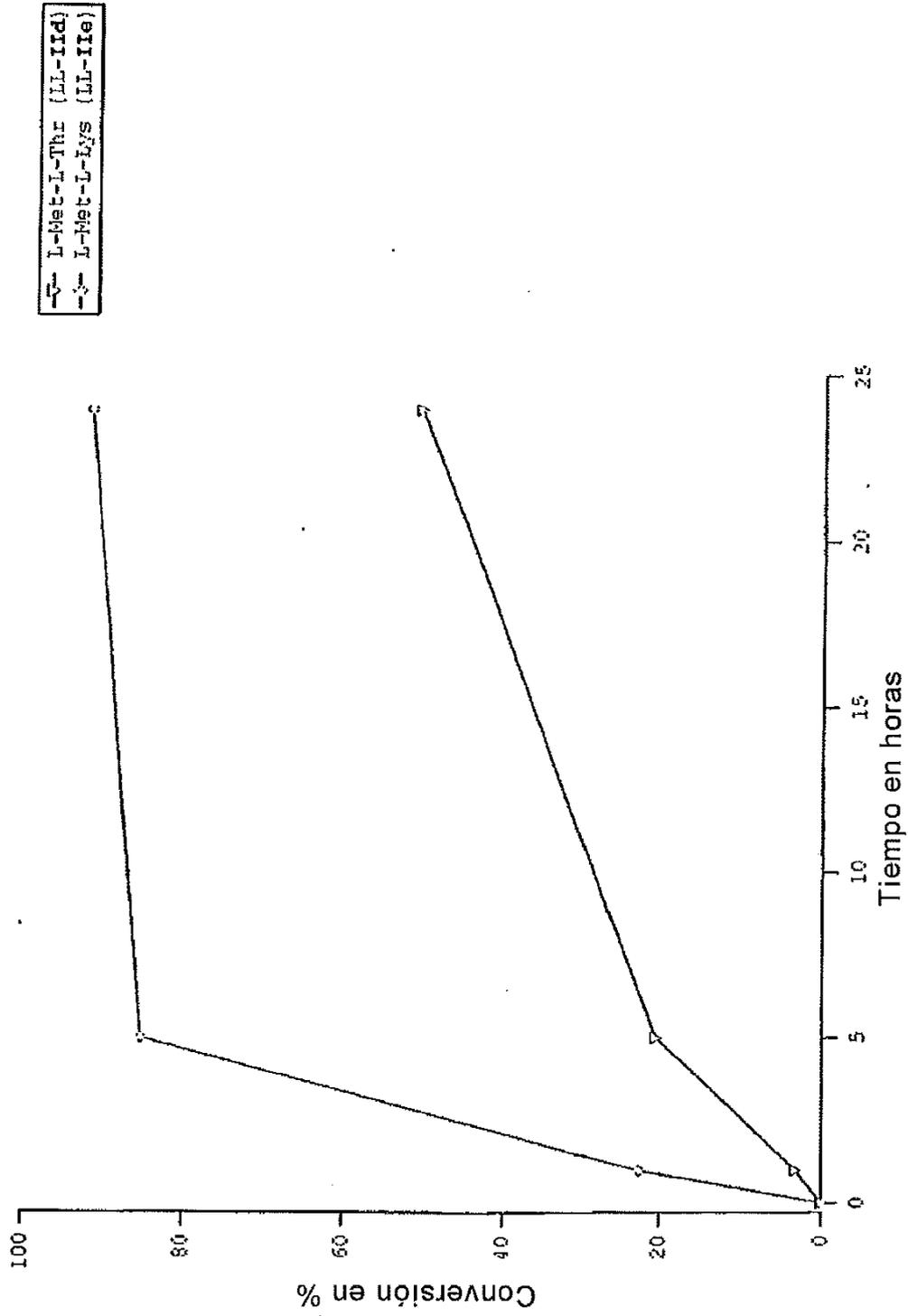


Figura 16

Disociación de dipéptidos L-EAA-D-Met (LD-I) y D-Met-L-EAA (DL-II) con enzimas de gallina

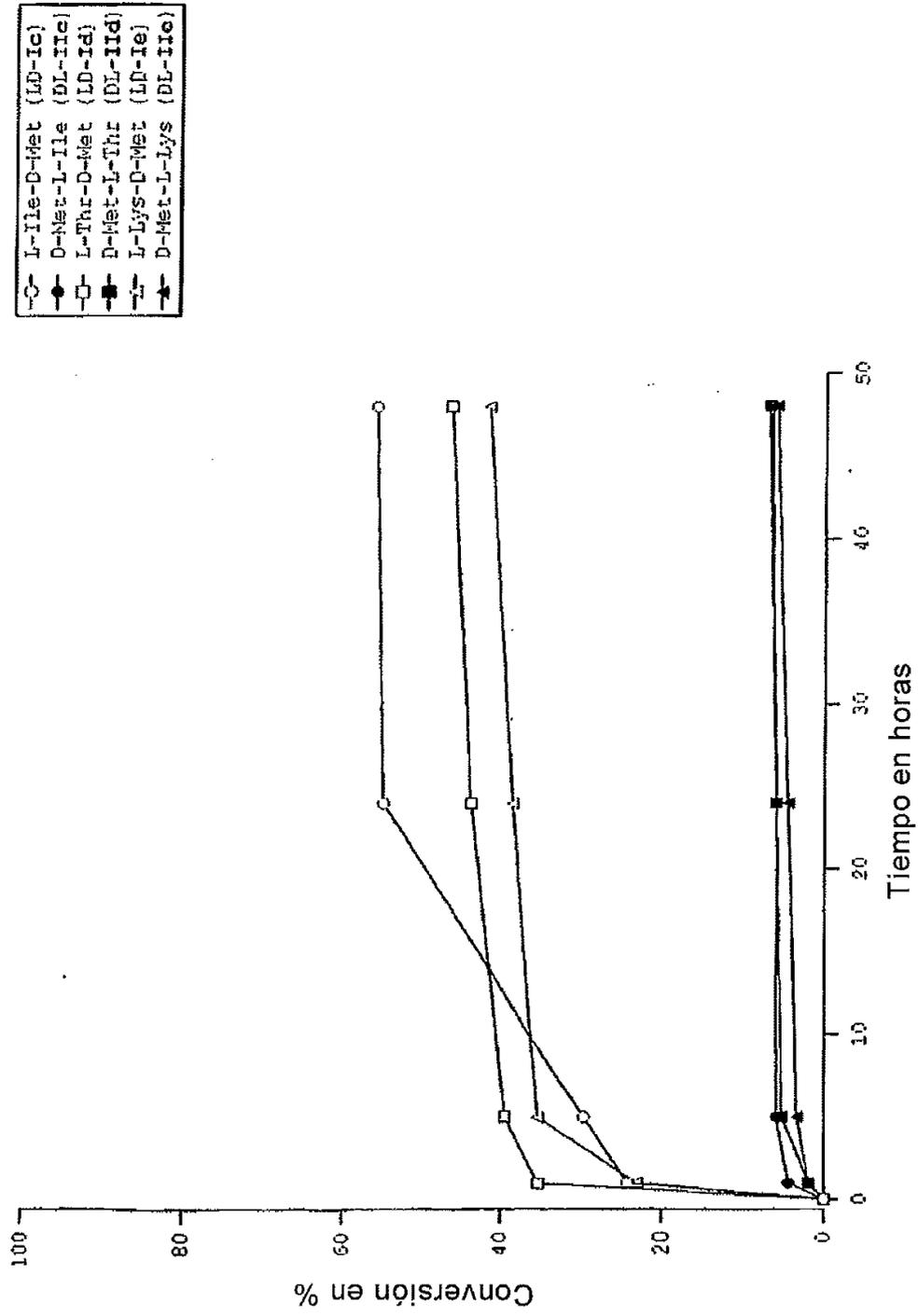


Figura 17