

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 279**

51 Int. Cl.:

**C07D 233/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10761023 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2486019**

54 Título: **Procedimiento de síntesis de la 2-tiohistidina y análogos**

30 Prioridad:

**06.10.2009 FR 0956968**

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

**09.07.2015**

73 Titular/es:

**TETRAHEDRON (100.0%)  
4 bis, allée Charles V  
94300 Vincennes, FR**

72 Inventor/es:

**ERDELMEIER, IRÈNE y  
DAUNAY, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 540 279 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).

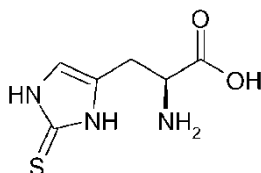
## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de síntesis de la 2-tiohistidina y análogos.

5 La presente solicitud de patente se refiere a un nuevo procedimiento de síntesis de la 2-tiohistidina y de derivados relacionados.

La L-2-tiohistidina, también denominada L-2-mercaptohistidina o ácido  $\alpha$ -amino-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol-4-propanoico, responde a la fórmula I-1 siguiente:

10



(I-1).

15 Este aminoácido se obtuvo por hidrólisis ácida de proteínas de cobre, tales como la hemocianina de molusco o la tirosina de hongo. La L-2-tiohistidina es un buen quelante de iones metálicos divalentes tales como  $Zn^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ . Se utiliza en particular en cosmetología, como agente despigmentante o también como desodorante, y también como agente antioxidante para una utilización farmacéutica, cosmética o también alimenticia. A la vista del interés de este compuesto, se han descrito en la bibliografía varias síntesis de la 2-tiohistidina o de sus derivados.

20 Así, una primera síntesis describe la transformación del éster metílico de la L-histidina en derivado di-ter-butoxicarboxilado (di-Boc). Este último se trata después con clorotioformiato de fenilo que, después del tratamiento, lleva a una mezcla de ésteres metílicos de mono- y de di-Boc-2-tiohistidina. Después de la desprotección, la L-2-tiohistidina se obtiene con un rendimiento global del 70% (J. Xu, J. C. Yadan, J. Org. Chem. 60, 6296 - 6301 (1995)).

25 Sin embargo, tal síntesis necesita la protección del grupo amino de la histidina, que puede estar presente en forma libre. Además, el clorotioformiato de fenilo debe ser preparado a partir del tiofosgeno ( $CSCl_2$ ), reactivo tóxico y difícilmente disponible en gran cantidad para una utilización a escala industrial.

30 Las solicitudes internacionales WO 95/18 108 y WO 95/00 494 describen la síntesis de la  $N\alpha,N\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina o de su éster a partir del éster metílico de la  $N\alpha,N\alpha$ -dimetil-histidina por reacción con clorotioformiato de fenilo, después eventualmente hidrólisis.

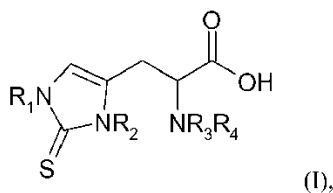
35 La solicitud de patente US 2009/093 642 describe asimismo una síntesis de la 2-tiohistidina (según un método descrito por Heath, H. *et al.* J. Chem. Soc., 1951, 2215) a partir de la histidina por apertura del ciclo imidazol, y después por reacción con un tiocianato tal como KSCN. Además, la utilización de grandes volúmenes de ácido clorhídrico, el KSN, utilizado en medio ácido es un reactivo altamente tóxico.

40 Shosuke Ito ha descrito asimismo una síntesis de la 2-tiohistidina a partir de la histidina en 1985 (J. Org. Chem. 1985, 50, 3636-3638). Así, la histidina se pone a reaccionar con dibromo para dar, aparentemente por medio de una bromolactona, un tioéter de la 2-tiohistidina después de la reacción con cisteína. Una hidrólisis reductora en presencia de ácido yodhídrico HI y de fósforo rojo P da entonces la 2-tiohistidina esperada y (D,L)-alanina. La 2-tiohistidina puede también ser obtenida directamente a partir del intermediario bromolactónico por reacción con  $Na_2S$ .

45 Sin embargo, el procedimiento de Ito plantea, a nivel industrial, unos problemas de purificación ya que se necesitan dos cromatografías sobre columna para obtener el tioéter intermedio, así como para obtener el producto final, siendo la 2-tiohistidina final obtenida sólo con un rendimiento global del 12%. Además, la utilización de fósforo rojo no es recomendada para una utilización a nivel industrial, debido a su gran inflamabilidad. Además, se forma hidrógeno durante esta reacción entre el ácido yodhídrico HI y el fósforo rojo P (J. Organomet. Chem. 529, 295-299 (1997)) y que es también muy peligroso a escala industrial.

50 Así, existe una necesidad real de desarrollar un nuevo procedimiento de síntesis de la 2-tiohistidina y de sus derivados que sea aplicable a nivel industrial, es decir que no presente dificultades de purificación, que no utilice productos o disolventes peligrosos y tóxicos para el ser humano y el medioambiente, y que permita acceder al producto, a escala industrial, con un buen rendimiento y un bajo coste.

55 La presente invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de síntesis de un derivado de 2-tiohistidina de fórmula (I) siguiente:

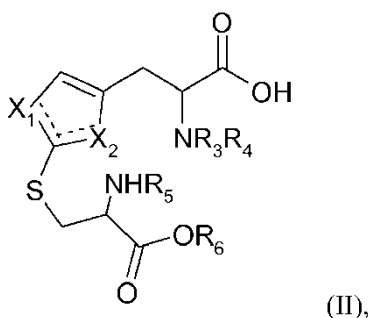


o de una sal fisiológicamente aceptable de éste, de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y en particular de una mezcla racémica de éste, para la cual:

- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tal como metilo, representando por lo menos uno de los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> un átomo de hidrógeno y representando ventajosamente cada uno un átomo de hidrógeno, y
- R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tal como metilo,

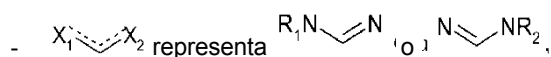
que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- (i) reacción de escisión de un compuesto de fórmula (II) siguiente:



o de una sal fisiológicamente aceptable de éste, de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y en particular de una mezcla racémica de éste,

para la cual:



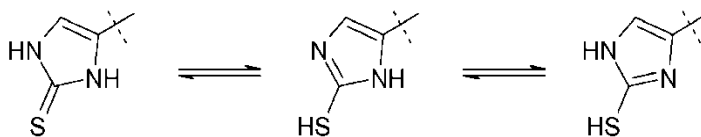
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son tal como se han definido anteriormente,
- R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -CO-(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)), y en particular un átomo de hidrógeno o un grupo -COCH<sub>3</sub>, y más particularmente un átomo de hidrógeno, y
- R<sub>6</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y en particular un átomo de hidrógeno,

en presencia de un tiol, preferentemente soluble en el disolvente de reacción que podrá ser en particular agua, a una temperatura superior o igual a 60°C, para dar un compuesto de fórmula (I), y

- (ii) separación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (i) anterior del medio de reacción.

Por "tautómero", se entiende, en el sentido de la presente invención, un isómero de constitución del compuesto obtenido por prototropía, es decir por migración de un átomo de hidrógeno y cambio de localización de un doble enlace. Los diferentes tautómeros de un compuesto son generalmente interconvertibles y están presentes en equilibrio en la solución, en proporciones que pueden variar según el disolvente utilizado, la temperatura o también el pH.

En el marco de los compuestos de la invención, el ciclo 2-tioimidazol puede estar presente en las diferentes formas tautoméricas siguientes:



En la presente invención, se entiende designar por "fisiológicamente aceptable" lo que es generalmente seguro, no tóxico ni biológicamente ni de otra manera no deseable y que es aceptable para una utilización farmacéutica, cosmética o alimenticia (humana o animal).

Se entiende designar por "sales fisiológicamente aceptables" de un compuesto, unas sales que son fisiológicamente aceptables, como se han definido anteriormente, y que poseen la actividad (farmacológica, cosmética o alimenticia) deseada del compuesto original. Dichas sales comprenden:

(1) los hidratos y los solvatos,

(2) las sales de adición de ácido formadas con unos ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el ácido fosfórico y similares; o formados con unos ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido bencenosulfónico, el ácido benzoico, el ácido alcanforsulfónico, el ácido cítrico, el ácido etanosulfónico, el ácido fumárico, el ácido glucoheptónico, el ácido glucónico, el ácido glutámico, el ácido glicólico, el ácido hidroxinaftoico, el ácido 2-hidroxietanosulfónico, el ácido láctico, el ácido maleico, el ácido málico, el ácido mandélico, el ácido metanosulfónico, el ácido mucónico, el ácido 2-naftalenosulfónico, el ácido propiónico, el ácido salicílico, el ácido succínico, el ácido dibenzoil-L-tárrico, el ácido tárrico, el ácido p-toluenosulfónico, el ácido trimetilacético, el ácido trifluoroacético y similares, o

(3) las sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original está o bien sustituido por un ion metálico, por ejemplo un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio; o bien coordinado con una base orgánica o inorgánica. Las bases orgánicas aceptables comprenden la dietanolamina, la etanolamina, la N-metilglucamina, la trietanolamina, la trometamina y similares. Las bases inorgánicas aceptables comprenden el hidróxido de aluminio, el hidróxido de calcio, el hidróxido de potasio, el carbonato de sodio y el hidróxido de sodio.

Por "estereoisómeros" se entienden, en el sentido de la presente invención unos diaestereoisómeros y unos enantiómeros. Se trata por lo tanto de isómeros ópticos. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares el uno del otro son designados como "diaestereoisómeros" y los estereoisómeros que son imágenes especulares el uno del otro, pero no superponibles, son designados por "enantiómeros".

Una mezcla que contiene unas cantidades iguales de dos formas enantioméricas individuales de quiralidad opuesta se denomina por "mezcla racémica".

Por grupo "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)", se entiende, en el sentido de la presente invención, una cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que comprende de 1 a 4 átomos de carbono. Podrá tratarse de grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, o terc-butilo. En particular se tratará del grupo metilo.

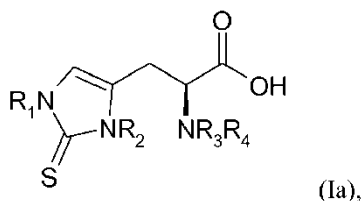
Por "tiol" se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier reactivo que contiene un grupo SH en su estructura molecular. Se tratará más particularmente de un compuesto de fórmula R-SH, con R representando una cadena hidrocarbonada saturada de C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, en particular de C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>, lineal o ramificada, sustituida por uno o varios sustituyentes polares.

Por "cadena hidrocarbonada saturada" se entiende, en el sentido de la presente invención, una cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que comprende ventajosamente de 1 a 8 átomos de carbono. Podrá tratarse más particularmente de una cadena saturada, lineal, tal como un grupo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o también hexilo.

Por sustituyentes polares, se entiende, en el sentido de la presente invención, unos grupos hidrófilos tales como los grupos OH, SH, NH<sub>2</sub> y COOH.

Por "reacción de escisión" se entiende, en el sentido de la presente invención, que el compuesto introducido en esta reacción está escindido en dos partes durante esta reacción para permitir formar la función tiocarbonilo del compuesto de fórmula (I).

El compuesto de fórmula (I) podrá ser en particular un compuesto de fórmula (Ia) siguiente:



o una sal fisiológicamente aceptable, un tautómero, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y en particular una mezcla racémica de éste,

5

para la cual  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se han definido anteriormente.

El compuesto de fórmula (I) podrá ser en particular la 2-tiohistidina (en particular en forma D, L o una mezcla racémica D, L), la  $\alpha$ -metil-2-tiohistidina y la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina, y será en particular la 2-tiohistidina y en particular la L-2-tiohistidina.

10

#### Etapa (i):

Esta reacción de escisión realizada en presencia de un tior permite obtener el compuesto de fórmula (I) así como el ácido pirúvico ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{-CO}_2\text{H}$ ) o uno de sus derivados, en particular un éster ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{-CO}_2\text{R}_6$ ) o un derivado obtenido por reacción con el tior, tal como un derivado tiocetálico (pudiendo dos moléculas de tior reaccionar con la función cetona del ácido pirúvico).

15

Por el contrario, la reacción de Ito corresponde a una hidrólisis reductora que da la 2-tiohistidina y la (D,L)-alanina y no el ácido pirúvico. Este resultado se podría explicar por el hecho de que la reacción de escisión se efectúa en presencia de HI y de fósforo rojo que genera *in situ* el hidrógeno (J. Organomet. Chem. 529, 295-299 (1997)).

20

La obtención del ácido pirúvico o de uno de sus derivados en lugar de la (D,L)-alanina (como la obtenida en el procedimiento de Ito, J. Org. Chem. 1985, 50, 3636-3638) durante esta reacción de escisión presenta la ventaja de facilitar la purificación ulterior del compuesto de fórmula (I) ya que el ácido pirúvico (o sus derivados) es soluble en disolventes orgánicos mientras que la (D,L)-alanina es soluble en agua, así como lo son los compuestos de fórmula (I). Además, la formación de hidrógeno durante esta reacción está fuertemente desaconsejada a escala industrial debido a su carácter explosivo.

25

Por otra parte, el tior deberá ser preferentemente soluble en el disolvente de reacción que podrá ser en particular agua, lo cual presenta la ventaja suplementaria de ser más ecológico.

30

El tior utilizado en esta etapa (i) podrá ser más particularmente un tior que responde a la fórmula R-SH, representando R una cadena alquilo, lineal o ramificada, y preferentemente lineal, que comprende de 1 a 8, en particular de 2 a 6, particularmente de 2 a 4, átomos de carbono, sustituida por uno o más grupos seleccionados de entre OH, SH,  $\text{NH}_2$  y COOH

35

La presencia de grupos hidrófilos (OH, SH,  $\text{NH}_2$  y COOH) podrá permitir en particular hacer el tior más soluble en agua, cuando el agua se utiliza como disolvente.

40

El tior se podrá elegir de entre la cisteína, el ditiotreitolo, el 2-mercaptoetanol, el ácido 2-mercaptopropiónico, el ácido 3-mercaptopropiónico y el ácido tioglicólico, y preferentemente será el ácido 3-mercaptopropiónico.

45

Podrá también tratarse del ácido mercaptoacético y el ácido mercaptohexanoico.

Ventajosamente, se utilizarán por lo menos 2 equivalentes molares de tior con respecto al compuesto (II), es decir que se utilizan por lo menos 2 moles de tior para un mol de compuesto (II) utilizado. Se podrá utilizar particularmente por lo menos 5 equivalentes molares de tior, y en particular 5 a 10 equivalentes molares de tior, con respecto al compuesto (II).

50

La mezcla de reacción se calienta a una temperatura superior a  $60^\circ\text{C}$  ya que por debajo de esta temperatura, la cinética de la reacción sería demasiado lenta. La reacción se podrá realizar a una temperatura comprendida entre  $60$  y  $120^\circ\text{C}$ , en particular entre  $80$  y  $100^\circ\text{C}$ , más particularmente después de la adición del tior.

55

La reacción se podrá realizar en particular en medio ácido.

#### Etapa (ii):

El producto final obtenido (compuesto de fórmula (I)) se podrá separar del medio de reacción mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia y aplicables a escala industrial, en particular por precipitación del compuesto

60

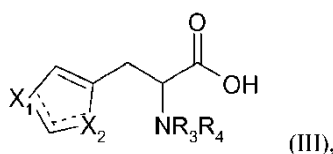
de fórmula (I) en particular ajustando el pH de la solución para llegar, por ejemplo, a un pH comprendido entre 5,5 y 6,5, preferentemente de aproximadamente 6 (más particularmente, en el caso de la 2-tiohistidina) o por evaporación, eventualmente parcial, de los disolventes seguida preferentemente de una recristalización para purificar el producto.

5 Los compuestos de fórmula (I) son solubles en agua, por lo tanto una o más extracciones previas con un disolvente orgánico, tal como el acetato de etilo o el éter ter-butil-metilico, podrán permitir eliminar los sub-productos orgánicos formados durante la reacción, tal como el ácido pirúvico o sus derivados, así como el exceso de tiol.

10 El producto obtenido podrá ser purificado, si es necesario, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, por ejemplo por recristalización.

Antes o después de esta etapa (ii), se podrá preparar una sal del compuesto formado, si se desea, en particular por adición de un ácido o de una base fisiológicamente aceptable, tal como se ha definido anteriormente.

15 El compuesto de fórmula (II) se podrá preparar a partir de una sal de adición de ácido, con la excepción de una sal del ácido yodhídrico (HI), del compuesto de fórmula (III) siguiente:

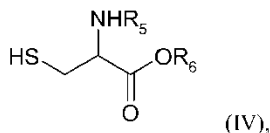


20 o de un tautómero o de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste,

para la cual  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se han definido anteriormente,

25 por reacción sucesivamente con dibromo,

y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV) siguiente:



30 o un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste, en la que  $R_5$  y  $R_6$  son tales como se han definido anteriormente.

35 Por "sal de adición de ácido del compuesto de fórmula (III)", se entiende, en el sentido de la presente invención, una sal del compuesto de fórmula (III) obtenida por adición de un ácido, con la exclusión del ácido yodhídrico HI. El ácido podrá ser en particular el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico.

40 En esta reacción, el dibromo podrá ser utilizado a razón de 1 a 1,5 equivalentes molares con respecto al compuesto de fórmula (III).

Preferentemente, el dibromo se añade en frío (adición muy rápida preferentemente), a una temperatura inferior a 10°C, preferentemente inferior a 5°C. La adición del dibromo podrá por lo tanto ser realizada a una temperatura comprendida entre -10°C y 10°C, ventajosamente comprendida entre -5°C y 5°C.

45 El derivado de cisteína podrá ser en particular la N-acetilcisteína o la cisteína (en particular en forma D, L o racémica), y particularmente la cisteína y en particular la L-cisteína.

50 El derivado de cisteína se utilizará ventajosamente en exceso, en particular a razón de 2 a 7, ventajosamente de 3 a 5 equivalentes molares de derivado de cisteína con respecto al compuesto de fórmula (III), es decir que se utilizan de 2 a 7, ventajosamente 3 a 5 moles de derivado de cisteína para un mol de compuesto (III) utilizado.

Esta reacción podrá ser realizada en un disolvente tal como el agua.

55 El rendimiento de esta etapa podrá ser superior o igual al 50%, incluso superior o igual al 70%.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) no estará aislado del medio de reacción sino que se introducirá

directamente en la etapa (i) siguiente. Así, la preparación del compuesto (I) a partir del compuesto (III) se puede realizar en un solo reactor, sin aislamiento del compuesto (II) intermedio (reacción "one-pot").

El procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según la invención podrá, por lo tanto, comprender las etapas sucesivas siguientes:

(a1) reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal del ácido yodhídrico, de un compuesto de fórmula (III) tal como se ha definido anteriormente, o de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste, con dibromo,

y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV), tal como se ha definido anteriormente, o un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste, y particularmente con cisteína, y en particular L-cisteína,

para dar un compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido anteriormente,

(b1) reacción de escisión del compuesto de fórmula (II) obtenido en la etapa (a1) anterior en presencia de un tiol, tal como se ha definido anteriormente, preferentemente soluble en el disolvente de reacción, que podrá ser en particular agua, a una temperatura superior o igual a 60°C, para dar un compuesto de fórmula (I), y

(c1) separación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (b1) anterior del medio de reacción.

Las etapas (b1) y (c1) corresponden respectivamente a las etapas (i) y (ii) anteriores. La etapa (a1), por su parte, corresponde a la etapa de preparación del compuesto de fórmula (II) descrita anteriormente.

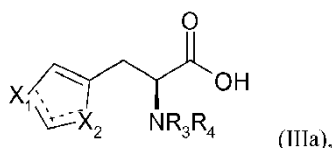
Ventajosamente, las etapas (a1) y (b1) se realizarán en un mismo disolvente, tal como agua, preferentemente, en un mismo reactor, es decir sin aislamiento de los productos intermedios (compuesto de fórmula (II) en particular).

En estas condiciones, el medio de reacción podrá contener un derivado de cisteína utilizado preferentemente en exceso en la etapa (a1). Antes de separar el compuesto de fórmula (I) del medio de reacción (etapa (c1)), podrá ser por lo tanto necesario eliminar el exceso de derivado de cisteína con el fin de facilitar el aislamiento y la purificación del compuesto de fórmula (I). Particularmente, en el caso de un derivado de cisteína para el cual  $R_5 = H$  o alquilo ( $C_1-C_4$ ) tal como la cisteína, se puede añadir, por ejemplo, benzaldehído, que formará entonces con el derivado de cisteína en exceso un derivado del ácido 2-feniltiazolidin-4-carboxílico, compuesto que precipita en un disolvente tal como el agua. Por este medio, el derivado de cisteína en exceso podría ser reciclado.

El rendimiento global de preparación del compuesto de fórmula (I) a partir del compuesto de fórmula (III) podrá ser superior o igual al 40%.

Según un modo de realización particular de la invención, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ia) y su procedimiento de preparación comprende las etapas sucesivas siguientes:

(a2) reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal del ácido yodhídrico, de un compuesto de fórmula (IIIa) siguiente:

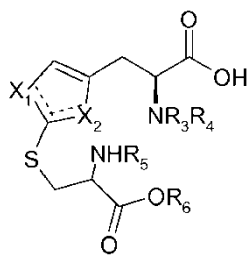


o de un tautómero o de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste,

para la cual  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se han definido anteriormente, con dibromo,

y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV), tal como se ha definido anteriormente, o un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste, y particularmente con cisteína y en particular L-cisteína,

para dar un compuesto de fórmula (IIa) siguiente:



(IIa),

o una sal fisiológicamente aceptable, un tautómero o de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste,

para la cual  $X_1$  y  $X_2$ , R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son tal como se han definido anteriormente,

(b2) reacción de escisión del compuesto de fórmula (IIa) obtenido en la etapa (a2) anterior en presencia de un tiol tal como se ha definido anteriormente, preferentemente soluble en el disolvente de reacción que podrá ser el agua, y en particular con cisteína, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, ácido 2-mercaptopropiónico, ácido 3-mercaptopropiónico o ácido tioglicólico, y preferentemente con el ácido 3-mercaptopropiónico, a una temperatura superior o igual a 60°C,

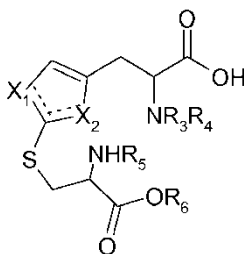
para dar un compuesto de fórmula (Ia), y

(c2) separación del compuesto de fórmula (Ia) obtenido en la etapa (b2) anterior del medio de reacción.

Las etapas (a2), (b2) y (c2) corresponden respectivamente a las etapas (a1), (b1) y (c1) anteriores.

Los compuestos de fórmula (IIa) representan unas formas particulares del compuesto de fórmula (II). Asimismo, los compuestos de fórmula (IIIa) representan unas formas particulares del compuesto de fórmula (III).

Se describe también un compuesto de fórmula (II) siguiente:



(II),

o una sal fisiológicamente aceptable, un tautómero, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de este, para la cual:

- $X_1$  y  $X_2$  representa  $R_1N=N$  o  $N=NR_2$ , y
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son tal como se han definido anteriormente,

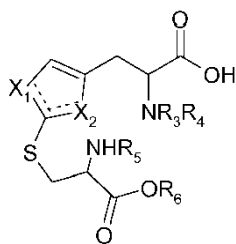
con la exclusión del compuesto para el cual  $X_1$  y  $X_2$  representa  $HN=N$  o  $N=NH$ , y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan cada uno un átomo de hidrógeno.

El compuesto excluido se describe en: Ito *et al.* J. Org. Chem. 1985, 50, 3636-3638.

Este compuesto podrá ser en particular el 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N,N-dimetiletanaminio (HisNMe<sub>2</sub>-Cys) o su diclorhidrato, y el 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N-metiletanaminio (HisNHMe-Cys) o su diclorhidrato.

Se describe también un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (II) siguiente:





(II).

o una sal fisiológicamente aceptable, un tautómero, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste, para la cual:

- $X_1$  y  $X_2$  representa  $R_1N=NR_2$  o  $N=NR_2$ , y
- $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  y  $R_6$  son tales como se han definido anteriormente,

Por reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal del ácido yodhídrico, de un compuesto de fórmula (III), tal como se ha definido anteriormente, o de un tautómero de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste,

con dibromo, y después con 2 a 7, preferentemente de 3 a 5 equivalentes molares, con respecto al compuesto de fórmula (III), de un derivado de cisteína de fórmula (IV), tal como se ha definido anteriormente, y particularmente la cisteína y en particular la L-cisteína.

En esta reacción, el dibromo se podrá utilizar a razón de 1 a 1,5 equivalentes molares con respecto al compuesto de fórmula (III).

Preferentemente, el dibromo se añade en frío (adición muy rápida preferentemente), a una temperatura inferior a 10°C, preferentemente inferior a 5°C. La adición del dibromo se podrá realizar por lo tanto a una temperatura comprendida entre -10°C y 10°C, ventajosamente comprendida entre -5°C y 5°C.

Esta reacción se podrá realizar en un disolvente tal como el agua.

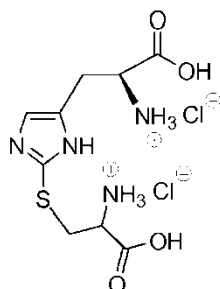
La presente invención se entenderá mejor a la luz de los ejemplos siguientes, que se proporcionan simplemente a título ilustrativo, y no limitan de ninguna manera el alcance de la invención.

### Ejemplos

Todas las reacciones se realizaron al aire libre, salvo que se indique lo contrario.

#### 1-Preparación de los compuestos de fórmula (II)

##### Ejemplo 1: Preparación del diclorhidrato de 2-[2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il]-1-carboxietanaminio (His-Cys, 2HCl)



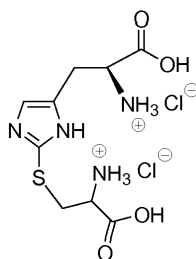
Se disuelven 1,57 g (7,5 mmoles) del clorhidrato monohidratado de la L-histidina en 15 ml de agua, y se enfría la disolución hasta 0°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden 500 µl (1,56 g, 9,75 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo gota a gota (tiempo de adición 2 minutos 10 segundos). La mezcla de reacción se tiñe de amarillo. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 2,81 g (22,5 mmoles, 3 equivalentes) de L-cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 1h, la mezcla se filtra y el precipitado se lava con 2x0,5 ml de agua.

El filtrado se deposita sobre una columna rellena con 75 g de DOWEX<sup>®</sup> 50WX2-400, acondicionada antes con ácido clorhídrico HC1 1N. Después de la elución con 750 ml de ácido clorhídrico HC1 1N, después con 500 ml de ácido clorhídrico HC1 2N, se reúnen las fracciones que contienen el producto deseado. Después de la evaporación y 2 coevaporaciones con 2x20 ml de tolueno, se obtiene después del secado 1,5 g (56%) del producto deseado en forma de cristales amarillos.

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O/DCI, 400 MHz): δ (ppm) = 3,32 (m, 2H); 3,63 (m, 2H); 4,22 (m, 2H); 7,39 (s, 1H).

UPLC-MS (ES+): 275,8 (MH<sup>+</sup>)

**Ejemplo 2: Preparación del diclorohidrato de 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N,N-dimetiletanaminio (HisNMe<sub>2</sub>-Cys, 2HCl)**



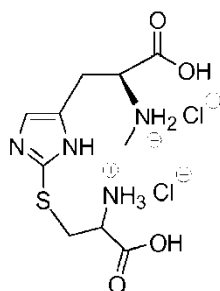
Se disuelven 4,753 g (20 mmoles) de clorhidrato monohidratado de N,N-dimetilhistidina (V. N. Reinhold *et al.*, J. Med. Chem. 11, 258 (1968)) en 40 ml de agua, y la solución se enfría hasta 0°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota rápidamente 1,23 ml (3,835 g, 24 mmoles, 1,2 equivalentes) de dibromo (tiempo de adición 1 minuto 20 segundos) sin superar los 2°C. La mezcla de reacción se tiñe de amarillo, y se forma un sólido rojizo. Siete minutos después del final de la adición del dibromo, todo se ha disuelto el sólido rojo, y se añaden 7,417 g (60 mmoles, 3 equivalentes) de L-cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de la agitación a 0°C durante 1h, se obtiene una suspensión blanca. Se filtra la mezcla, y se lava el precipitado con 2x2 ml de agua.

El filtrado se deposita sobre una columna rellena con 100 g de DOWEX<sup>®</sup> 50WX2-400, acondicionada antes con ácido clorhídrico HC1 1N. Después de la elución con 800 ml de ácido clorhídrico HC1 1N, después con 1000 ml de ácido clorhídrico HC1 2N, las fracciones que contienen el producto deseado se reúnen. Después de la evaporación y 2 coevaporaciones con 2x50 ml de tolueno, se obtiene después del secado 4,84 g (63%) del producto deseado en forma de cristales ligeramente amarillos.

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 2,86 (s, 6H); 3,32 (m, 2H); 3,61 (m, 2H); 4,21 (m, 1H); 4,32 (m, 1H); 7,37 (s, 1H).

UPLC-MS (ES+): 303,8 (MH<sup>+</sup>)

**Ejemplo 3: preparación del diclorohidrato de 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N-metiletanaminio (HisNHMe-Cys, 2HCl)**



Se disuelven 1,187 g (5,656 mmoles) de clorhidrato de α-N-metilhistidina (V. N. Reinhold *et al.*, J. Med. Chem. 11, 258 (1968)) en 11,3 ml de agua desmineralizada. La solución se enfría hasta 0°C y se añaden gota a gota bajo muy fuerte agitación 377 μl (1,175 g, 7,353 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo (tiempo de adición 1 minuto 45 segundos). La mezcla de reacción se tiñe de amarillo, y la temperatura sube hasta 4°C.

Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 2,119 g (16,96 mmoles, 3 equivalentes) de L-Cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 1h, la mezcla se deposita sobre una columna rellena con 50 g de DOWEX<sup>®</sup> 50WX2-400, acondicionada antes con ácido clorhídrico 0,5 N. Después de una elución con 250 ml de ácido clorhídrico 0,5 N, y después 250 ml de ácido clorhídrico 1 N y 500 ml de ácido clorhídrico 1,5 N, se reúnen las fracciones que contienen el producto deseado. Después de la evaporación

y del secado al vacío (20 mbar), se obtienen 1,427 g (68%) del producto deseado en forma de cristales amarillos.

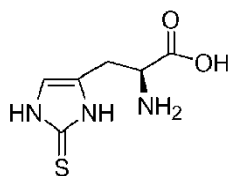
RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 2,71 (s, 3H); 3,33 (m, 2H); 3,62 (m, 2H); 4,08 (m, 1H); 4,28 (m, 1H); 7,40 (s, 1H).

5 UPLC-MS (ES+): 289,8 (MH<sup>+</sup>)

2- Preparación de los compuestos de fórmula (I) según la invención (sin aislamiento de los intermediarios de la fórmula (II))

10 2-1- Preparación de la 2-tiohistidina

**Ejemplo 4: Preparación de la L-2-Tiohistidina a partir de Histidina («one-pot»)**



15 a) Síntesis del intermediario His-Cys (compuesto de fórmula (II))

Se disuelven 317,6 g (1,5 moles) del clorhidrato monohidratado de la L-Histidina en 3 l de agua desmineralizada. La solución se transfiere a un reactor de vidrio de doble capa con agitación mecánica y se enfría hasta -4°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden muy rápidamente 100,2 ml (311,6 g, 1,95 moles, 1,3 equivalentes) de dibromo por medio de una ampolla de bromo, sin superar los 4°C (tiempo de adición 2 minutos 50 segundos). La mezcla de reacción adquiere una coloración amarillo-naranja, pero sigue siendo clara y homogénea. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 562 g (4,5 moles, 3 equivalentes) de L-Cisteína, y la temperatura interna sube hasta 12°C. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de algunos minutos, la solución se vuelve ligeramente amarilla.

Después de una agitación a 0°C durante 1h, un análisis de una muestra por RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto His-Cys está formado con un rendimiento de reacción del 70 %.

El sistema de enfriamiento se detiene, y se deja agitar la mezcla de reacción durante una hora. La temperatura interna sube a 12°C. El aducto His-Cys no es aislado y es introducido directamente en la etapa siguiente.

b) Síntesis de la L-2-Tiohistidina

Después, se añaden 793,4 ml (960 g, 9 moles, 6 equivalentes) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se calienta bajo fuerte agitación a 100°C durante 18h.

Un análisis de una muestra por RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto His-Cys está completamente escindido en L-2-Tiohistidina.

c) Aislamiento de la L-2-Tiohistidina

Después del enfriamiento a temperatura ambiente, la mezcla de un color marrón oscuro se extrae con 4x3 l de acetato de etilo.

La fase acuosa se retiene, y se coloca bajo una fuerte corriente de nitrógeno en un baño a 40°C. El pH de la mezcla se ajusta a 8,5 añadiendo rápidamente una solución de amoníaco acuoso al 20% (aproximadamente 580 ml). Todavía bajo nitrógeno, se añade después gota a gota el ácido clorhídrico concentrado al 37% (aproximadamente 120 ml), hasta un pH de 6,5. Se forma un precipitado incoloro durante la adición del ácido, y se mantiene la suspensión durante una hora a 40°C bajo agitación (bajo nitrógeno).

Después de la filtración y lavado con 3x300 ml de agua desmineralizada, seguido por 2 lavados con 600 ml de etanol absoluto y 3x600 ml de n-pentano, el sólido obtenido se seca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> al vacío (20 mbares). Se obtienen 130,1 g (45%) de la L-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco.

Los datos analíticos del producto obtenido son idénticos a los de la bibliografía (J. Xu, J. C. Yadan, J. Org. Chem. 60, 6296 - 6301 (1995)).

[α]<sub>D</sub>: -11,0 (c = 1,0; 1N HCl)

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O/DCI, 400 MHz): δ (ppm) = 3,10 (m, 2H); 4,20 (m, 1H); 6,77 (s, 1H).

UPLC-MS (ES+): 188,6 (MH+)

5 Los ejemplos 5 a 8 siguientes muestran la variabilidad de la sal de adición de ácido del compuesto de fórmula (III) que puede ser utilizada así como la variabilidad del tiol que puede ser utilizado. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no sirven de ninguna manera para limitar el alcance de la presente invención.

10 **Ejemplo 5: Preparación de la L-2-Tiohistidina a partir de la L-Histidina («one-pot») - variación de la sal de adición de ácido**

Se procede como se describe en el Ejemplo 2, salvo que se utilizan 5 g (32,2 mmoles) de la L-Histidina, disuelta en 65 ml de agua y 900  $\mu$ l (1,66 g, 16,1 mmoles, 1 equivalentes) de ácido sulfúrico al 98%.

15 Se obtienen 2,72 g (45%) de la L-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco. El análisis RMN  $^1$ H (D<sub>2</sub>O/DCI) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

20 **Ejemplo 6: Preparación de la L-2-Tiohistidina a partir de la L-Histidina («one-pot») - variación del tiol (ácido mercaptoacético)**

Se disuelven 3,5 g (16,52 mmoles) del clorhidrato monohidratado de la L-Histidina en 33 ml de agua, y la solución se enfría hasta -3°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota rápidamente 1,1 ml (3,433 g, 21,48 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo (tiempo de adición 3 minutos). La mezcla de reacción se tiñe de amarillo. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 6,19 g (49,58 mmoles, 3 equivalentes) de L-Cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 30 min., se añaden 7,13 ml (9,4 g, 99,17 mmoles) de ácido mercaptoacético, después se calienta agitando a 80°C durante 40h.

30 Para el aislamiento de la L-2-Tiohistidina, se procede como se describe en el Ejemplo 1. Se obtiene el 43% de la L-2-Tiohistidina en forma de polvo de color blanco crema. El análisis RMN  $^1$ H (D<sub>2</sub>O/DCI) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

35 **Ejemplo 7: Preparación de la L-2-Tiohistidina a partir de la L-Histidina («one-pot») - variación del tiol (ácido mercaptohexanoico)**

Se disuelven 257 mg (1,21 mmoles) del clorhidrato monohidratado de la L-Histidina en 2,4 ml de agua, y la solución se enfría hasta -3°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota rápidamente 80  $\mu$ l (252 mg, 1,58 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo. La mezcla de reacción se tiñe de amarillo. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 455 mg (3,64 mmoles, 3 equivalentes) de L-Cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 1h, se añaden 933  $\mu$ l (1,0 g, 6,07 mmoles) de ácido mercaptohexanoico, y después se calienta agitando a 80°C durante 40h.

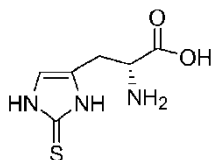
40 Un análisis de una muestra por RMN  $^1$ H (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto His-Cys está completamente escindido en L-2-Tiohistidina.

45 **Ejemplo 8: Preparación de la L-2-Tiohistidina a partir de la L-Histidina («one-pot») - variación del tiol (ditiotreitolo)**

Se disuelven 10,72 g (50,62 mmoles) del clorhidrato monohidratado de la L-Histidina en 100 ml de agua, y la solución se enfría hasta -0°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota rápidamente 3,38 ml (10,51 g, 65,81 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo (tiempo de adición 3 minutos 20 segundos), sin superar 1°C. La mezcla de reacción se tiñe de amarillo. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 18,96 g (151,8 mmoles, 3 equivalentes) de L-Cisteína. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 1h, se añaden 47,08 g (303,7 mmoles, 6 equivalentes) de Dithiothreitol, y después se calienta agitando a 80°C durante 40h.

55 Para el aislamiento de la L-2-Thiohistidina, se procede como se describe en el Ejemplo 1. Se obtiene el 41% de la L-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco. El análisis RMN  $^1$ H (D<sub>2</sub>O/DCI) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

**Ejemplo 9: Preparación de la D-2-Tiohistidina a partir de la D-Histidina («one-pot»)**



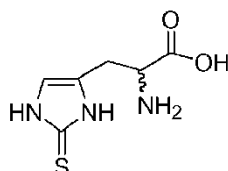
60

Se procede como se describe en el Ejemplo 2-1, salvo que se utilizan 10,32 g (65,84 mmoles) de la D-Histidina, disuelta en 132 ml de agua y 5,5 ml (6,48 g, 65,84 mmoles) de ácido clorhídrico concentrado.

Se obtienen 4,4 g (35%) de la D-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco. El análisis RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ ) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

$[\alpha]_{\text{D}}$ : + 10,5 (c = 1,0; 1N HCl)

#### Ejemplo 10: Preparación de la D,L-2-Tiohistidina a partir de la D,L-Histidina («one-pot»)



##### a) Síntesis del aducto His-Cys

Se disuelven 10,65 g (50,8 mmoles) del clorhidrato monohidratado de la D,L-Histidina en 100 ml de agua desmineralizada. La solución se enfría hasta  $-3^\circ\text{C}$ . Bajo agitación muy fuerte, se añaden muy rápidamente 3,43 ml (10,66 g, 66 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo por medio de una ampolla de bromo, sin superar  $1^\circ\text{C}$  (tiempo de adición 2 minutos 40 segundos). La mezcla de reacción adquiere una coloración amarillo-naranja, pero sigue siendo clara y homogénea. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 19,03 g (152,4 moles, 3 equivalentes) de L-Cisteína, y la temperatura interna sube hasta  $4^\circ\text{C}$ . Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de algunos minutos, la solución se vuelve ligeramente amarilla.

Después de una agitación a  $0^\circ\text{C}$  durante 1h, un análisis de una muestra por RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) muestra que el aducto His-Cys está formado con un rendimiento de reacción del 72%.

El baño de enfriamiento se retira, y se deja agitar la mezcla de reacción durante 30 minutos. La temperatura interna sube hasta  $10^\circ\text{C}$ .

##### b) Síntesis de la D,L-2-Tiohistidina

Después, se añaden 27 ml (32,68 g, 304,8 moles, 6 equivalentes) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se calienta bajo fuerte agitación a  $80^\circ\text{C}$  durante 30h. Un análisis de una muestra por RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) muestra que el aducto His-Cys está completamente escindido en 2-Tiohistidina.

##### c) Aislamiento de la D,L-2-Tiohistidina

Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, la mezcla de un color marrón oscuro se extrae con 4x100 ml de acetato de etilo.

La fase acuosa se retiene y se coloca bajo una fuerte corriente de nitrógeno en un baño a  $40^\circ\text{C}$ . El pH de la mezcla se ajusta a 6 añadiendo rápidamente una solución de amoníaco acuoso al 20%. Se forma un precipitado, y se mantiene la suspensión durante 25 minutos a  $40^\circ\text{C}$  bajo agitación (bajo nitrógeno).

Después de la filtración y del lavado con 3x15 ml de agua desmineralizada, seguido por 2 lavados con 15 ml de etanol absoluto y 3x15 ml de n-pentano, el sólido obtenido se seca sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  al vacío (20 mbar). Se obtienen 5,2 g de la D,L-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco, que contiene aproximadamente el 10% de la Cisteína.

El producto se purifica por tratamiento ácido-básico: para ello, se disuelven 585 mg (3,79 mmoles) de Ditiotreitól en 100 ml de agua desmineralizada, después se añade el producto obtenido anteriormente (5,2 g). La suspensión se dispone bajo nitrógeno en un baño de agua a  $40^\circ\text{C}$ , y se añaden muy lentamente gota a gota 10 ml (11,84 g) de ácido clorhídrico concentrado, hasta disolución completa del sólido. Después, se ajusta el pH a 6 por adición lenta de 3 ml (2,735 g) de una solución acuosa de amoníaco al 20%. Un precipitado incoloro final se forma lentamente, y la suspensión se mantiene bajo agitación durante una hora.

Después de la filtración, se lava con 3x10 ml de agua desmineralizada, seguido por 3 lavados con 10 ml de etanol absoluto y 3x10ml de n-pentano, el sólido obtenido se seca sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  al vacío (20 mbares). Se obtienen 3,82 g (39%) de la D,L-2-Tiohistidina en forma de polvo blanco.

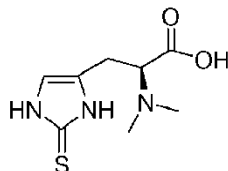
El análisis RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ ) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

$[\alpha]_{\text{D}}$ : 0 (c = 1,0; 1N HCl)

## 2-2- Preparación de los derivados de la 2-Tiohistidina

**Ejemplo 11: Preparación de la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina («one-pot») a partir de la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-histidina («one-pot»)**

5

**a) Preparación del aducto HisNMe<sub>2</sub>-Cys (compuesto de fórmula (II))**

10 Se disuelven 23,76 g (0,1 mol) de clorhidrato monohidratado de  $\alpha,\alpha$ -dimetilhistidina (V. N. Reinhold *et al.*, J. Med. Chem. 11, 258 (1968)) en 200 ml de agua. La solución se enfría hasta  $-3^{\circ}\text{C}$ , y bajo muy fuerte agitación, se añaden rápidamente gota a gota 6,68 ml (20,77 g, 130 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo sin superar los  $3^{\circ}\text{C}$  (tiempo de adición 4 minutos). La mezcla de reacción se tiñe de amarillo, y se forma un sólido rojizo. Siete minutos después del final de la adición del dibromo, el sólido rojizo está completamente disuelto, y se añaden 37,08 g (0,3 moles, 3 equivalentes) de L-Cisteína. La temperatura sube de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $1^{\circ}\text{C}$ , y la mezcla se decolora inmediatamente.

15 Después de una agitación a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 1h, un análisis de una muestra por RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) muestra que el aducto HisNMe<sub>2</sub>-Cys está formado con un rendimiento de reacción del 63%. El baño de hielo se retira, y se deja agitar la mezcla de reacción durante una hora. La temperatura interna sube hasta  $10^{\circ}\text{C}$ .

20

**b) Preparación de la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina**

25 Se añaden después 87,7 ml (106 g, 10 equivalentes) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se calienta bajo fuerte agitación a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 24h.

25

Un análisis de una muestra por RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) muestra que el producto HisNMe<sub>2</sub>-Cys está completamente escindido.

**c) Aislamiento de la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina**

30 Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, se extrae la mezcla de un color naranja con 4x400 ml de acetato de etilo.

35 Se retiene la fase acuosa, y se ajusta el pH a 4,5 - 5 con una solución de amoníaco acuosa al 20% (aproximadamente 21 ml). Con el fin de atrapar el exceso de cisteína presente en el medio, se añaden 30,5 ml (31,8 g, 3 equivalentes) de benzaldehído (según M. P. Schubert, J. Biol. Chem. 114, 341-350 (1936) o M. Seki *et al.*, J. Org. Chem. 67 (16), 5532 (2002)). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 15h, y el ácido 2-feniltiazolidin-4-carboxílico precipita en forma de un sólido amarillo claro. Después de la filtración del sólido y del aclarado con 4x40 ml de agua, el filtrado se extrae con 2x200 ml de acetato de etilo.

40 La fase acuosa se retiene, y se ajusta el pH a 6 con una solución de amoníaco acuosa al 20% (aproximadamente 2 ml). La mezcla se evapora hasta sequedad después, y el sólido obtenido se recrystaliza en agua. Se obtienen 7,28 g (33%) del producto deseado en forma de un polvo blanco.

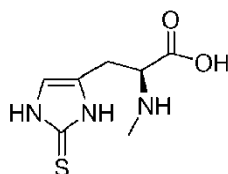
45 Los datos analíticos son idénticos a los descritos en la bibliografía (WO 95/18 108).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,87 (s, 6H); 3,20 (m, 2H); 4,19 (m, 1H); 6,78 (s, 1H).

UPLC-MS (ES+): 216,5 (MH+)

**Ejemplo 12: Preparación de  $\alpha$ -metil-2-tiohistidina a partir de  $\alpha$ -metilhistidina («one-pot»)**

50



55 Se disuelven 11,93 g (54,5 mmoles) de clorhidrato de  $\alpha$ -metilhistidina (V. N. Reinhold *et al.*, J. Med. Chem. 11, 258 (1968)) en 109 ml de agua, después la solución se enfría hasta  $0^{\circ}\text{C}$ . Bajo agitación muy fuerte, se añaden 3,64 ml

## ES 2 540 279 T3

(11,33 g, 70,9 mmoles, 1,3 equivalentes) de dibromo gota a gota sin superar los 5°C (tiempo de adición 2 minutos 30 segundos). La mezcla de reacción se tiñe de amarillo. Tres minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 20,22 g (163,6 mmoles, 3 equivalentes) de L-Cisteína, y la temperatura interna sube hasta 8°C. Inmediatamente, la mezcla se decolora. Después de una agitación a 0°C durante 1h, se añaden 28,84 ml (34,9 g, 6 equivalentes) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se calienta bajo fuerte agitación a 100°C durante 20h.

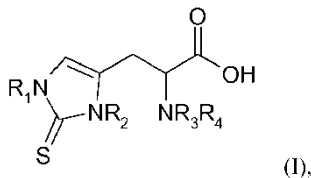
Prosiguiendo el tratamiento en analogía con el Ejemplo 11, se obtienen 5,398 g (48%) de  $\alpha$ -metil-2-tiohistidina en forma de un polvo blanco.

10 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,65 (s, 3H); 3,15 (m, 2H); 4,12 (m, 1H); 6,77 (s, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 24,8; 32,3; 60,0; 116,4; 123,2; 156,9; 170,0. UPLC-MS (ES+): 202,7 (MH+).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis de un derivado de 2-tiohistidina de fórmula (I) siguiente:

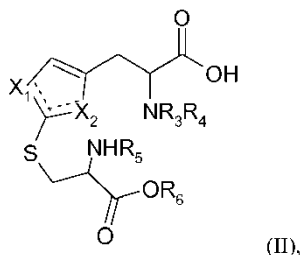


o de una sal fisiológicamente aceptable de éste, de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, para la cual:

- 10
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), representando por lo menos uno de los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> un átomo de hidrógeno, y
  - R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

15 que comprende las etapas sucesivas siguientes:

(i) reacción de escisión de un compuesto de fórmula (II) siguiente:



o de una sal fisiológicamente aceptable, de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, para la cual:

- 25
- X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> representa  $\begin{matrix} R_1N \\ \diagdown \end{matrix} \begin{matrix} \diagup \\ NR_2 \end{matrix}$  o  $\begin{matrix} N \\ \diagdown \end{matrix} \begin{matrix} \diagup \\ NR_2 \end{matrix}$ ,
  - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son tal como se han definido anteriormente,
  - R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -CO-(alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)), y
  - R<sub>6</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

en presencia de un tiol, a una temperatura superior o igual a 60°C, para dar un compuesto de fórmula (I), y

(ii) separación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (i) anterior del medio de reacción.

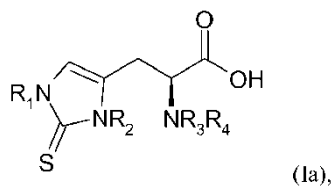
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el tiol responde a la fórmula R-SH, representando R una cadena alquilo, lineal o ramificada, y preferentemente lineal, que comprende de 1 a 8, en particular de 2 a 6 átomos de carbono, sustituida con uno o más grupos seleccionados de entre OH, SH, NH<sub>2</sub> y COOH.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el tiol se selecciona de entre la cisteína, el ditiotreitól, el 2-mercaptoetanol, el ácido 2-mercaptopropiónico, el ácido 3-mercaptopropiónico, el ácido mercaptoacético, el ácido mercaptohexanoico y el ácido tioglicólico, y preferentemente es el ácido 3-mercaptopropiónico.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa (i) se realiza a una temperatura comprendida entre 60 y 120°C, en particular entre 80 y 100°C.

45 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) responde a la fórmula (Ia) siguiente:



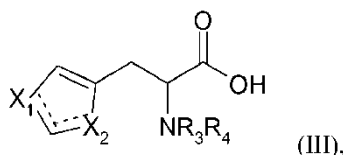


o a una sal fisiológicamente aceptable de éste, a un tautómero, a un estereoisómero o a una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular a una mezcla de enantiómeros, y en particular a una mezcla racémica de éste,

para la cual  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se definen en la reivindicación 1.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) representa la 2-tiohistidina, la  $\alpha$ -metil-2-tiohistidina o la  $\alpha,\alpha$ -dimetil-2-tiohistidina, y en particular la L-2-tiohistidina.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el compuesto de fórmula (II) se prepara a partir de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal del ácido yodhídrico, del compuesto de fórmula (III) siguiente:

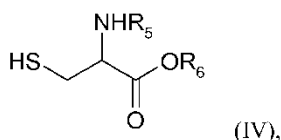


o de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y en particular de una mezcla racémica de éste,

para la cual  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se han definido en la reivindicación 1,

por reacción sucesivamente con dibromo,

y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV) siguiente:

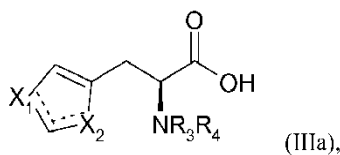


o un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste,

en la que  $R_5$  y  $R_6$  son tal como se han definido en la reivindicación 1.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) responde a la fórmula (Ia) tal como se define en la reivindicación 5 y por que el procedimiento comprende las etapas sucesivas siguientes:

(a2) reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal del ácido yodhídrico, de un compuesto de fórmula (IIIa) siguiente:



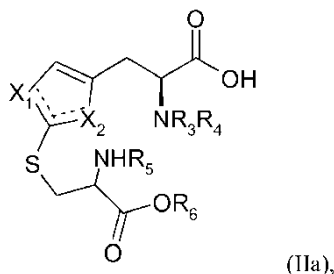
o de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y particularmente de una mezcla racémica de éste,

para la cual  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son tal como se han definido en la reivindicación 1, con dibromo,

y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV) tal como se ha definido en la reivindicación 7 o un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste, y particularmente con cisteína y en particular L-cisteína,

5

para dar un compuesto de fórmula (IIa) siguiente:



10 o una sal fisiológicamente aceptable, un tautómero, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica de éste,

15 para la cual  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  son tal como se han definido en la reivindicación 1,

(b2) reacción de escisión del compuesto de fórmula (IIa) obtenido en la etapa (a2) anterior en presencia de un tiol, a una temperatura superior o igual a 60°C, para dar un compuesto de fórmula (Ia), y

20 (c2) separación del compuesto de fórmula (Ia) obtenido en la etapa (b2) anterior del medio de reacción.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado por que el derivado de cisteína de fórmula (IV) se utiliza en exceso, a razón de 2 a 7, ventajosamente de 3 a 5 equivalentes molares de derivado de cisteína con respecto al compuesto de fórmula (III).

25 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que el dibromo se utiliza a razón de 1 a 1,5 equivalentes molares con respecto al compuesto de fórmula (III).

30 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por que la preparación del compuesto (I) a partir del compuesto (III) se realiza en un único reactor, sin aislamiento del compuesto (II) intermedio.