

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 331**

51 Int. Cl.:

**C07D 233/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2010 PCT/EP2010/064950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11042480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10763362 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2486020**

54 Título: **Procedimiento de síntesis de la ergotioneína y análogos**

30 Prioridad:

**06.10.2009 FR 0956962**

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

**13.12.2017**

73 Titular/es:

**TETRAHEDRON (100.0%)  
14, avenue de l'Opéra  
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ERDELMEIER, IRENE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 646 331 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).

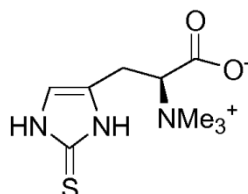
## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de síntesis de la ergotioneína y análogos.

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

La ergotioneína, descubierta en 1909 por Tanret en el cornezuelo del centeno, es un aminoácido de origen natural, con propiedades antioxidantes, que responde a la fórmula siguiente:

10



15

Su presencia se demostró no sólo en un gran número de hongos y micobacterias, sino también en las plantas, los animales y los seres humanos. Es en sus raíces donde las plantas absorben la ergotioneína biosintetizada por los hongos fijados a las mismas. Es sólo a través de su alimentación donde los organismos superiores, y los seres humanos en particular, ingieren este compuesto.

Así, varias síntesis de esta molécula se han propuesto en la bibliografía, haciendo posible sólo dos de ellas llegar a la L-ergotioneína (enantiómero natural).

20 La solicitud internacional WO 95/00494 propone una síntesis en 5 etapas de la L-ergotioneína por reacción del éster metílico de la N $\alpha$ ,N $\alpha$ -dimetil-histidina (obtenida a su vez a partir de L-histidina en 2 etapas) con clorotioformiato de fenilo, y después por reacción con clorotioformiato de etilo, formación del amonio cuaternario y finalmente desprotección del azufre y del éster metílico. Dicha estrategia de síntesis necesita así la protección del azufre, que no puede estar presente en la forma libre, con el fin de permitir la metilación del grupo dimetilamina para conducir a la función betaína. Además, el clorotioformiato de fenilo debe ser preparado a partir del tiosfosgeno (CSCl<sub>2</sub>), reactivo tóxico y difícilmente disponible en gran cantidad para una utilización a escala industrial.

25

30 La solicitud de patente US 2009/093642 también describe una síntesis en 9 etapas de L-ergotioneína a partir de histidina por apertura del ciclo imidazol y reacción con un tiocianato, tal como el tiocianato de potasio, para dar la 2-tiohistidina (según el método descrito por Heath, H. *et al.*, 1951, J. Chem. Soc., 2215), y después protección del azufre por un grupo terc-butilo, formación del amonio cuaternario y desprotección del azufre. Además de la utilización de grandes volúmenes de ácido clorhídrico, el KSCN, utilizado en medio ácido, es un reactivo muy tóxico.

35

Estos dos procedimientos tienen varias cosas en común. Además de su elevado número de etapas, acumulan los inconvenientes de utilizar no sólo unos reactivos muy tóxicos, sino también unas cantidades significativas de disolventes orgánicos y de ácido clorhídrico concentrado, de lo cual resultan riesgos en el plano medioambiental.

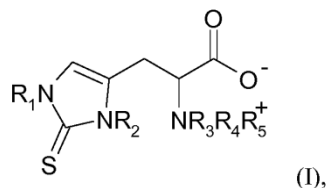
40 En términos de la estrategia de síntesis, estos dos procedimientos tienen en común introducir el azufre, a partir de la histidina o de uno de sus derivados N-dimetilados, antes de generar el grupo betaína, lo cual adolece del inconveniente de hacer que la síntesis sea más engorrosa mediante unas etapas adicionales de protección y desprotección.

45 Ishikawa *et al.* (The Journal of Biological Chemistry 1974, vol. 249, n° 14, publicación del 25 de julio, pp 4420-4427) describen asimismo un procedimiento enzimático para obtener la ergotioneína a partir de la hercinina.

50 Así, existe una necesidad real de desarrollar un nuevo procedimiento de síntesis de la ergotioneína y de sus derivados que se pueda aplicar a nivel industrial, es decir, que no tenga dificultades de purificación, que no utilice productos o disolventes peligrosos y tóxicos para los seres humanos y el medioambiente, y que permita acceder, a escala industrial, al producto con un buen rendimiento y a bajo coste.

55 En pro de desarrollar un procedimiento respetuoso con el medioambiente, utilizando simultáneamente reactivos poco tóxicos, minimizando el número de etapas, así como realizando unas reacciones en medio acuoso, el Solicitante decidió optar por una estrategia de síntesis "invertida", que consiste en introducir el azufre en un producto intermedio que ya posee el grupo betaína. Este enfoque, totalmente original, puede ser calificado de biomimética en la medida en que la biosíntesis por vía enzimática de la L-ergotioneína en los hongos procede de la misma manera (Askari, A. y Melville, D.B., 1962, J. Biol. Chem., 237, 1615-1618).

La presente solicitud de patente tiene así por objeto un procedimiento de síntesis de un derivado de fórmula (I) siguiente:



5 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,

en la que:

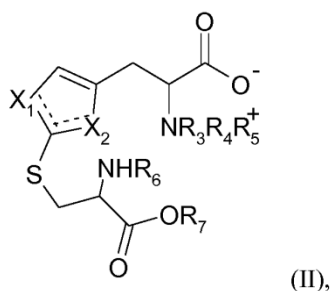
10 - R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tal como metilo, representando por lo menos uno de los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> un átomo de hidrógeno, y representando cada uno ventajosamente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

15 - representando R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, independientemente unos de otros, 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:

20



25 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, en particular de una mezcla racémica de éste,

en la que:

30 - X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> representa R<sub>1</sub>N=N<sub>o</sub> o N=N<sub>o</sub>NR<sub>2</sub>,

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son tal como se han definido anteriormente,

35 - R<sub>6</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

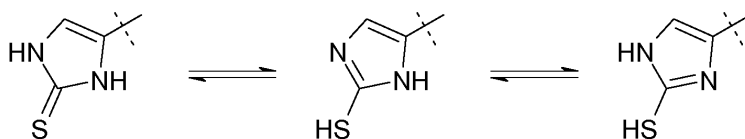
- R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y en particular un átomo de hidrógeno,

40 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 anterior (i) del medio de reacción.

45 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 inter-convertibles y están presentes en equilibrio, en solución, en unas proporciones que pueden variar dependiendo del disolvente utilizado, de la temperatura o incluso del pH.

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



5

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

10 Se entiende designar por "sales fisiológicamente aceptables" de un compuesto, unas sales que son fisiológicamente aceptables, como se ha definido anteriormente, y que tienen la actividad (farmacológica, cosmética o alimentaria) deseada del compuesto parental. Dichas sales comprenden:

(1) los hidratos y los solvatos,

15

(2) las sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido bencenosulfónico, el ácido benzoico, el ácido canforsulfónico, 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-naftalensulfónico, el ácido propiónico, el ácido salicílico, el ácido succínico, el ácido dibenzoil-L-tátrico, el ácido tártrico, el ácido p-toluensulfónico, el ácido trimetilacético, el ácido trifluoroacético y similares, o

20

25

(3) las sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental o bien es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio; o bien se coordina 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.

30

Por "estereoisómeros" se entiende, en el sentido de la presente invención, diastereoisómeros y enantiómeros. Por lo tanto, se trata de isómeros ópticos. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se designan como "diastereoisómeros," y los estereoisómeros que son imágenes especulares entre sí, pero no superponibles, se designan como "enantiómeros."

35

Una mezcla que contiene unas cantidades iguales de dos formas enantiómeras individuales de quiralidad opuesta se designa como "mezcla racémica,"

40

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 los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo. En particular, se tratará del grupo metilo.

45

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, representando R 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.

50

Por "cadena de hidrocarbonada saturada" se entiende, en el sentido de la presente invención, a una cadena de 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.

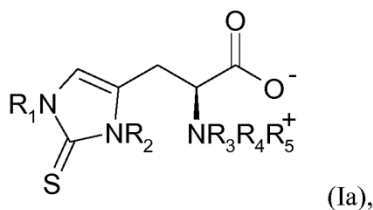
55

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.

60

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

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



5 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,

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son tal como se han definido anteriormente.

10 El compuesto de fórmula (I) representará en particular ergotioneína, y en particular la L-ergotioneína.

Etapa (i):

15 Esta reacción de escisión, realizada en presencia de un tiol, permite obtener el compuesto de fórmula (I) así como ácido pirúvico (CH<sub>3</sub>C(O)-CO<sub>2</sub>H) o uno de sus derivados, en particular un éster (CH<sub>3</sub>C(O)-CO<sub>2</sub>R<sub>7</sub>) o un derivado obtenido por reacción con el tiol, tal como un derivado tiocetálico (dos moléculas de tiol que pueden reaccionar con la función cetona del ácido pirúvico).

20 Por otro lado, el tiol deberá ser preferentemente soluble en el disolvente de reacción, que podrá ser en particular agua, lo cual tiene la ventaja adicional de ser más ecológico.

25 El tiol utilizado en esta etapa (i) podrá ser más particularmente un tiol 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, en particular 2 a 4, átomos de carbono, sustituida por uno o varios grupos seleccionados de entre OH, SH, NH<sub>2</sub> y COOH.

La presencia de grupos hidrófilos (OH, SH, NH<sub>2</sub> y COOH) podrá permitir en particular hacer que el tiol sea más soluble en agua, cuando se utiliza agua como disolvente.

30 El tiol podrá ser elegido más particularmente de entre la cisteína, el ditiotreitól, el 2-mercaptoetanol, el ácido 2-mercaptopropiónico, el ácido 3-mercaptopropiónico y el ácido tioglicólico, y preferentemente será el ácido 3-mercaptopropiónico.

Podrá tratarse asimismo del ácido mercaptoacético y del ácido mercaptohexanoico.

35 Ventajosamente, se utilizarán por lo menos 2 equivalentes molares de tiol con respecto al compuesto (II), es decir, se utilizan por lo menos 2 moles de tiol por un mol de compuesto (II) utilizado. Es posible en particular utilizar por lo menos 5 equivalentes molares de tiol, y en particular de 5 a 10 equivalentes molares de tiol con respecto al compuesto (II).

40 La mezcla de reacción se calienta a una temperatura superior a 60°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°C, ventajosamente entre 80 y 100°C, más particularmente después de la adición del tiol.

45 La reacción se podrá realizar en particular en un medio ácido.

Etapa (ii):

50 El producto final obtenido (compuesto de fórmula (I)) podrá ser separado del medio de reacción mediante unas técnicas muy conocidas por el experto en la materia y aplicables a escala industrial, en particular por evaporación, eventualmente parcial, de los disolventes, seguida preferentemente por una recristalización para purificar el producto.

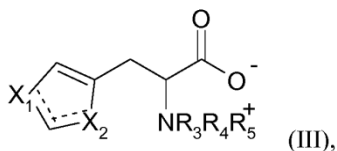
55 Como los compuestos de fórmula (I) son solubles en agua, una o varias extracciones previas con un disolvente orgánico, tal como por ejemplo, el acetato de etilo o el éter terc-butil-metílico, podrán permitir eliminar los subproductos orgánicos formados durante la reacción, tales como el ácido pirúvico o sus derivados, así como el exceso de tiol.

El producto obtenido podrá ser purificado si es necesario mediante unas técnicas muy conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, por recristalización, eventualmente después de desalinización de la fase acuosa que

lo contiene, mediante unas técnicas muy conocidas por el experto en la materia (por ejemplo por electrodiálisis, por adición de una resina adecuada, o por ósmosis inversa).

5 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.

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

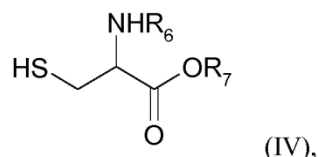


o de un tautómero, de un estereoisómero, o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y en particular de una mezcla racémica de éste,

15 en la que que  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son tal como se han definido anteriormente,

por reacción sucesivamente con dibromo,

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



25 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 el que  $R_6$  y  $R_7$  son tal como se han definido anteriormente.

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

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

35 Preferentemente, el dibromo se añade en frío (preferentemente adición muy rápida), 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.

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

45 El derivado de cisteína se utilizará ventajosamente en exceso, en particular a razón de 2 a 10, ventajosamente 3 a 7 equivalentes molares de derivado de cisteína con respecto al compuesto de tipo betaína de fórmula (III), es decir que se utilizan de 2 a 10, ventajosamente de 3 a 7 moles de derivado de cisteína por un mol de compuesto (III) utilizado.

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

El rendimiento de esta etapa podrá ser superior o igual a 45%, o incluso superior o igual a 60%.

50 Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) no será aislado del medio de reacción, sino que se aplicará directamente en la etapa (i) siguiente. Así, la preparación del compuesto (I) a partir del compuesto (III) se puede realizar en un único reactor, sin aislamiento del compuesto (II) intermedio (reacción "one pot").

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

(a1) reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal de ácido yodhídrico, de un compuesto de tipo betaína 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 en particular de una mezcla racémica de éste,

5

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 en particular una mezcla racémica de éste, y en particular con cisteína, y particularmente L-cisteína,

10

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

15

(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

20

(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 tipo betaína de fórmula (II) descrita anteriormente.

25

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

30

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 necesario por lo tanto eliminar el exceso de derivado de cisteína con el fin de facilitar el aislamiento y la purificación del compuesto de fórmula (I). En particular, en el caso de un derivado de cisteína para el que  $R_7 = H$  o alquilo ( $C_1-C_4$ ) y en particular en el caso de la cisteína, se puede añadir por ejemplo benzaldehído que formará entonces con el derivado de cisteína en exceso, un derivado de ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico, compuesto que precipita en un disolvente tal como el agua. Mediante estos medios se podría reciclar el derivado de cisteína en exceso.

35

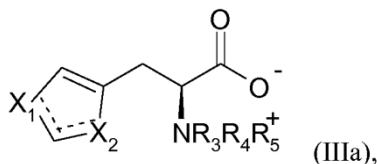
El rendimiento global de preparación del compuesto de fórmula (I) a partir del compuesto de tipo betaína de fórmula (III) podrá ser superior o igual a 40%.

40

Según una forma 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:

45

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



50

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,

en la que  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son tal como se han definido anteriormente,

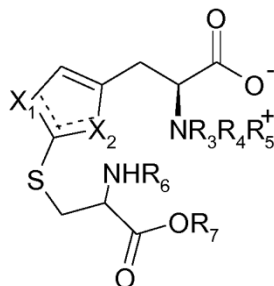
55

sucesivamente 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 en particular con cisteína y particularmente L-cisteína,

60

para dar un compuesto de tipo betaína de fórmula (IIa) siguiente:



(IIa),

5 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,

10 en la que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son tal como se han definido anteriormente,

(b2) reacción de escisión del compuesto de tipo betaína 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 la reacción que podrá ser en particular agua, y en particular con la cisteína, el ditiotreitól, el 2-mercaptoetanol, el ácido 2-mercaptopropiónico, el ácido 3-mercaptopropiónico o el ácido tioglicólico, y preferentemente con el ácido 3-mercaptopropiónico, a una temperatura superior o igual a 60°C,

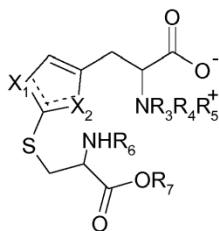
15 para dar un compuesto de fórmula (Ia), y

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

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

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

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un compuesto de fórmula (II) siguiente:



(II),

30 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,

35 en la que:

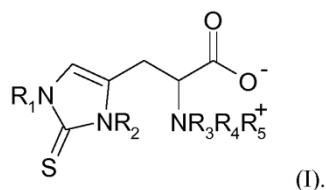
- X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> representa R<sub>1</sub>N=N<sub>0</sub> o N=N<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, y
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son tal como se han definido anteriormente,

40 con la exclusión del compuesto en el que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> representa R<sub>1</sub>N=N<sub>0</sub> o N=N<sub>2</sub>R<sub>2</sub>,

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan cada uno un grupo metilo y R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> representan cada uno un átomo de hidrógeno

para la preparación de un derivado de fórmula (I) siguiente:





por síntesis química que comprende la escisión en presencia de un tiol por calentamiento a una temperatura superior o igual a 60°C.

5

El compuesto excluido se describe en: Ishikawa *et al.* J. Biol. Chem. 1974, 249(14), 4420.

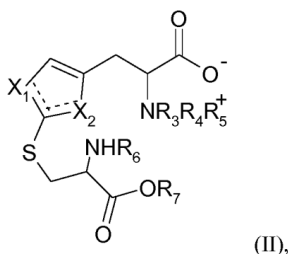
En particular, no se tratará de un compuesto de fórmula (II) en la que  $X_1$  y  $X_2$  representa  $\text{HN}=\text{N}^+\text{O}^-$  o  $\text{N}=\text{N}^+\text{H}$ , y  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  representan cada uno un grupo metilo.

10

Podrá tratarse en particular de un compuesto de fórmula (IIa) tal como se ha definido anteriormente. En particular, este compuesto podrá ser el diclorhidrato del 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N,N,N-trimetiletanaminio (Herc-Cys, 2HCl).

15

La presente invención describe asimismo un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (II) 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 particularmente una mezcla racémica de éste,

en la que:

25

- $X_1$  y  $X_2$  representa  $\text{R}_1\text{N}=\text{N}^+\text{O}^-$  o  $\text{N}=\text{N}^+\text{R}_2$ , y
- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$  son tal como se han definido anteriormente,

por reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal de ácido yodhídrico, de un compuesto de tipo betaína de fórmula (III) tal como se ha definido anteriormente,

30

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,

en la que  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son tal como se han definido anteriormente,

35

sucesivamente con dibromo, y después con un derivado de cisteína de fórmula (IV) tal como se ha definido anteriormente.

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

40

Preferentemente, el dibromo se añade en frío (preferentemente adición muy rápida) 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, comprendida ventajosamente 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 en particular cisteína, y particularmente L-cisteína.

50

El derivado de cisteína se utilizará ventajosamente en exceso, en particular a razón de 2 a 10, ventajosamente 3 a 7 equivalentes molares de derivado de cisteína con respecto al compuesto de tipo betaína de fórmula (III), es decir, que se utilizan de 2 a 10, ventajosamente de 3 a 7 moles de derivado de cisteína por un mol de compuesto

(III) utilizado.

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

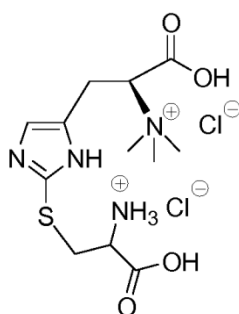
- 5 La presente invención se entenderá mejor a la luz de los ejemplos siguientes, que se proporcionan solamente a título de ilustración y no podrían de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

### Ejemplos

- 10 Todas las reacciones se realizan al aire libre a no ser que se indique otra cosa.

#### 1- Preparación de los compuestos de fórmula (II) según la invención

- 15 **Ejemplo 1: Preparación del diclorhidrato del 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N,N,N-trimetiletanaminio (Herc-Cys, 2HCl)**



- 20 Se disuelven 986 mg (5 mmoles) de Hercinina (V.N. Reinhold et al., J. Med. Chem. 11, 258 (1968)) en 10 ml de agua. Se añaden 417  $\mu$ l (5 mmoles) de ácido clorhídrico concentrado, y después se enfría la solución hasta 0°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota 308  $\mu$ l (959 mg, 6 mmoles, 1,2 equiv.) de dibromo (tiempo de adición 1 min 20). La mezcla de reacción se vuelve amarilla, y se forma un sólido rojizo. Cinco minutos después del final de la adición del dibromo, se añaden 1,87 g (15 mmoles, 3 equiv.) de L-Cisteína. La mezcla se decolora inmediatamente, y el precipitado rojizo se disuelve en varios minutos.

- 25 Después de agitación a 0°C durante 1 h, la mezcla se filtra, y el precipitado se lava con 2x0,5 ml de agua.

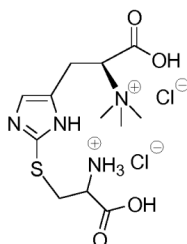
- 30 El filtrado se deposita en una columna rellena con 75 g de DOWEX® 50WX2-400, acondicionada previamente con ácido clorhídrico HCl 1N. Después de la elución con 400 ml de ácido clorhídrico 1N, y después 500 ml de ácido clorhídrico 2N, las fracciones que contienen el producto deseado se reúnen. Después de evaporación y 2 co-evaporaciones con 2x20 ml de tolueno, se obtienen después del secado 894 mg (46%) del producto deseado en forma de cristales amarillos.

- 35 (Este producto fue sintetizado con un bajo rendimiento a partir de la Ergotioneína y de la Cloroalanina, pero en forma de aminoácido libre, por Ishikawa et al., J. Biol. Chem. 249 (14), 4420 (1974).)

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,14 (s, 9H); 3,37 (m, 2H); 3,56 (m, 2H); 4,20 (m, 1H); 4,28 (m, 1H); 7,31 (s, 1H).

- 40 UPLC-MS (ES+) : 317,4 (MH+)

#### Ejemplo 2: Preparación del diclorhidrato del dicloruro de 2-{2-[(2-amonio-2-carboxietil)tio]-1H-imidazol-4-il}-1-carboxi-N,N,N-trimetiletanaminio (Herc-Cys, 2HCl) - variación de la cantidad de L-Cisteína



- 45

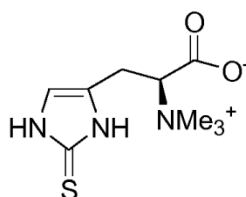
Se procede como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se añaden 3,12 g (25 mmoles, 5 equiv.) de L-Cisteína. Siete minutos después del final de la adición de dibromo.

Después del tratamiento y de la purificación en una columna DOWEX®, se obtienen, después de secado, 1,13 g (58%) del producto deseado en la forma de cristales amarillos.

El análisis por <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O/DCI) es idéntico al descrito en el Ejemplo 1.

## **2- Preparación de los compuestos de fórmula (I) según la invención a partir de los productos intermedios de fórmula (II)**

### **Ejemplo 3: Preparación de la L-Ergotioneína por escisión de Herc-Cys, 2HCl**



Se solubilizan 1,67 g (4,4 mmoles) de Herc-Cys, 2HCl en 16,7 ml de agua, y se añaden 1,895 ml (2,29 g, 21,39 mmoles, 5 equiv.) de ácido 3-mercaptopropiónico. La mezcla clara, ligeramente amarilla, se calienta bajo agitación durante 24 horas a 85°C. A continuación, se añaden de nuevo 1,895 ml (2,29 g, 21,39 mmoles, 5 equiv.) de ácido 3-mercaptopropiónico, y se continúa el calentamiento durante 48 horas.

El medio de reacción se enfría hasta 0°C, y se forma un precipitado blanco. Después de la filtración y del lavado del precipitado con 2x2 ml de agua fría, el filtrado se lava con 5x20 ml de diclorometano y 5x20 ml de acetato de etilo.

La fase acuosa se evapora al vacío, y el residuo se disuelve en 33 ml de agua. Mediante la adición de una solución de amoníaco al 20%, el pH de la solución se ajusta a 6. Después de la liofilización, el polvo obtenido se solubiliza en caliente en una mezcla etanol/agua (7/1). Después de añadir carbón activado (100 mg) y filtrar en caliente en Clarcel, la solución obtenida se mantiene en frío durante 14h. Después de la filtración y del secado, se obtienen 676 mg (69%) de L-Ergotioneína en forma de polvo blanco.

Los datos analíticos obtenidos son idénticos a los obtenidos en la bibliografía (*J. Xu, J. C. Yadan, J. Org. Chem.* 60, 6296 - 6301 (1995)).

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O), 400 MHz): δ (ppm) = 3,20 (m, 2H); 3,29 (s, 9H); 3,90 (dd, J = 11 Hz, J = 5 Hz, 1H); 6,81 (s, 1H).

UPLC-MS (ES+): 230,6 (MH+)

## **3- Preparación de los compuestos de fórmula (I) según la invención sin aislamiento de los productos intermedios de fórmula (II)**

### **Ejemplo 4: Preparación de la L-Ergotioneína a partir de la Hercinina ("one-pot") - purificación después de desalinización de la fase acuosa con una resina**

#### **a) Formación del aducto Herc-Cys (compuesto de fórmula (II))**

Se disuelven 19,72 g (0,1 moles) de Hercinina (*V. N. Reinhold et al., J. Med. Chem.* 11, 258 (1968)) en 200 ml de agua. Se añaden 8,35 ml (0,1 moles) de ácido clorhídrico concentrado, y después se enfría la solución hasta 2°C. Bajo una agitación muy fuerte, se añaden gota a gota 6,68 ml (20,77 g, 130 mmoles, 1,3 equiv.) de dibromo sin sobrepasar 3°C (tiempo de adición 10 min.). El medio de reacción se vuelve amarillo, y se forma un sólido rojizo. Siete minutos después de finalizar la adición del dibromo, se añaden 62,4 g (0,5 moles, 5 equiv.) de L-Cisteína, y la temperatura interna sube hasta 3°C. La mezcla se decolora inmediatamente, y el precipitado rojizo se disuelve en varios minutos.

Después de agitación a 0°C durante 1 h, un análisis de una muestra por <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto Herc-Cys se forma con un rendimiento de reacción del 55%.

El baño de hielo se retira, y se deja agitando la mezcla de reacción durante una hora. La temperatura interna sube hasta 10°C. El producto obtenido no se aísla del medio de reacción y se utiliza directamente en la etapa

siguiente.

b) Formación de la L-Ergotioneína

5 Se añaden a continuación 87,7 ml (106 g, 10 equiv.) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se calienta bajo agitación fuerte hasta 80°C durante 22 horas.

Un análisis de una muestra por <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto Herc-Cys se escinde completamente en Ergotioneína.

10

c) Aislamiento de la L-Ergotioneína

Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de un color naranja-marrón se extrae con 4x400 ml de acetato de etilo.

15

Se retiene la fase acuosa, y el pH se ajusta a 4,5-5 con una solución de amoniaco acuosa al 20% (aproximadamente 21 ml). Con el fin de atrapar el exceso de la L-cisteína presente en el medio, se añaden 50,8 ml (53,0 g, 5 equiv.) 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)*).

20

La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 15 horas, y el ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico precipita en forma de un sólido amarillo claro. Después de la filtración del sólido y del aclarado con 4x50 ml de agua, el filtrado se extrae con 2x200 ml de acetato de etilo.

d) Purificación después de la desalinización de la fase acuosa con una resina

Para facilitar la cristalización del producto final, la fase acuosa retenida se desaliniza. Para ello, se trata por ejemplo con resina Amberlite IRA 410 en forma de hidrogenocarbonato (según *K. A. Piez et al., J. Biol Chem. 194, 669-672 (1952)*). Se añaden 120 g de la resina al medio de reacción y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se observa una fuerte liberación de gas, así como una decoloración gradual del medio. Por otra parte, el pH del medio de reacción desciende hacia pH = 8. Después de 2 h de tiempo de contacto, la resina se filtra. Después de aclarar con 5x20 ml de agua, la operación se repite 2 veces más.

A continuación, el filtrado se evapora hasta sequedad, y el sólido obtenido se recrystaliza con etanol acuoso. Se obtienen 8,21 g (34,9%) de L-Ergotioneína en forma de un polvo blanco.

35

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 3,20 (m, 2H); 3,29 (s, 9H); 3,90 (dd, J = 11 Hz, J = 5 Hz, 1H); 6,81 (s, 1H).

40 UPLC-MS (ES+): 230,6 (MH+)

[α]<sub>D</sub> = +124,6° (c=1, H<sub>2</sub>O)

**Ejemplo 5: Preparación de L-Ergotioneína a partir de la Hercinina ("one-pot") - purificación después de desalinización de la fase acuosa por electrodiálisis**

45

a) Formación del aducto Herc-Cys (compuesto de fórmula (II))

50 Se disuelven 98,6 g (0,5 moles) de Hercinina en 1,5 l de agua. La solución es transferida a un reactor de vidrio con doble envuelta con agitación mecánica. Se añaden 41,75 ml (0,5 moles) de ácido clorhídrico concentrado, y después se enfría la solución hasta 0°C. Bajo agitación muy fuerte, se añaden gota a gota 34 ml (106 g, 0,66 moles, 1,3 equiv.) de dibromo sin sobrepasar 2°C (tiempo de adición 6,5 minutos). El medio de reacción se colorea de amarillo, y se forman unos copos rojizos. Siete minutos después de finalizar la adición del dibromo, se añaden 432 g (3,5 moles, 7 equiv.) de L-Cisteína, y la temperatura interna sube hasta 4°C. Inmediatamente, la mezcla se decolora, y el precipitado rojizo se disuelve en varios minutos. Se obtiene una suspensión blanquecina.

55

Después de agitación a 0°C durante 1 h, un análisis de una muestra por <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) muestra que se forma el aducto Herc-Cys con un rendimiento de reacción del 56%.

60

El sistema de enfriamiento se detiene, y se deja agitando el medio de reacción durante una hora. La temperatura interna sube hasta 10°C.

b) Formación de la L-Ergotioneína

65

A continuación, se añaden 441 ml (533 g, 5 moles, 10 equiv.) de ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla, y se

calienta bajo agitación fuerte a 80°C durante 24 horas.

Un análisis de una muestra por <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) muestra que el aducto Herc-Cys se escinde completamente en Ergotioneína.

5

c) Aislamiento de la L-Ergotioneína

Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de un color naranja-marrón se extrae con 4x2 l de acetato de etilo.

10

Se retiene la fase acuosa, y el pH se ajusta a 4,5-5 con una solución de amoníaco acuosa al 20% (aproximadamente 110 ml). Con el fin de atrapar el exceso de la cisteína presente en el medio, se añaden 359 ml (375 g, 3,5 moles, 7 equiv.) 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)*).

15

La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 15 h, y el ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico precipita en forma de un sólido amarillo claro. Después de la filtración del sólido y aclarado con 4x500 ml de agua, el filtrado se extrae con 4x1,5 l de acetato de etilo.

20

d) Purificación después de la desalinización de la fase acuosa por electrodiálisis

Para facilitar la cristalización del producto final, la fase acuosa retenida se desaliniza. Para ello, se desaliniza por ejemplo por electrodiálisis (Bench Scale Electrodialysis Pump System BED 1-3 de PCCell (Alemania), celda ED200-020, 20 pares de membranas (intercambio catiónico PC-SK, intercambio aniónico PC-SA), 10 V).

25

La solución desalinizada se evapora a continuación hasta sequedad, y el sólido obtenido se recristaliza con etanol acuoso. Se obtienen 47,68 g (41%) de L-Ergotioneína en forma de un polvo blanco.

30

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 3,20 (m, 2H); 3,29 (s, 9H); 3,90 (dd, J = 11 Hz, J = 5 Hz, 1H); 6,81 (s, 1H).

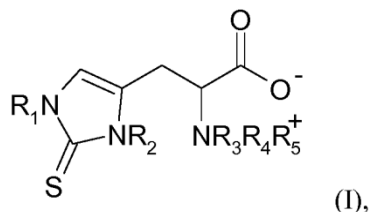
UPLC-MS (ES+): 230,6 (MH+)

35

[α]<sub>D</sub> = +125,2° (c=1, H<sub>2</sub>O)

## REIVINDICACIONES

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



5

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

10 en la que:

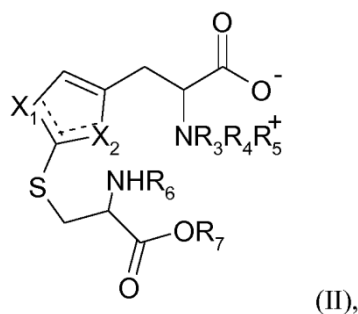
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), representando por lo menos uno de los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> un átomo de hidrógeno, y
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan, independientemente unos de otros, 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 tipo betaína de fórmula (II) siguiente:

20



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

25

- X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> representa R<sub>1</sub>N=C=N<sub>0</sub> o N=C=NR<sub>2</sub>,
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son tal como se han definido anteriormente,
- R<sub>6</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>7</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

30

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.

35

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 por uno o varios grupos seleccionados de entre OH, SH, NH<sub>2</sub> y COOH.

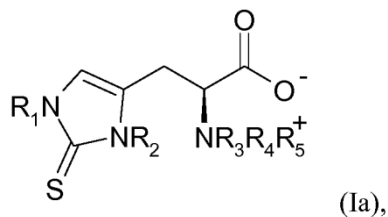
40

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el tiol se selecciona de entre la cisteína, el ditiotretitol, 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.

45

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.

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



5

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,

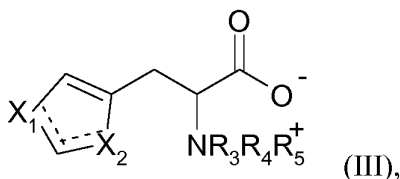
10

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son tal como se han definido en la reivindicación 1.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) representa la ergotioneína, y en particular la L-ergotioneína.

15

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



20

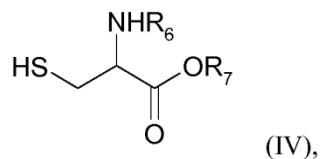
o de un tautómero, de un estereoisómero o de una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular de una mezcla de enantiómeros, y en particular de una mezcla racémica de éste,

25 en la que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> 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:

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,

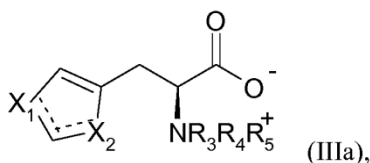
35

en la que R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> 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 ha definido en la reivindicación 5, y por que el procedimiento comprende las etapas sucesivas siguientes:

40

(a2) reacción de una sal de adición de ácido, con la exclusión de la sal de ácido yodhídrico, de un compuesto de tipo betaína de fórmula (IIIa) 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,

5

en la que  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son tal como se han definido en la reivindicación 1,

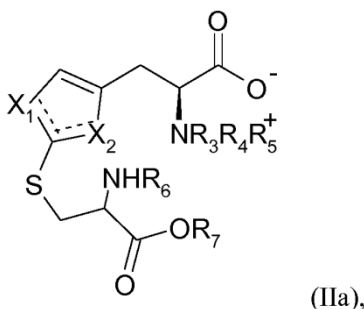
sucesivamente con dibromo,

10

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 en particular con cisteína y particularmente L-cisteína,

15

para dar un compuesto de tipo betaína de fórmula (IIa) siguiente:



20

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,

en la que  $X_1$  y  $X_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$  son tal como se han definido en la reivindicación 1,

25

(b2) reacción de escisión del compuesto de tipo betaína 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

30

(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 se utiliza en exceso, a razón de 2 a 10, ventajosamente de 3 a 7 equivalentes molares de derivado de cisteína con respecto al compuesto de tipo betaína de fórmula (III).

35

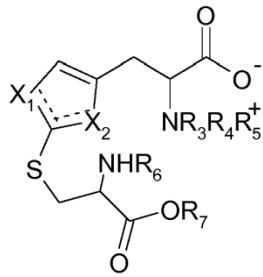
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que el dibromo se utiliza a razón de 1 a 1,5 equivalentes molares con respecto al compuesto de tipo betaína de fórmula (III).

40

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

12. Utilización de un compuesto de tipo betaína de fórmula (II) 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 particularmente una mezcla racémica de éste,

5

en la que:

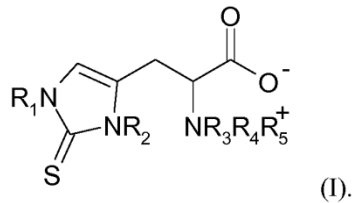
- $X_1 \sim X_2$  representa  $R_1N \sim N O$  o  $N \sim NR_2$ , y
- $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$  y  $R_7$  son tal como se han definido en la reivindicación 1,

10

con la exclusión del compuesto en el que  $X_1 \sim X_2$  representa  $HN \sim N O$  o  $N \sim NH$ ,  $R_3, R_4$  y  $R_5$  representan cada uno un grupo metilo y  $R_6$  y  $R_7$  representan cada uno un átomo de hidrógeno

para la preparación de un derivado de fórmula (I) siguiente:

15



por síntesis química que comprende la escisión en presencia de un tiol por calentamiento hasta una temperatura superior o igual a 60°C.