

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 613**

51 Int. Cl.:

C07D 233/26 (2006.01)

C07D 239/06 (2006.01)

C07D 243/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2009 PCT/EP2009/005175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10006792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09777236 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2303847**

54 Título: **Síntesis de amidinas cíclicas**

30 Prioridad:

16.07.2008 DE 102008033448

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

18.02.2019

73 Titular/es:

**BITOP AG (100.0%)
Stockumer Strasse 28
58453 Witten, DE**

72 Inventor/es:

**LENTZEN, GEORG y
NEUHAUS, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 700 613 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

Síntesis de amidinas cíclicas

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de amidinas cíclicas. Además, la invención se refiere a las propias amidinas cíclicas distintas. En particular, en el caso de las amidinas cíclicas puede tratarse de ectoína, derivados de ectoína y análogos de ectoína.

Los osmolitos o bien solutos compatibles de microorganismos extremófilos forman un grupo conocido de sustancias protectoras de bajo peso molecular. Los extremófilos son microorganismos muy excepcionales, dado que crecen óptimamente o bien con altas concentraciones salinas (hasta 200 g de NaCl/l) y altas temperaturas (de 60 a 110 °C), que conducirían en caso de organismos mesófilos (normales) a daños masivos de estructuras celulares. En los últimos años se ha dedicado por tanto un gran esfuerzo de investigación para identificar los componentes bioquímicos que conducen a la estabilización notable de las estructuras celulares. Aunque muchas enzimas de microorganismos hipertermófilos son estables también bajo altas temperaturas, no se aplica esto generalmente para las estructuras celulares de organismos termófilos e hipertermófilos. A la alta estabilidad frente a la temperatura de estructuras celulares contribuyen en medida considerable las sustancias orgánicas de bajo peso molecular (solutos compatibles, osmolitos) en el medio intracelular. Distintos osmolitos novedosos pudieron identificarse por primera vez en los últimos años en microorganismos extremófilos. En algunos casos pudo mostrarse ya la contribución de estos compuestos a la protección de estructuras celulares - sobre todo enzimas - frente a calor y sequedad (K. Lippert, E. A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1994, 37, 61-65; P. Louis, H. G. Trüper, E.A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1994, 41, 684-688; Ramos *et al.*, Appl. Environm. Microbiol. 1997, 63, 4020-4025; Da Costa, Santos, Galinski, Adv. in Biochemical Engineering Biotechnology, 61, 117-153).

Para una serie de solutos compatibles han resultado posibilidades de aplicación prácticas en el campo médico, cosmético y biológico. A los solutos compatibles más importantes pertenecen a este respecto la ectoína (ácido 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-pirimidin-4-carboxílico) o bien sus derivados. Así se describe por ejemplo en el documento EP 0 887 418 A2 el uso de ectoína e hidroxiectoína para el tratamiento de enfermedades de la piel o como aditivo eficaz para la crioprotección de principios activos biológicos y células. El documento DE 10 2006 056 766 A1 muestra el uso de ectoína para el tratamiento del síndrome de fuga vascular (VLS). Otros ejemplos son la estabilización de vacunas (documento DE 100 65 986 A1), el tratamiento de enfermedades pulmonares que se basan en el efecto de materia particulada y enfermedades cardiovasculares (documento DE 103 30 768 A1) o el uso dermatológico para el tratamiento de neurodermitis (documento DE 103 30 243 A1).

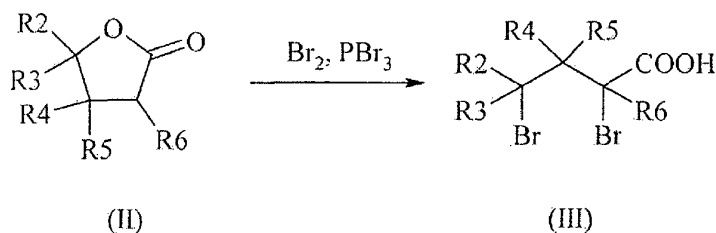
Los solutos compatibles tal como ectoína e hidroxiectoína pueden enriquecerse en condiciones de alto contenido salino muy bien en bacterias, tal como *Halomonas elongata* o *Marinococcus halophilus*, y a continuación puede aislarse de la masa seca. Una posibilidad consiste a este respecto en el denominado "ordeño de bacterias", en el que se reduce la salinidad del medio, después de que las células hayan producido con alta salinidad grandes cantidades de ectoína. La reducción de la salinidad conduce a que las bacterias descarguen la ectoína en el medio, del cual puede aislarse y puede purificarse mediante cromatografía. Las propias células permanecen a este respecto intactas y pueden "ordeñarse" varias veces (T. Sauer, E.A. Galinski, Biotech. Bioeng., 1998, 57, 306-313). La ventaja de un procedimiento de este tipo en comparación con una síntesis puramente química es en particular la estereoselectividad de la biosíntesis. De manera correspondiente se obtiene únicamente la L-ectoína en forma enantioméricamente pura. Un inconveniente de la biosíntesis es sin embargo que ésta está limitada a sustancias que se acumulan en las propias bacterias como productos finales, es decir es posible una derivatización en todo caso en medida limitada partiendo de la ectoína obtenida.

Básicamente se conoce también la síntesis química de ectoína según Koichi *et al.* (documento JP-A-03031265). En este procedimiento se hace reaccionar éster trimetilico de ácido ortoacético con ácido 2,4-diaminobutírico. Durante la reacción se acetila en primer lugar el ácido 2,4-diaminobutírico, realizándose a continuación a temperatura elevada un cierre de anillo de condensación para dar el producto deseado. El documento DE 4342560 divulga un procedimiento para la preparación de derivados de ectoína. Además de ectoína y sus derivados se conocen también los correspondientes análogos de anillo de 5 y 7 miembros. El correspondiente análogo de anillo de 7 miembros se denomina también homoectoína (ácido 4,5,6,7-tetrahidro-2-metil-1H-[1,3]-diazepin-4-carboxílico), el correspondiente análogo de anillo de 5 miembros DHMICA (ácido 4,5-dihidro-2-metil-imidazol-4-carboxílico). La homoectoína se obtiene de manera correspondiente a la síntesis según Koichi mediante cierre de anillo entre el éster trimetilico del ácido ortoacético y ornitina, DHMICA mediante cierre de anillo entre éster trimetilico del ácido ortoacético y ácido 2,3-diaminopropiónico. La homoectoína y DHMICA han mostrado en primeros estudios propiedades prometedoras.

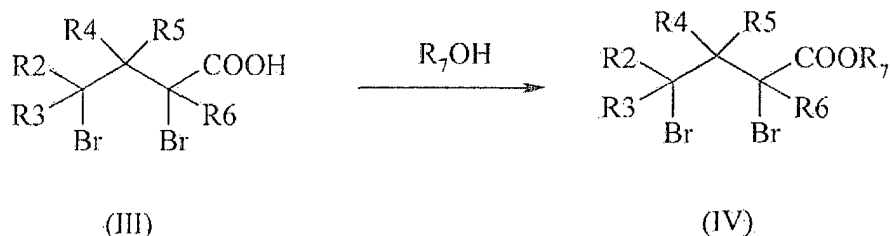
Ahora como antes no existe, sin embargo, ninguna vía de síntesis general para generar distintas amidinas cíclicas en forma de un enantiómero que correspondan en su estructura base a ectoína, homoectoína o DHMICA. Se plantea, por tanto, el objetivo de poner a disposición un procedimiento de este tipo.

Este objetivo se soluciona de acuerdo con la invención mediante procedimientos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

La estrategia de síntesis de acuerdo con la invención parte de una lactona de fórmula general II, que se hace reaccionar mediante una bromación para dar el compuesto de dibromo III. La bromación se realiza en presencia de bromo y PBr_3 . En lugar del uso directo de PBr_3 es posible también el uso de fósforo.



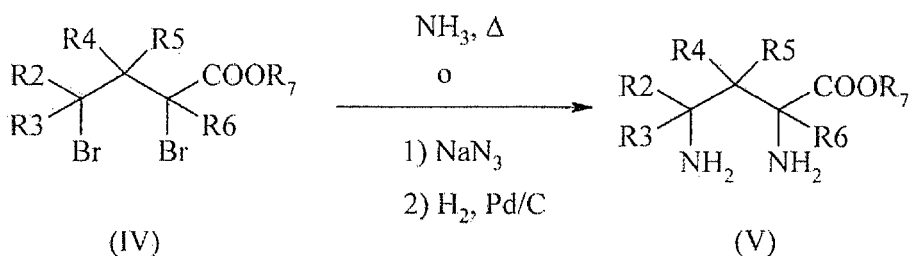
- 5 El 2,4-dibromobutirato III obtenido mediante la bromación debe esterificarse para las reacciones siguientes, de manera que se llegue al correspondiente éster IV del 2,4-dibromobutirato. La esterificación es importante por un lado en cuanto a las reacciones siguientes, además debía realizarse una esterificación también, por tanto, a ser posible inmediatamente para impedir la formación de la correspondiente α -bromo- γ -butirolactona a partir del compuesto de dibromo III con disociación de HBr. La esterificación se realiza preferentemente mediante reacción con metanol o
- 10 etanol en medio ácido. A este respecto puede realizarse la esterificación en particular directamente a continuación de la bromación, es decir sin aislamiento temporal del compuesto III, por ejemplo mediante adición de metanol absoluto o etanol con conducción a través de cloruro de hidrógeno gaseoso HCl.



- 15 Mediante variación dirigida de los sustituyentes R2, R3, R4, R5 y R6 en la butirolactona II pueden prepararse de manera correspondiente derivados de ectoína sustituidos. En el caso de los restos R2, R3, R4, R5, R6 y R7 puede tratarse de H o restos alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxialquilo o ariltioalquilo. Por consiguiente está a disposición un gran diversidad de posibilidades de variación. Preferentemente, sin embargo, en el caso de los restos R2, R3, R4, R5 y R6 se trata de H o alquilo C1 a C6. Con frecuencia se encuentra a este respecto una sustitución únicamente en una de las posiciones R2, R3, R4, R5 y R6, mientras que los otros restos en
- 20 cada caso representan un átomo de H.

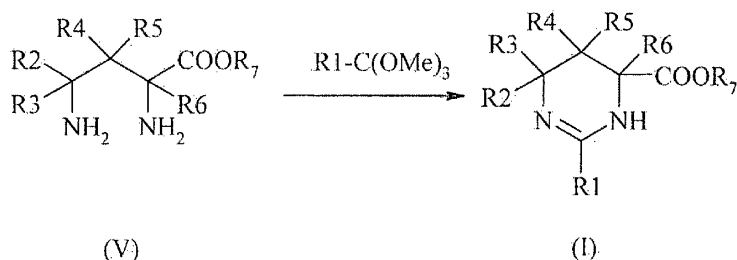
- Tras la preparación del compuesto de dibromo IV esterificado se realiza una aminación para dar el compuesto de diamino V. La sustitución del bromo por grupos amino puede realizarse o bien mediante reacción directa con amoníaco o mediante sustitución nucleófila con una azida seguido de una hidrogenación posterior. La reacción directa con amoníaco puede realizarse en solución de amoníaco acuosa concentrada a temperatura elevada de
- 25 aprox. 50 °C durante un espacio de tiempo más largo de aprox. 20 a 30 horas, mediante reacción con amoníaco en un autoclave o en amoníaco líquido. En el último caso por ejemplo se condensa amoníaco en un matraz a aprox. -40 °C y eventualmente se diluye con éter libre de agua. El compuesto de dibromo IV se añade lentamente. La reacción tiene lugar durante un espacio de tiempo de aprox. 2 horas.

- 30 Como alternativa puede realizarse también una sustitución nucleófila de los átomos de bromo con una azida, usándose preferentemente azida de sodio NaN_3 . A continuación se realiza una hidrogenación en condiciones estándar a través de un catalizador adecuado, por ejemplo paladio /carbón activo Pd/C o platino.

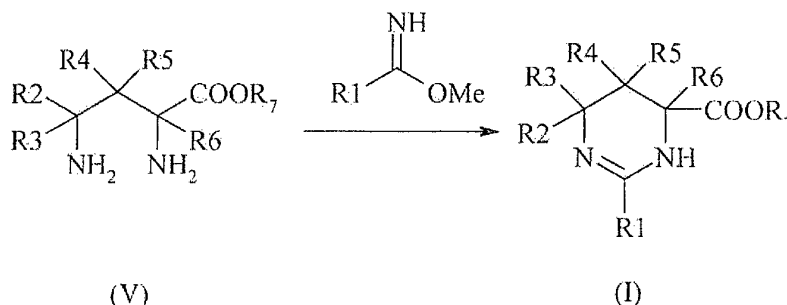


- 35 Del compuesto de diamino V se obtiene un enantiómero tal como se describe posteriormente. El enantiómero obtenido del compuesto de diamino V se cicla finalmente, eventualmente tras hidrólisis previa de la función éster, para dar el producto deseado. Esto puede realizarse en particular mediante reacción con un ortoéster adecuado $R1-C(OR18)_3$, en el que es R1 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxialquilo o

arilitioalquilo. En el caso de R18 se trata de un resto alquilo, en particular un resto alquilo C₁-C₆. La reacción se realiza de acuerdo con el esquema general, tal como se ha descrito por Koichi *et al.* (véase anteriormente). Los ortoésteres con R18 = Me y R1 = Me o Ph pueden obtenerse comercialmente.



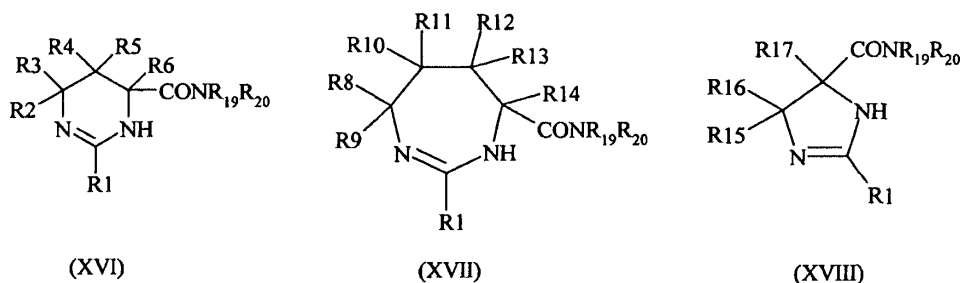
- 5 En lugar del uso de un ortoéster es concebible también una reacción con un imidato o tioimidato. La reacción con acetimidato de metilo (R1= Me) o bien benzoimidato de metilo (R1= Ph) adquirible está representada en el siguiente esquema y en general se describe por J. Einsiedel *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, 13, 851-854.



- 10 Mediante el uso de un correspondiente ortoéster, imidato o tioimidato puede ajustarse el sustituyente R1 del producto deseado. Por ejemplo, mediante el uso de éster trimetílico de ácido ortoacético (ortoacetato de trimetilo, R1,18 = metilo) se genera también un derivado de ectoína, en el que es R1 = metilo.

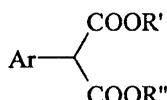
Tal como se ha mencionado ya, antes o tras la ciclación para dar amidina de fórmula general I puede realizarse también una hidrólisis de la función éster, es decir tras realizar la hidrólisis es R7 = H, pudiéndose mencionar que ectoína y sus derivados que disponen de una función carboxi, se encuentran con pH fisiológico como zwitterión. Lógicamente puede derivatizarse la función carboxi también posteriormente, realizándose una esterificación adicional. Por consiguiente existe una gran diversidad de posibilidades para la generación de amidinas distintas de fórmula general I.

- 20 Otra posible derivatización de la función carboxi consiste en la transformación en la amida. El producto I, VI o bien XI se transforma para ello de acuerdo con el procedimiento usual desde un ácido carboxílico o bien un éster de ácido carboxílico en una amida de ácido carboxílico. Esto se realiza por ejemplo mediante reacción directa del éster o también a través del desvío de la reacción del correspondiente cloruro de ácido o bien anhídrido de ácido con amoníaco/una amina. Por consiguiente se obtienen como resultado compuestos de la estructura base:

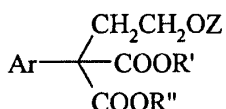


- 25 A este respecto pueden ser R19 y R20 en cada caso H o alquilo, siendo preferentemente R20 = H. En particular, en el caso de R19 puede tratarse de una cadena de alquilo de cadena larga, por ejemplo de C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇ o C₁₈. Al mismo tiempo, preferentemente en el caso de R2 - R6, R8 - R14 o bien R15 - R17 se trata de H, mientras que es R1 = H o metilo, es decir los anillos no llevan esencialmente ningún otro sustituyente. Las amidinas de este tipo se presentan de manera especialmente prometedora debido a la elevada lipofilia.

Las γ -butirolactonas usadas pueden obtenerse en parte comercialmente, por ejemplo R2 = metilo, R3, R4, R5, R6 = H (CAS: 108-29-2) o R2 = fenilo, R3, R4, R5, R6 = H (CAS: 1008-76-0), R2, R3, R4, R5 = H, R6 = metil (CAS: 1679-47-6). Otras lactonas no son adquiribles, sin embargo pueden prepararse de acuerdo con procedimientos descritos en la bibliografía. Así se divulga por ejemplo en el documento WO 94/12487 A1 la preparación de α -aril- γ -butirolactonas. Para ello se hace reaccionar un anión del malonato de acuerdo con la fórmula

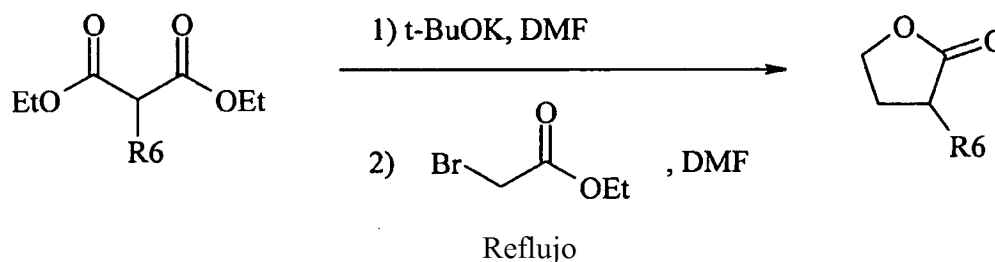


con un compuesto de etileno de fórmula Y-CH₂-CH₂-OZ, en la que Y representa un grupo saliente tal como un halógeno, tosilato o mesilato y Z un grupo protector, obteniéndose el compuesto

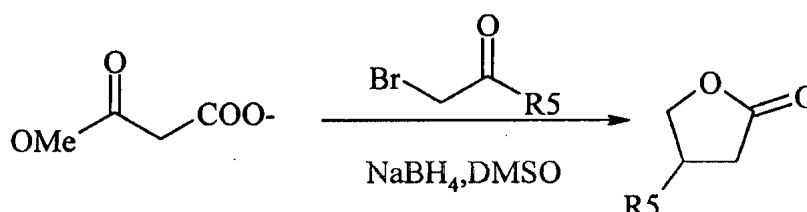


que con hidrólisis da como resultado la lactona deseada.

Otros procedimientos que parten igualmente de malonatos se han descrito en B. Hoefgen *et al.*, J. med. Chem., 2006, 49,760-769 o B. M. Nilsson *et al.*, J. med. Chem. 1992, 35, 285-294. Las butirolactonas con un sustituyente R6 \neq H pueden prepararse por ejemplo de acuerdo con el siguiente esquema:



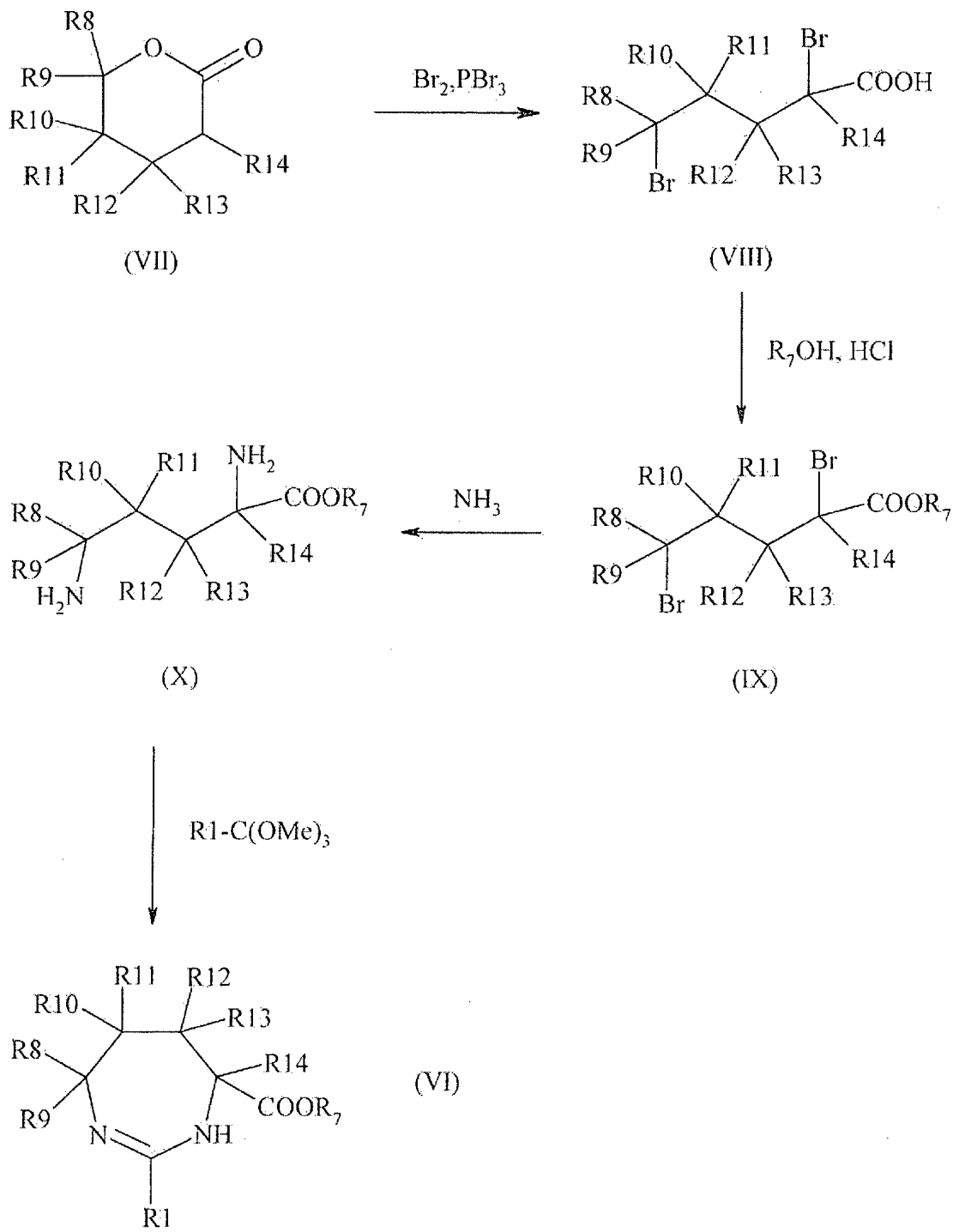
La preparación de butirolactonas con R5 \neq H es posible por ejemplo de acuerdo con el siguiente esquema:



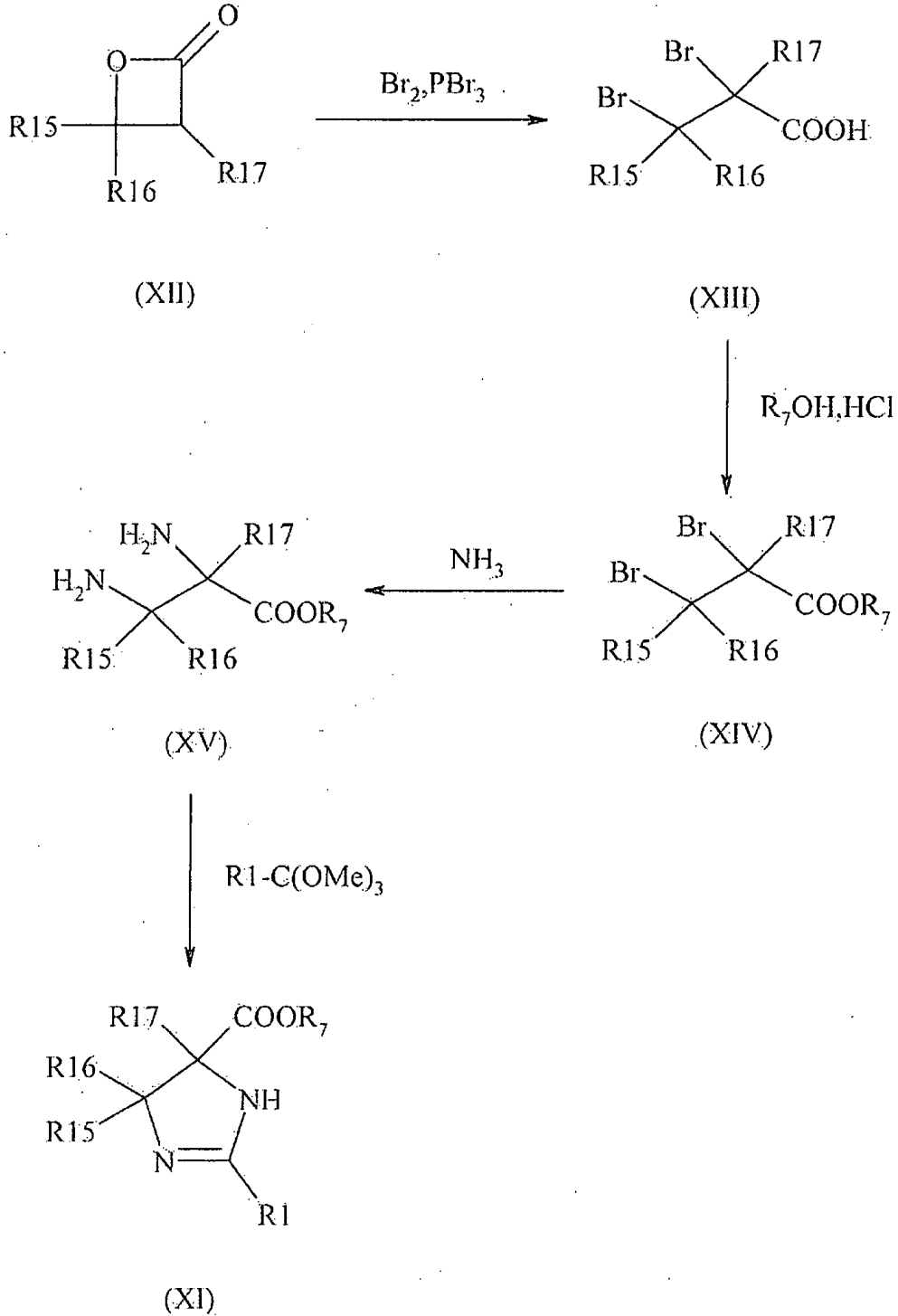
Otros ejemplos pueden deducirse de S. Schulz, Liebigs Ann. Chem. 1992, 8, 829-834.

De manera análoga pueden prepararse no sólo amidinas cíclicas con un anillo de 6 miembros, sino también aquéllas con un anillo de 5 o 7 miembros, cuya estructura base corresponde a la de DHMICA o bien homoctoína. El orden de reacción coincide con el descrito anteriormente, sin embargo no se parte de una γ -butirolactona, sino de una β - o bien δ -lactona. Ésta se broma a su vez y posteriormente se esterifica. Los átomos de bromo se sustituyen por grupos amino, a continuación se realiza el cierre de anillo mediante reacción con un ortoéster, imidato o tioimidato, estando conectada previamente al cierre de anillo a su vez la obtención de un enantiómero del compuesto de diamino (véase a continuación). Las condiciones de reacción son en gran parte equivalentes, sin embargo el rendimiento en el cierre de anillo para dar el anillo de 7 miembros es de acuerdo con la experiencia peor, lo que ha de atribuirse esencialmente a la tensión de anillo más grande. Se obtiene de esta manera el anillo de 5 miembros XI o bien el anillo de 7 miembros VI. Los esquemas de reacción están representados a continuación:

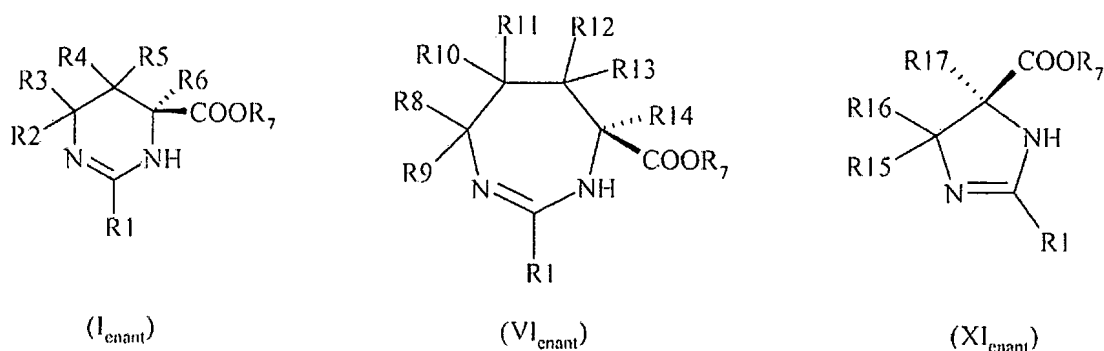
Síntesis del derivado de homoctoína VI (R1, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxialquilo o ariltioalquilo):



Síntesis del derivado de DHMICA XI (R1, R7, R15, R16, R17 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxialquilo, alquiltioalquilo, ariloxialquilo o ariltioalquilo):



De acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención se obtienen las amidinas cíclicas en forma enantioméricamente pura. Por consiguiente se trata de los compuestos



A este respecto puede tratarse en particular del enantiómero L, de modo que por ejemplo la ectoína preparada de manera sintética corresponde a la L-ectoína natural.

5 Para la preparación de una amidina cíclica en forma enantioméricamente pura se procede de modo que se obtiene el compuesto de diamino V, X o bien XV en forma enantioméricamente pura y a continuación se hace reaccionar, tal como se ha descrito anteriormente, con un ortoéster, imidato o tioimidato para dar la amidina cíclica de fórmula I, VI o XI. A este respecto permanece el centro de quiralidad que se encuentra en el compuesto de diamino.

10 El compuesto de diamino se acila en primer lugar en las dos funciones amino, a continuación se realiza una monodesacilación estereoselectiva con ayuda de una aminoacilasa. Únicamente un enantiómero del compuesto de diamino diacilado se desacila a este respecto en una función amino, mientras que el otro enantiómero permanece acilado en las dos funciones amino. Las enzimas adecuadas para ello, en particular aquéllas que hidrolizan únicamente el enantiómero L de un aminoácido, se conocen de manera suficiente. De los dos grupos amino acilados se desacila a este respecto sólo el grupo amino en la posición α con respecto al grupo carboxilo. Resulta tras la reacción con la aminoacilasa, por consiguiente, una mezcla del compuesto de monoacilo de un enantiómero y del compuesto de diacilo del otro enantiómero.

15 A continuación debe separarse el compuesto de diacilo del enantiómero indeseado. El compuesto de monoacilo que queda del enantiómero deseado se hidroliza entonces para dar el compuesto de diamino libre V, X o bien XV. Se encuentra ahora tan solo un enantiómero del compuesto de diamino, que se designa a continuación como V_{enant}, X_{enant} o bien XV_{enant}. La reacción posterior para dar el compuesto enantioméricamente puro deseado I_{enant}, VI_{enant} o XI_{enant} se realiza tal como se ha descrito anteriormente. Todas las realizaciones para la preparación de las amidinas cíclicas se aplican por tanto básicamente también para el uso del compuesto de diamino V, X o XV como enantiómero. Siempre que se hable del uso de un enantiómero, puede encontrarse la pureza óptica también por debajo del 100 %, sin embargo es importante que esté enriquecido claramente un enantiómero con respecto al otro enantiómero.

25 En el caso de la acilación del compuesto de diamino V, X o XV se trata en particular de una acetilación. La acilación puede realizarse con agentes de acilación habituales, por ejemplo con ayuda de un anhídrido de ácido carboxílico, de un cloruro de ácido carboxílico o de un bromuro de ácido carboxílico. Igualmente pueden usarse imidazolidas o tiolésteres de ácido carboxílico tal como 2-piridintioléster. Además se conocen en el estado de la técnica otros procedimientos para activar el grupo acilo de un ácido carboxílico de modo que pueda realizarse una reacción con una función amino para dar la amida, por ejemplo la reacción con dicitlohexilcarbodiimida (DCC), iones 2-cloropiridinio o 3-clorooxazolío etc. Se prefiere especialmente en el caso de la acetilación el uso de anhídrido acético. Esto se realiza de manera habitual en medio alcalino.

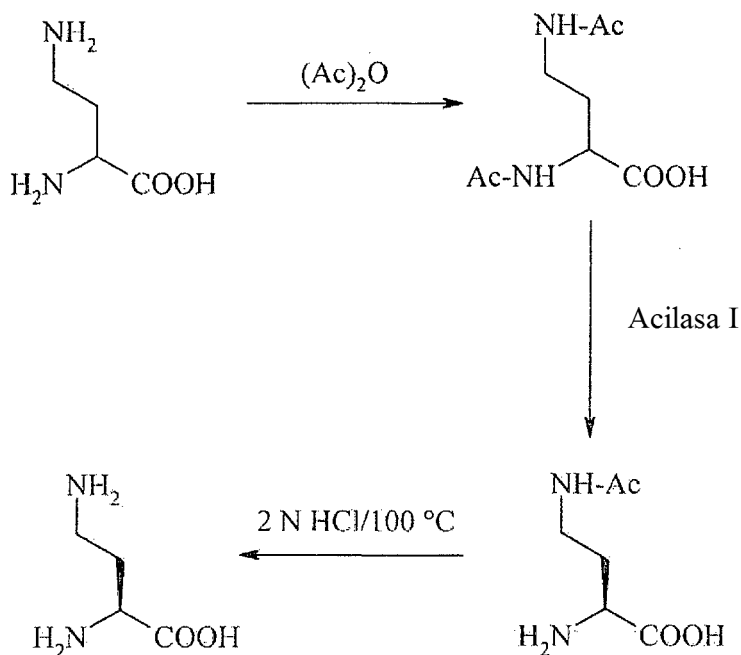
35 La monodesacilación selectiva se realiza usando una aminoacilasa. Estas enzimas que pertenecen a la familia de las hidrolasas pueden disociar el grupo N-acilo en la función amino de un aminoácido, y concretamente de manera selectiva sólo en un enantiómero. En la mayoría de los casos se realiza la disociación sólo en el enantiómero L del aminoácido, en el caso del cual se trata del enantiómero que existe principalmente en la naturaleza, mientras que el enantiómero D no se ve afectado. Las aminoacilasas de este tipo se designan por tanto también como N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa. Se prefiere especialmente el uso de la acilasa I, en particular de la acilasa I de *Aspergillus*. Esta acilasa puede disponerse comercialmente, por ejemplo por la empresa Fluka y se comercializa también en forma inmovilizada sobre Eupergit. Adicionalmente se disocia mediante la acilasa I de *Aspergillus* de manera selectiva sólo el grupo acilo en la función amino en la posición α con respecto al grupo carboxilo, mientras que por ejemplo en el caso del ácido N^α,N^γ-diacetil-diaminobutírico no se ve afectado el grupo acilo en la función γ -amino.

45 Sin embargo se conoce también D-aminoacilasas, que disocian selectivamente sólo el grupo N-acilo en el enantiómero D de un aminoácido (véase por ejemplo C. S. Hsu *et al.*, Protein Sci., 2002, 11, 2545 - 2550). Con el uso de una acilasa de este tipo permanece diacilado correspondientemente el enantiómero L y puede separarse. De esta manera, el procedimiento de acuerdo con la invención facilita una vía para dar correspondientes enantiómeros D de las amidinas cíclicas que van a sintetizarse, en particular también para dar la D-ectoína, D-homoectoína y D-

DHMICA.

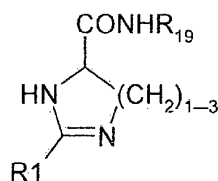
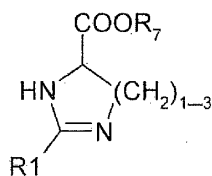
La separación del enantiómero diacilado, no deseado del compuesto de diamino puede realizarse a través de un intercambiador de cationes. Para ello se acidifica la solución tras el tratamiento con la aminoacilasa y el intercambiador de cationes se lava con agua. A continuación, en el medio alcalino, por ejemplo con una solución de NH_3 , puede eluirse el enantiómero deseado.

Para liberar a continuación también la segunda función amino (en la posición γ , δ o β) del grupo acilo se usa un procedimiento convencional de la hidrólisis de amida, en particular mediante uso de un ácido o de una base. Se prefiere la separación del grupo acilo en medio ácido, por ejemplo mediante adición de HCl. La ruta total para la obtención de un enantiómero de un compuesto de diamino está representada a continuación por medio del ácido 2,4-diaminobutírico. Éste puede obtenerse comercialmente, sin embargo puede obtenerse también a través del procedimiento de acuerdo con la invención, en el que tras la preparación del compuesto de diamino debe realizarse una hidrólisis de la función éster.



Preferentemente se trata en el caso de los restos R1 a R17 de H, alquilo C1 a C6 o arilo. En la mayoría de los casos es a este respecto en cada caso al menos un sustituyente de los pares de sustituyentes R2-R3, R4-R5, R8-R9, R10-R11, R12-R13 y R15-R16 = H. Con frecuencia se encuentra una sustitución únicamente en una de las posiciones R1 a R17, mientras que los otros restos en cada caso representan un átomo de H.

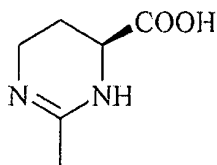
Además del procedimiento de acuerdo con la invención se refiere la invención también a amidinas cíclicas de fórmula general



así como sales derivadas de las mismas con R1 = H o metilo, en las que R7 o bien R19 es un resto alquilo C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇ o C₁₈. Ha de esperarse que las amidinas cíclicas correspondientes presentan

una utilidad similar en el campo médico, cosmético o biológico que ectoína o hidroxiectoína. A esto pertenecen el uso como principio activo en el cuidado de la piel y como protección solar, la estabilización de células, proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas. Además pueden mencionarse la protección de células, en particular células de la piel frente a factores de estrés tal como calor, frío, radiación UV y sequedad. Con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención puede prepararse casi cualquier derivado de ectoína, homoectoína y DHMICA funcionalizado de otra manera, cuyas propiedades pueden adaptarse según la necesidad. Así es posible por ejemplo incorporar en las estructuras objetivo I, VI y XI cadenas de alquilo más largas para aumentar la lipofilia del producto. Esto puede mejorar a su vez la utilidad en productos cosméticos. Si bien la propia ectoína es excelentemente soluble en agua, lo que se explica ya mediante su función como soluto compatible, en el que se enriquece ectoína en alta concentración en el citosol, sin embargo está limitada la solubilidad en entornos mucho más lipófilos. Debido a que el procedimiento de acuerdo con la invención abre en este caso una gran diversidad de posibilidades para la funcionalización, puede ajustarse según la necesidad la solubilidad del derivado de ectoína.

Además se refiere la invención también a amidinas cíclicas en forma enantioméricamente pura, tal como pueden prepararse según el procedimiento modificado, descrito anteriormente. La amidina cíclica se encuentra por consiguiente preferentemente como enantiómero L, sin embargo es concebible también la presencia como enantiómero D, que se diferencia en cuanto a la estereoquímica de la ectoína natural. La enantiomería se refiere al centro de quiralidad en la posición α con respecto al grupo carboxilo. El enantiómero L es a este respecto el enantiómero que corresponde en su estereoquímica a la ectoína natural (ácido (S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidro-4-pirimidincarboxílico), habiéndose de considerar que la ectoína se encuentra con valor de pH neutro como zwitterión.



20

Los siguientes ejemplos sirven para la explicación adicional de la invención:

Ejemplo 1: Síntesis de 2,4-dibromobutirato de metilo (éster metílico de ácido 2,4-dibromobutírico)

Se añadieron gota a gota lentamente 25 ml de bromo a una mezcla calentada de tribromuro de fósforo (0,83 ml) y γ -butirolactona (42 g, 0,49 mol) a una temperatura de 100 a 115 °C. A continuación se calentó la mezcla durante otros 30 min. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, se añadieron cuidadosamente 83 ml de metanol y se introdujo HCl gaseoso. La solución obtenida se calentó durante 48 h hasta 50 °C. Los componentes volátiles se extrajeron, el aceite que queda se diluyó con dietiléter y se lavó dos veces con solución acuosa al 3 % de hidrogenocarbonato de sodio y solución de NaCl. Las soluciones de lavado se extrajeron de nuevo con dietiléter y las fases orgánicas combinadas se concentraron a vacío. La destilación con 0,03 kPa (0,2 Torr) dio como resultado el producto 2,4-dibromobutirato de metilo en forma de un líquido incoloro (100,4 g, 80 %).

30

Ejemplo 2: Síntesis de éster metílico de ácido 2,4-diaminobutírico

A - 40 °C se condensaron en un matraz 150 ml de amoníaco y se diluyeron con 150 ml de dietiléter libre de agua. A esta solución se añadieron lentamente 100 g de éster metílico de ácido 2,4-dibromobutírico (0,385 mol) en 100 ml de dietiléter libre de agua. A - 40 °C se agitó posteriormente durante 2 horas, a continuación se calentó lentamente hasta temperatura ambiente. Tras agitar durante la noche se separó por filtración el bromuro de amonio y se extrajo el disolvente. Se obtuvieron 43,3 g (85 %) de éster metílico de ácido 2,4-diaminobutírico.

35

Ejemplo 3: Síntesis de éster metílico de 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-pirimidin-4-carboxílico

Una solución de 2,4 g (0,018 mol) de éster metílico de ácido 2,4-diaminobutírico y 3,77 g de éster trimetílico de ácido ortoacético en 50 ml de metanol secado se calentaron durante 24 h en reflujo. La solución se concentró hasta sequedad y se recristalizó el producto en metanol/acetato de etilo. Se obtuvieron 1,12 g (7,2 mmol, 40 %) de éster metílico de ácido 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-pirimidin-4-carboxílico.

40

Ejemplo 4: Síntesis de ácido L-2,4-diaminobutírico

1) Ácido *N*^α,*N*^β-diacetil-D,L-diaminobutírico

A una solución de ácido D,L-2,4-diaminobutírico (955 mg; 5 mmol) en 7,5 ml de NaOH 2 N se añadió con agitación y enfriamiento con hielo en 5 porciones anhídrido acético (1,42 ml; 15 mmol) y 7,5 ml de NaOH 2 N. Con 1,5 ml adicionales de NaOH 2 N se ajustó el valor de pH a 7,5. Tras 1 h en hielo se acidificó con 2 ml de HCl al 37 % hasta obtener un pH 3 y se extrajo la fase acuosa 2 x con en cada caso 50 ml de n-butanol/acetato de etilo (2:1). Tras la concentración de la fase orgánica a vacío hasta obtener un volumen pequeño se precipitó con metil-*tert*-butiléter. Se obtuvieron 800 mg (79 %) de ácido *N*^α,*N*^β-diacetil-D,L-diaminobutírico como sólido incoloro. DC: $R_f = 0,6$ en acetónitrilo/agua/ácido acético (30:10:5); ESI-MS: $m/z = 203,05 [M+H]^+$; $M_r = 202,21$ calc. para $C_8H_{14}N_2O_4$

50

2) Ácido N^ε-acetil-L-diaminobutírico

5 Se mezcló ácido N^ε,N^ε-diacetil-D,L-diaminobutírico (404 mg; 2 mmol) en 20 ml de tampón fosfato de Sörensen (1/15 molar) con pH 7,6 con 28 mg de acilasa I de *Aspergillus* (Fluka, 0,72 U/mg de enzima; corresponde a 10 U/1 mmol de sustrato) y se incubó durante 20 h en un baño de agua a 40 °C. La enzima se separó por medio de filtro de membrana Amicon Ultra-4 (límite de exclusión 10 kD) y se ajustó la solución con HCl 1 N hasta pH 2,5.

10 Tras la función en 50 ml de intercambiador de cationes Dowex 50Wx8 (50 - 100 de malla) se lavó con agua hasta obtener un pH 5 (separación del compuesto de diacetilo) y a continuación se eluyó el producto deseado con amoníaco 1 N. El material eluído se concentró a vacío, produciéndose inmediatamente cristales incoloros de ácido N^ε-acetil-L-diaminobutírico. Rendimiento: 140 mg (88 % del rendimiento al 50 % esperado); DC: R_f = 0,3 en acetoniitrilo/agua/ácido acético (30:10:5); ESI-MS: m/z = 161,10 [M+H]⁺; M_r = 160,17 calc. para C₆H₁₂N₂O₃

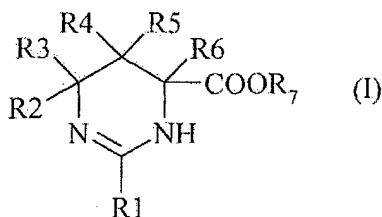
3) Ácido L-diaminobutírico

15 Se agitó ácido N^ε-acetil-L-diaminobutírico (140 mg; 0,87 mmol) en 10 ml de HCl 2 N con reflujo. Tras concentración a vacío se disolvió el residuo cristalino a ser posible en poca agua y se precipitó con 4 ml de etanol absoluto caliente. El ácido L-diaminobutírico se produjo como monoclorhidrato de manera incolora. Rendimiento: 125 mg (93 %); DC: R_f = 0,1 en acetoniitrilo/agua/ácido acético (30:10:5); ESI-MS: m/z = 119,08 [M+H]⁺; M_r = 118,14 calc. para C₄H₁₀N₂O₂; M_r = 154,60 calc. para C₄H₁₀N₂O₂ x HCl; [α]_D²⁰ = + 24,4 ° (c = 1,2 en HCl 6 N); Lit. (Beilstein, 4/IV, 2613): [α]_D²¹ = + 23,8 ° (c = 1 en HCl 6 N); catálogo de Fluka: [α]_D²⁰ = 24 ± 2 ° (c = 1 en HCl 6 N). La pureza enantiomérica del aminoácido se comprobó por medio de derivatización con reactivo de Marlfey (J. G. Adamson *et al.*, Anal. Biochem., 1992, 202, 210 - 214) y posterior HPLC. Condiciones: columna ET 125/4 Nucleosil 100-5 C8 (Macherey y Nagel, Düren); gradiente lineal de eluyente A (1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en H₂O) a eluyente B (0,8 % de TFA en acetoniitrilo); R_t = 15,6 min.

20

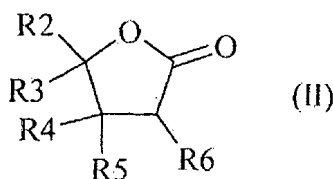
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de amidinas cíclicas de fórmula general I

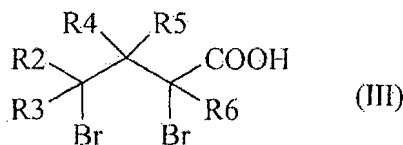


5 en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxilalquilo o ariltioalquilo con las siguientes etapas:

- bromación de una lactona de fórmula general II

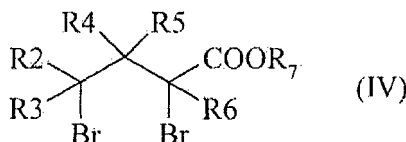


para dar el compuesto de dibromo de fórmula general III

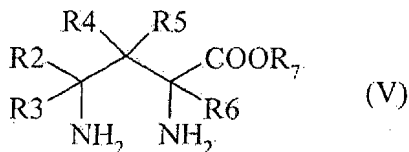


10

- esterificación del compuesto de dibromo III para dar el compuesto IV



- aminación del compuesto de dibromo IV para dar el compuesto de diamino V



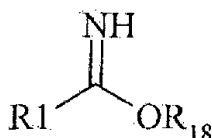
15

- obtención de un enantiómero del compuesto V mediante las subetapas

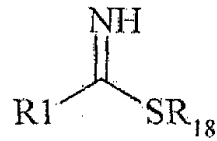
- acilación del compuesto V en las dos funciones amino para dar el compuesto de diacilo
- monodesacilación estereoselectiva de un enantiómero del compuesto de diacilo en la posición α mediante el uso de una aminoacilasa para dar el compuesto de monoacilo
- separación del compuesto de diacilo que no se ha desacilado
- hidrólisis del compuesto de monoacilo para dar el enantiómero del compuesto V

20

- reacción del enantiómero del compuesto V con un ortoéster de fórmula general R1-C(OR18)₃, en la que R1 tiene el significado indicado anteriormente y R18 = alquilo, en particular alquilo C₁ - C₆, o un imidato de fórmula general

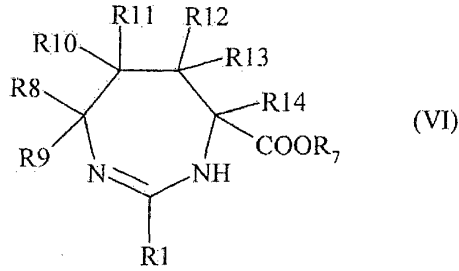


en la que R1, R18 tienen el significado indicado anteriormente, o un tioimidato de fórmula general



en la que R1, R18 tienen el significado indicado anteriormente, para dar la amidina cíclica de fórmula general I.

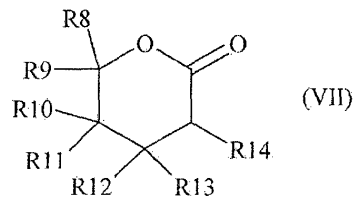
2. Procedimiento para la preparación de amidinas cíclicas de fórmula general VI



5

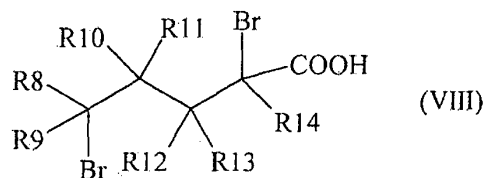
en la que es R1, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxialquilo o ariltioalquilo con las siguientes etapas:

- bromación de una lactona de fórmula general VII

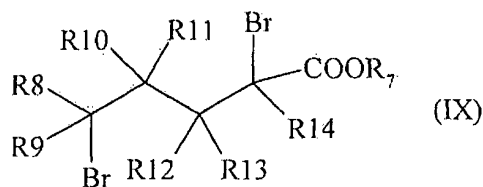


10

para dar el compuesto de dibromo de fórmula general VIII

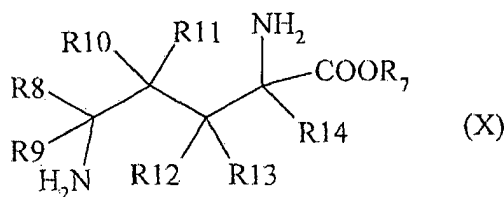


- esterificación del compuesto de dibromo VIII para dar el compuesto IX



15

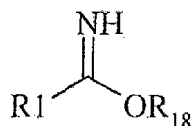
- aminación del compuesto de dibromo IX para dar el compuesto de diamino X



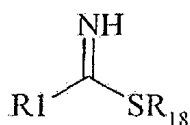
- obtención de un enantiómero del compuesto X mediante las subetapas

- acilación del compuesto X en las dos funciones amino para dar el compuesto de diacilo
- monodesacilación estereoselectiva de un enantiómero del compuesto de diacilo en la posición α mediante uso de una aminoacilasa para dar el compuesto de monoacilo
- separación del compuesto de diacilo que no se ha desacilado
- hidrólisis del compuesto de monoacilo para dar el enantiómero del compuesto X

5 - reacción del enantiómero del compuesto X con un ortoéster de fórmula general $R1-C(OR_{18})_3$, en la que R1 tiene el significado indicado anteriormente y $R_{18} =$ alquilo, en particular alquilo $C_1 - C_6$, o un imidato de fórmula general

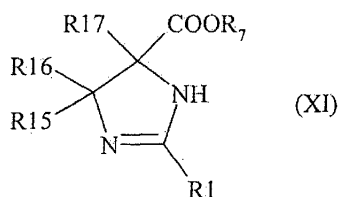


10 en la que R1, R_{18} tienen el significado indicado anteriormente, o un tioimidato de fórmula general



en la que R1, R_{18} tienen el significado indicado anteriormente, para dar la amidina cíclica de fórmula general VI.

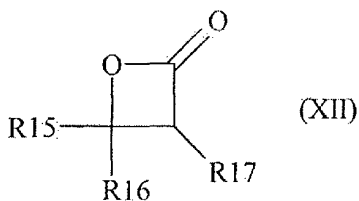
3. Procedimiento para la preparación de amidinas cíclicas de fórmula general XI



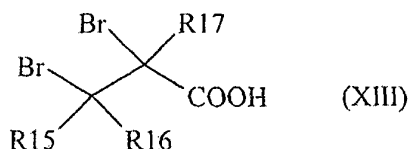
15 en la que R1, R_7 , R15, R16, R17 = H, alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, alcoxilalquilo, alquiltioalquilo, ariloxilalquilo o ariltioalquilo

con las siguientes etapas:

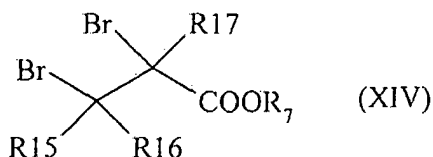
- bromación de una lactona de fórmula general XII



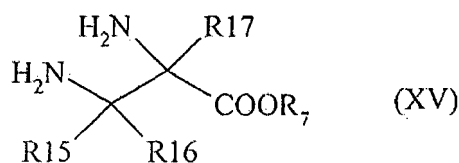
20 para dar el compuesto de dibromo de fórmula general XIII



- esterificación del compuesto de dibromo XIII para dar el compuesto XIV



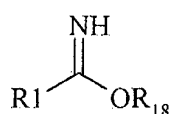
- aminación del compuesto de dibromo XIV para dar el compuesto de diamino XV



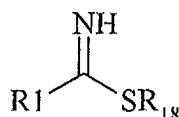
- obtención de un enantiómero del compuesto XV mediante las subetapas

- 5
- acilación del compuesto XV en las dos funciones amino para dar el compuesto de diacilo
 - monodesacilación estereoselectiva de un enantiómero del compuesto de diacilo en la posición α mediante el uso de una aminoacilasa para dar el compuesto de monoacilo
 - separación del compuesto de diacilo que no se ha desacilado
 - hidrólisis del compuesto de monoacilo para dar el enantiómero del compuesto XV

10 - reacción del enantiómero del compuesto XV con un ortoéster de fórmula general $R1-C(OR18)_3$, en la que R1 tiene el significado indicado anteriormente y R18 = alquilo, en particular alquilo $C_1 - C_6$, o un imidato de fórmula general



en la que R1, R18 tienen el significado indicado anteriormente, o un tioimidato de fórmula general



en la que R1, R18 tienen el significado indicado anteriormente, para dar la amidina cíclica de fórmula general XI.

15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se hidroliza la función éster de los compuestos V, X o XV antes de la etapa de la reacción con el ortoéster, el imidato o el tioimidato.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la aminación del compuesto de dibromo IV, IX o XIV se realiza mediante reacción con una azida y posterior hidrogenación o mediante reacción con NH_3 .

20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** R1-17 = H, alquilo C_1 a C_6 o arilo.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** en cada caso al menos un sustituyente de los pares de sustituyentes R2-R3, R4-R5, R8-R9, R10-R11, R12-R13 y R15-R16 = H.

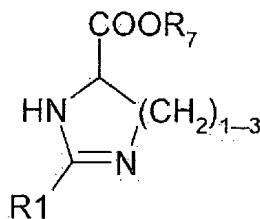
25 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la función ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico $COOR_7$ se transforma en una función amida de ácido carboxílico $CONR_{19}R_{20}$, en la que R19 y R20 = H o alquilo.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el enantiómero es el enantiómero L.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el grupo acilo es un grupo acetilo.

30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** la aminoacilasa es acilasa I de *Aspergillus*.

12. Amidina cíclica de fórmula

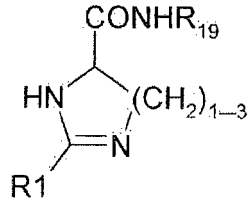


así como sus sales

con R1 = H o metilo, en la que R7 es un resto alquilo $C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}$ o C_{18} .

13. Amidina cíclica según la reivindicación 12, **caracterizada porque** la amidina se encuentra como enantiómero L o D.

14. Amidina cíclica de fórmula



5 así como sus sales
con R₁ = H o metilo, en la que es R₁₉ = resto alquilo C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇ o C₁₈.