



- (51) Classification internationale des brevets :  
C07D 233/84 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2015/051416
- (22) Date de dépôt international :  
29 mai 2015 (29.05.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
1454935 30 mai 2014 (30.05.2014) FR
- (71) Déposant : TETRAHEDRON [FR/FR]; 14, Avenue de l'Opéra, 75001 Paris (FR).
- (72) Inventeurs : ERDELMEIER, Irène; c/o Tetrahedron, 14, avenue de l'Opéra, 75001 Paris (FR). DAUNAY, Sylvain; c/o Tetrahedron, 14, Avenue de l'Opéra, 75001 Paris (FR).
- (74) Mandataire : CHAILLOT, Geneviève; Cabinet Chaillot, 16/20 Avenue de l'Agent Sarre, B.P. 74, 92703 Colombes Cedex (FR).

- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

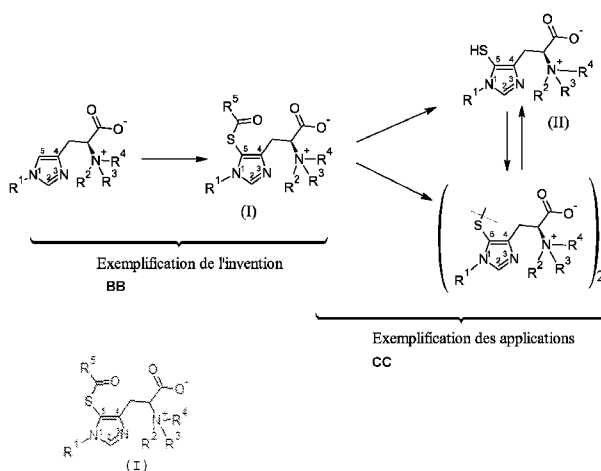
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : NOVEL COMPOUNDS OF THE 5-ACYLSULFANYL-HISTIDINE TYPE AS PRECURSORS OF THE CORRESPONDING 5-SULFANYLHISTIDINES AND THE DISULFIDES THEREOF

(54) Titre : NOUVEAUX COMPOSES DE TYPE 5-ACYLSULFANYL-HISTIDINE EN TANT QUE PRECURSEURS DES 5-SULFANYLHISTIDINES CORRESPONDANTES ET DE LEURS DISULFURES

Figure 1 : Schéma de synthèse des nouveaux composés 5-acylsulfanyl-histidines en tant que précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures



AA Diagram for the synthesis of novel 5-acylsulfanyl-histidine compounds as precursors of the corresponding 5-sulfanylhistidines and the disulfides thereof

BB Exemplification of the invention

CC Exemplification of the applications

(57) Abstract : The invention relates to a compound of the 5-acylsulfanyl-histidine type and the derivatives thereof, of general formula (I), wherein R1 to R3 = H, alkyl, especially CH3; R4 = H, alkyl, especially CH3, alkyle(C=O), substituted alkyl (C=O), aryl (C=O);  $\beta$ -alanyle (H2NCH2CH2 (C=O));  $\alpha$ -amino-acyl; R5 = alkyl, especially methyl, phenyl. The invention also relates to the use of said compound for producing compounds of the 5-sulfanyl-histidine type and the derivatives thereof, in addition to corresponding disulfides; and to the various methods for the production thereof.

(57) Abrégé : L'invention concerne un composé de type 5-acylsulfanyl-histidine et ses dérivés répondant formule générale (I) suivante: (I). Dans laquelle: R1 à R3 = H, alkyle, en particulier CH3; R4 = H, alkyle, en particulier CH3, alkyle(C=O), alkyle substitué (C=O), aryle(C=O);  $\beta$ -alanyle (H2NCH2CH2 (C=O));  $\alpha$ -amino-acyle; R5 = alkyle, en particulier méthyle, phényle. L'invention concerne aussi l'utilisation de ce composé pour préparer des composés type 5-sulfanyl-histidine et ses dérivés, ainsi que des disulfures correspondants; et leurs divers procédés de préparation.

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

NOUVEAUX COMPOSES DE TYPE 5-ACYLSULFANYL-HISTIDINE EN TANT  
QUE PRECURSEURS DES 5-SULFANYLHISTIDINES CORRESPONDANTES ET  
DE LEURS DISULFURES

5 La présente invention a pour objet :  
- de nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-  
histidine (et leurs dérivés) ;  
- leurs procédés de préparation ;  
- leur utilisation en tant que précurseurs des 5-  
10 sulfanylhistidines correspondantes et de leurs  
disulfures.

La présente invention concerne de nouveaux  
composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs  
15 dérivés, ainsi que leurs modes de préparation et leur  
utilisation en tant que précurseurs des 5-  
sulfanylhistidines correspondantes et de leurs  
disulfures. Plus particulièrement, cette invention  
relate la synthèse de nouveaux composés de type 5-  
20 acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés, de leurs sels  
en tant que précurseurs directs des 5-  
sulfanylhistidines correspondantes et de leurs  
disulfures. La nomenclature récente IUPAC « sulfanyl »  
pour le groupement « -SH » est appliquée pour les  
25 composés décrits dans l'invention au lieu des  
différents termes utilisés auparavant dans la  
littérature tels que « thiohistidine »,  
« thiolhistidine » ou « mercaptohistidine ».

30 ETAT DE LA TECHNIQUE

Le groupement 5-sulfanyl-imidazole est rarement  
retrouvé dans la Nature (Caroll A. et Avrey V.M. ; J.  
Nat. Prod. ; 2009 ; 72 ; 696-699). Très peu de produits  
35 naturels comportant un squelette 5-sulfanyl-histidine  
(méthylé ou non en position 3 du noyau imidazole) ont  
été mis en évidence à ce jour (Hand C.E. et Honek J.F. ;

J. Nat. Prod.; 2005 ; 68 ; 293-308). Ils sont d'origine bactérienne ou marine pour la plupart. Un premier exemple est constitué par le groupe des adénochromines A, B et C (Ito S. et Prota G. ; JCS Chem. Comm. ; 5 1977 ; 251-252 ; Rossi F., Nardi G., Palumbo A. et Prota G. ; Comp. Biochem. Physiol. 1985, 80b, 843-845) et des séco-adénochromines A, B et C (Ito S., Nardi G. et Prota G. ; JCS Chem. Comm. ; 1976 ; 1042). L'imbricatine, produite par *Dermasterias imbricate*, 10 constitue un second exemple (Pathirana C. et Andersen R.J. ; J. Am. Chem. Soc. ; 1986 ; 108, 8288-8289). Les ovothiols A, B et C (Turner E., Klevit R.E. et Shapiro B.M. ; J. Biol. Chem. ; 1986 ; 261 ; 13056) constituent un troisième exemple du groupe encore plus restreint de 15 produits naturels comportant un squelette 5-sulfanyl-histidine méthylé en position 3 (A noter que la position du groupement méthyle a été, initialement, faussement localisée sur l'azote N1 de l'histidine, comme ceci a été démontré dans Holler et al. JOC 1987, 20 4421-4423 vs. Palumba et al., THL 1982, 3207-3208). Très récemment un nouvel alcaloïde indolique, contenant un squelette 5-sulfanyl-histidine, la leptoclinidamine C a été mis en évidence (Caroll A. et Avrey V.M. ; J. Nat. Prod. ; 2009 ; 72 ; 696-699).

25

La biosynthèse des ovothiols A, B et C a été décrite (Vogt R.N., Spies H.S.C. et Steenkamp D.J. ; Eur. J. Biochem. ; 2001, 268, 5229-5241). L'introduction du soufre, en position 5 du noyau 30 imidazole de la L-histidine, est réalisée en présence de l'enzyme sulfoxyde synthase (OvoA), ainsi que de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et d'oxygène  $O_2$ . La L-cystéine est utilisée comme donneur de soufre pour aboutir à un intermédiaire sulfoxyde (Braunshausen A. et Seebeck 35 F. ; JACS ; 2011 ; 133, 1757). Ce dernier est ensuite transformé en ovothiol A, B ou C en présence de l'enzyme sulfoxyde lyase et de phosphate de pyridoxal,

son cofacteur (Mashabela G. et Seebeck F. ; JCS Chem. Comm. ; 2013, 7714-7716).

La préparation de la 2-sulfanylhistidine et de ses dérivés par synthèse chimique a déjà été documentée par la Demanderesse (brevet US 13/121,891 et brevet US 13/500,887 A1).

La préparation de la 5-sulfanylhistidine et de ses dérivés par synthèse chimique s'est avérée beaucoup plus difficile que celle de leurs isomères 2-sulfanylhistidines. Plusieurs stratégies de synthèse ont été envisagées et testées sans succès. A ce jour, seules 2 voies d'accès ont permis d'aboutir uniquement à la série des 5-sulfanyl-3-méthyl-histidines. La première approche a consisté en la synthèse *de novo* du noyau 5-sulfanyl-imidazole (Hopkins P. et al. ; JOC ; 1987, 52, 2977 et 4420) dans le cadre de la synthèse des ovothiols A et C en 10 à 12 étapes. La seconde approche a consisté en une substitution nucléophile d'un noyau 5-bromo-imidazole activé par un groupement électro-attracteur carboxaldéhyde CHO (Ohba M., Nishimura Y., Kato M. et Fujii T. ; Tetrahedron ; 1999, 55, 4999-5016) dans le cadre de la synthèse de l'imbricatine. Actuellement il n'existe aucune méthode chimique non-enzymatique connue d'introduction directe d'un atome de soufre sur l'histidine ou l'un de ses dérivés en position 5 du noyau imidazole.

L'article de SPALTENSTEIN dans « the journal of organic chemistry, vol 52, N° 14, P 2977-2979, divulgue un procédé de préparation d'un composé 8 (p.2978) obtenu par cyclisation du thionoamide correspondant mais celui-ci ne peut correspondre à aucun composé de l'invention au vu des éléments techniques suivants.

De même, l'article de Heng Song dans Organic Letters, Vol 15, N° 18, 20 septembre 2013, P 4854-4857, intitulé « Regioselectivity of the oxidative C-S Bond Formation in Ergothioneine and Ovothiol Biosyntheses » divulgue un composé Ovothiol (8) (p.4855, schéma 1) mais qui ne correspond à aucun composé de l'invention au vu des éléments techniques suivants.

En effet, comme précédemment évoqué page 2 ligne 16-20, la structure initiale des Ovothiols A, B et C a été incorrectement définie dans ces deux articles de SPALTENSTEIN et Song par rapport au positionnement du groupement méthyle sur l'azote du cycle imidazole de l'histidine. Initialement faussement localisée sur l'azote N1 de l'histidine, ce groupement méthyle a été « repositionné » sur l'azote N3 comme ceci a été démontré dans Holler et al. JOC 1987,20 4421-4423 vs. Palumba et al., THL 1982, 3207-3208).

Ainsi, la structure des Ovothiols A, B et C est bien établie suite à la publication de Holler et al. (JOC 1987,20 4421-4423, déjà citée dans la demande et acceptée par la communauté scientifique d'après les exemples suivants :

Ovothiol C : voir Bailly et al., Bioorg. Med. Chem., 2003, 11, 4623-4630 figure 1 p. 4624 ;

Ovothiols A, B et C : voir De Luna et al., J. Phys. Chemistry, 2013, DOI: 10.1021/jp402514w ;

Ovothiol A : voir Mashabela et al., Chem. Comm., 2013, 49, 7714- 7716.

Comme les documents SPALTENSTEIN et Song sont basés sur la localisation erronée du méthyle en position N1, alors qu'il doit être correctement localisé en

position N3, ceci a pour conséquence que le composé 8 de SPALTENSTEIN ou de Song (avec la structure rectifiée) correspond au proviso de la formule (II) de l'invention décrite ci-après.

5 Les composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés constitueraient de très bons précurseurs de 5-sulfanylhistidine et de ses dérivés. Ces composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés n'étant pas connus, il faudrait donc pouvoir disposer  
10 d'une méthode de synthèse qui permette d'introduire directement un groupement acylsulfanyle en position 5 d'une histidine. Une telle méthode, à notre connaissance, n'a jamais été décrite jusqu'à ce jour. Cette nouvelle méthode d'introduction directe d'un  
15 groupement acylsulfanyle en position 5 de l'histidine ou de l'un de ses dérivés serait d'autant plus intéressante qu'elle pourrait être réalisée sans groupement protecteur et dans l'eau comme solvant de réaction.

20

#### BUTS DE L'INVENTION

L'un des buts de la présente invention est donc de mettre à disposition de nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés susceptibles  
25 d'être des précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures.

Un autre but de la présente invention est un procédé de préparation de ces nouveaux composés de type  
30 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés utilisant une nouvelle méthode d'introduction directe d'un groupement acylsulfanyle en position 5 d'une histidine ou de l'un de ses dérivés sans groupement protecteur et dans l'eau comme solvant.

35

Un autre but de la présente invention est l'utilisation de ces nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés en tant que précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures.

Ces buts sont atteints grâce à la présente invention qui repose sur la conception et la préparation de nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et de leurs dérivés qui s'avèrent être d'excellents précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures en utilisant une nouvelle méthode d'introduction d'un groupement acylsulfanyle. Ceci a été exemplifié par la Demanderesse.

#### DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention a donc pour but :

1) de résoudre le problème technique consistant en la fourniture de nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés, constituant ainsi des précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures;

2) de résoudre ce problème technique selon une solution qui englobe un procédé de préparation de ces nouveaux dérivés 5-acylsulfanyl-histidine en utilisant une nouvelle méthode d'introduction directe d'un groupement acylsulfanyle en position 5 du noyau imidazole d'une histidine sans groupement protecteur et dans l'eau comme solvant de réaction.

Les problèmes techniques énoncés ci-dessus sont résolus pour la première fois d'une manière simultanée par la présente invention, de façon très aisée et économique, le procédé de préparation desdits nouveaux dérivés 5-acylsulfanyl-histidine étant très simple à

mettre en œuvre tout en fournissant de bons rendements.

Selon son premier aspect, la présente invention a pour objet de nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés répondant à la formule générale (I) suivante :



(I)

Dans laquelle :

- 15  $R^1 = \text{H, alkyle, en particulier } \text{CH}_3 ;$   
 $R^2 = R^3 = \text{H, alkyle, en particulier } \text{CH}_3 ;$   
 $R^4 = \text{H, alkyle, en particulier } \text{CH}_3, \text{ alkyle}(\text{C}=\text{O}),$   
 $\text{alkyle substitué}(\text{C}=\text{O}), \text{ aryle}(\text{C}=\text{O}), \beta\text{-alanyle } (\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{C}=\text{O});$   
 $\alpha\text{-amino-acyle ;}$   
 20  $R^5 = \text{alkyle, en particulier méthyle, phényle ;}$

L'invention englobe tous les stéréoisomères, diastéréoisomères et énantiomères notamment au niveau de l'atome de carbone portant le groupement COOH, pris  
 25 isolément ou en mélange.

Elle englobe également tous les sels d'acides pharmaceutiquement acceptables desdits composés de formule générale (I).

Parmi les composés de formule générale (I), l'invention a  
 30 notamment pour objet :

- ceux caractérisés en ce que  $R^4$  représente hydrogène, ou le groupe méthyle, ou le groupe acétyle, ou le groupe benzoyle, ou le groupe  $\beta$ -alanyle ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$ ;
  - 35 - ceux préparés dans la partie expérimentale, notamment
1. la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1) ;

2. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine  
(Composé 2) ;
3. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine  
(Composé 3) ;
- 5 4. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(glyciny)-histidine  
(Composé 4)
5. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-1-méthyl-  
histidine (Composé 5)
6. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-  
10 histidine (Composé 6)
7. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(L-alanyl)-histidine  
(Composé 7)
8. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine  
(Composé 8)
- 15 9. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine  
(Composé 9) ;
10. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine  
(Composé 10) ;
11. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(benzoyl)-histidine  
20 (Composé 11) ;
12. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N( $\beta$ -alanyl)-histidine  
(Composé 12) ;
13. la L-1-méthyl-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé  
13) ;
- 25 14. la L-5-benzoylsulfanyl-histidine (Composé 14) ;
15. la L-5-benzoylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine  
(Composé 15) ;
16. la L-5-benzoylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histi-  
dine (Composé 16)
- 30 17. la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(L-phénylalanyl)-  
histidine (Composé 17).

Parmi les acides pharmaceutiquement acceptables, on  
peut citer, à titre non limitatif, les acides minéraux tels  
35 que chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique, sulfurique,  
tartrique, phosphorique ou avec les acides organiques tels  
que les acides formique, acétique, trifluoro-acétique,

propionique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcanesulfoniques tels que les acides méthane-sulfonique, trifluorométhane-sulfonique, éthane-sulfonique, arylsulfoniques tels que les acides benzène- et paratoluène-sulfonique.

Dans la formule (I) ci-dessus :

- par radical alkyle, il est entendu un groupement comportant 1 à 6 atomes de carbone linéaire ou cyclique, éventuellement ramifié,

- par radical alkyle substitué, il est entendu un groupement alkyle substitué par un ou plusieurs atomes de fluor, ou substitué par un groupement alkényle comportant une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, ou substitué par une ou plusieurs fonctions OH ou SH ou NH<sub>2</sub> ou COOH, ainsi que leurs énantiomères, et leurs diastéréoisomères.

- par radical aryle, il est entendu un groupement phényle éventuellement fluoré ou polyfluoré, et comportant éventuellement une ou plusieurs fonctions OH ou SH ou NH<sub>2</sub> ou COOH

- par radical  $\alpha$ -amino-acyle, il est entendu le radical acyle de tout amino-acide protéogénique, c'est à dire tout amino-acide entrant dans la composition des protéines retrouvées dans le monde végétal, animal, y compris l'homme.

Selon un second aspect, l'invention a également pour objet un procédé A de préparation des nouveaux composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et leurs dérivés de formule générale (I), explicité sur la Figure 1 jointe, et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

1) La réaction de l'histidine, racémique (DL) ou l'un de ses énantiomères (D ou L), ou - l'un de ses dérivés alkylé sur l'azote en position 1 du noyau imidazole, racémique (DL) ou

- l'un de ses énantiomères (D ou L),  
ou
- l'un de ses dérivés alkylé ou acylé sur l'azote de la fonction  $\alpha$ -amine, racémique (DL) ou l'un
- 5 de ses énantiomères (D ou L),  
ou
- l'un de ses dérivés alkylé sur l'azote en position 1 du noyau imidazole et alkylé ou acylé sur l'azote de la fonction  $\alpha$ -amine, racémique (DL) ou
- 10 l'un de ses énantiomères (D ou L),  
en présence de 1 à 2 équivalents d'acide minéral ou organique, avec
- a) un agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  dans un solvant protique polaire, à température comprise
- 15 entre 0-25°, puis avec
- b) un réactif soufré de type acide carbothioïque de formule alkyle  $C(=O)SH$  ou l'un de ses sels dans un solvant protique polaire,
- 2) puis éventuellement la purification par
- 20 chromatographie liquide sur colonne ou toute autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.
- Selon un mode de réalisation particulier du procédé A selon l'invention : l'agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  peut
- 25 être :
- a) du brome  $Br_2$  (en tant que réactif commercial ou préparé *in situ*); ou
  - b) du NBS ou tout dérivé N-bromo-imide et N-bromo-amide
- 30 Selon un autre mode de réalisation particulier de ce procédé A selon l'invention, le solvant protique polaire peut être de l'eau ou une solution aqueuse.
- Selon encore un mode de réalisation particulier du procédé A selon l'invention, le réactif soufré de type acide
- 35 carbothioïque peut être par exemple l'acide thioacétique; ou l'acide thiobenzoïque, ou leurs mélanges.

Selon un autre mode de réalisation particulier du procédé A selon l'invention, le réactif soufré de type sel d'acide carbothioïque peut être par exemple le thioacétate de potassium, éventuellement en mélange avec un acide carbothioïque précité.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier de ce procédé A selon l'invention, la température sera comprise entre 0-5°C.

Le caractère innovant de ce procédé A repose sur une nouvelle réaction d'introduction directe d'un groupement acylsulfanyle RC(=O)S en position 5 du noyau imidazole de l'histidine ou de l'un de ses dérivés sans utilisation de groupement protecteur et dans l'eau comme solvant de réaction. Ceci est d'autant plus surprenant que, dans les mêmes conditions opératoires, l'utilisation de la cystéine en lieu et place de l'acide carbothioïque conduit à une introduction du soufre en position 2 du noyau imidazole comme montré dans le brevet US 13/121,891 et le brevet US 13/500,887 A1.

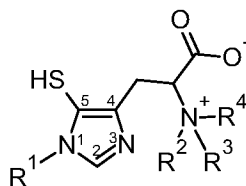
20

Selon un troisième aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation des composés 5-acylsulfanyles précités de formule (I) ou de ses dérivés, pour la préparation de composés 5-sulfanyle-histidines correspondants et leurs disulfures décrits ci-après.

25

Selon un quatrième aspect, l'invention couvre de nouveaux composés de type 5-sulfanylhistidine et leurs dérivés répondant à la formule générale (II) suivante :

30



35

(II)

Dans laquelle :

$R^1$  à  $R^4$  sont tels que définis pour les radicaux  $R^1$  à  $R^4$  de la formule (I), en particulier :  $R^1 = H$ , alkyle, en particulier  $CH_3$  ;  $R^2 = R^3 = H$ , alkyle, en particulier  
5  $CH_3$  ;

$R^4 = H$ , alkyle, en particulier  $CH_3$ , alkyle(C=O), alkyle substitué(C=O), aryle(C=O),  $\beta$ -alanyle ( $H_2NCH_2CH_2(C=O)$ ) ;  $\alpha$ -amino-acyle ;

étant entendu que lorsque  $R^1 = H$  alors  $R^2$ ,  $R^3$  et  
10  $R^4$  ne peuvent pas être simultanément H.

L'invention englobe tous les stéréoisomères, diastéréoisomères et énantiomères notamment au niveau de l'atome de carbone portant le groupement COOH, ainsi que  
15 tous les disulfures correspondants, pris isolément ou en mélange.

Elle englobe également tous les sels d'acides pharmaceutiquement acceptables desdits composés de formule générale (II).

20 Parmi les composés de formule générale (II), l'invention a notamment pour objet :

- ceux caractérisés en ce que  $R^4$  représente hydrogène, ou le groupe méthyle, ou le groupe acétyle, ou le groupe benzoyle, ou le groupe  $\beta$ -  
25 alanyle ( $H_2NCH_2CH_2(C=O)$ ) ;
- ceux préparés dans la partie expérimentale, notamment :
  1. le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 22) ;
  - 30 2. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 23) ;
  3. le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 24) ;
  4. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 25) ;
  - 35 5. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 26) ;

6. le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 27) ;
7. le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé 28) ;
- 5 8. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé 29) ;
9. la L-5-sulfanylcarnosine (Composé 30) ;
10. le disulfure de l'iso-ovothiol A (Composé 31) ;
11. l'iso-ovothiol A (Composé 32) ;
12. le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 33) ;
- 10 13. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 34) ;
14. la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(L-alanyl)-histidine (Composé 35) ;
- 15 15. le disulfure de la 5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (Composé 36).

Parmi les acides pharmaceutiquement acceptables, on peut citer, à titre non limitatif, les acides minéraux tels que chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique, sulfurique, tartrique, phosphorique ou avec les acides organiques tels que les acides formique, acétique, trifluoro-acétique, propionique, benzoïque, maléïque, fumarique, succinique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcane-25 sulfoniques tels que les acides méthane-sulfonique, trifluorométhane-sulfonique, éthane-sulfonique, aryl-sulfoniques tels que les acides benzène- et paratoluène-sulfonique.

30 Dans la formule (II) ci-dessus :

- par radical alkyle, il est entendu un groupement comportant 1 à 6 atomes de carbone linéaire ou cyclique, éventuellement ramifié,
- par radical alkyle substitué, il est entendu un 35 groupement alkyle substitué par un ou plusieurs atomes de fluor, ou substitué par un groupement alkényle comportant une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, ou

substitué par une ou plusieurs fonctions OH ou SH ou NH<sub>2</sub> ou COOH, ainsi que leurs énantiomères, et leurs diastéréoisomères.

- par radical aryle, il est entendu un groupement  
5 phényle éventuellement fluoré ou polyfluoré, et comportant éventuellement une ou plusieurs fonctions OH ou SH ou NH<sub>2</sub> ou COOH

- par radical  $\alpha$ -amino-acyle, il est entendu le radical acyle de tout aminoacide protéogénique, c'est à dire tout  
10 aminoacide entrant dans la composition des protéines retrouvées dans le monde végétal, animal, y compris l'homme.

- par disulfure, il est entendu tout composé obtenu par oxydation entre deux molécules identiques de dérivés de  
15 type 5-sulfanylhistidine décrits dans l'invention.

Les nouveaux composés de type 5-sulfanylhistidine et leurs dérivés répondant à la formule générale (II), ainsi que leurs disulfures, pourraient s'avérer être des principes actifs nutritionnels, cosmétiques ou  
20 médicamenteux.

Selon un cinquième aspect, l'invention a encore pour objet un procédé B de préparation des composés de type 5-sulfanylhistidine et de leurs dérivés de formule générale  
25 (II) obtenus à partir des composés de type 5-acylsulfanylhistidine et de leurs dérivés de formule générale (I) décrit dans le procédé A ci-dessus, et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) Soit directement (procédé B1) :  
30 a) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanylhistidine obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à température supérieure à 20°C en présence d'un thiol,  
35 b) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre

méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

2) Soit indirectement (procédé B2) :

- 5 a) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à une température supérieure à 20°C pour obtenir le disulfure correspondant,
- 10 b) puis réduction du disulfure par réaction avec un thiol,
- c) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.
- 15

Selon une mise en œuvre particulière de ce procédé B selon l'invention, le solvant protique polaire peut être de l'eau ou une solution aqueuse.

Selon une autre mise en œuvre particulière du procédé B selon l'invention, le thiol peut être par exemple l'acide mercaptopropionique ou le dithiotréitol, ou leurs mélanges. Selon encore une autre mise en œuvre particulière de ce procédé B selon l'invention, la température pourra être comprise entre 20 et 130°C.

20

Par cet aspect, la Demanderesse démontre la capacité des composés de formule générale (I) à être des précurseurs de composés de type 5-sulfanylhistidine et de leurs dérivés de formule générale (II) après hydrolyse.

25

30

Selon un sixième aspect, l'invention a également pour objet un procédé C de préparation de disulfures des 5-sulfanylhistidines et de leurs dérivés :

- 1) soit directement à partir des composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et de leurs dérivés de formule générale (I) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 35

a) hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidines de formule générale (I) obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à l'air et à une température supérieure à 20°C pour obtenir le disulfure correspondant,

b) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art ;

10

2) soit à partir de 5-sulfanylhistidines et de leurs dérivés de formule générale (II) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) oxydation par l'oxygène ou le diméthylsulfoxyde ou toute autre méthode d'oxydation bien connue de l'Homme de l'Art,

b) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

20

Par cet aspect, la Demanderesse démontre la capacité des composés de type 5-acylsulfanyl-histidines de formule générale (I) à être des précurseurs de disulfures de 5-sulfanylhistidines et de ses dérivés après hydrolyse et oxydation.

Selon un septième aspect, l'invention a également pour objet un procédé D en « one-pot » de préparation des dérivés 5-sulfanylhistidines et leurs disulfures correspondants à partir des dérivés histidines correspondants, en combinant les procédés A avec B ou avec C, et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

en présence de 1 à 2 équivalents d'acide minéral ou organique, la réaction avec :

35

- a) un agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  dans un solvant protique polaire, à température comprise entre 0-25°, puis avec
- b) un réactif soufré de type acide carbothioïque de formule alkyle  $C(=O)SH$  ou l'un de ses sels dans un solvant protique polaire,
- 5 suivie de
- 1) Soit :
- c) l'hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus dans un solvant protique polaire par agitation à température comprise entre 70 et 130°C en présence d'un thiol,
- 10 d) puis éventuellement la purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.
- 15 2) Soit :
- d) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus dans un solvant protique polaire par agitation à une température comprise entre 70 et 130°C pour obtenir le disulfure correspondant,
- 20 e) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.
- 25

#### DESCRIPTION DES FIGURES

L'invention comprend 4 Figures.

30

**Figure 1** : Schéma du procédé de synthèse des composés selon la formule générale (I)

**Figure 2** : Spectre représentatif (RMN- $H^1$ , 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 1, préparation de la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1)

35

**Figure 3** : Spectre représentatif (RMN- $H^1$ , 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 3, préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine (Composé 2)

**Figure 4** : Spectre représentatif (RMN- $H^1$ , 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 5, préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 3)

#### 10 DESCRIPTION DES EXEMPLES :

Les exemples ci-après de même que le schéma du procédé de l'invention (voir Figure 1) sont fournis simplement à titre d'illustration et ne sauraient en aucune façon limiter la portée de l'invention.

Dans les exemples, décrits ci-après, la température est soit la température ambiante soit une température donnée en degré Celsius, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

Les réactifs utilisés sont disponibles commercialement chez des fournisseurs internationaux tel que SAF (France), Alfa Aesar, Fisher Scientific, TCI Europe, Bachem (Suisse, AKOS (Allemagne) sauf les composés suivants : N-méthyl-histidine hydrochloride, N,N-diméthyl-histidine hydrochloride hydrate et L-hercynine qui ont été préparé selon les protocoles cités.

Toutes les expériences sont réalisées sous atmosphère ambiante sauf indication contraire.

Les analyses RMN- $H^1$  ont été enregistrées à 400 MHz ou à 300 MHz dans le  $D_2O$  ou un mélange  $D_2O/DCl$ , en utilisant le signal de HOD (4.79 ppm) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont notés en ppm, et la multiplicité des signaux indiqués par des symboles suivants : s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), et m (multiplet). Les constantes de couplages sont notées en hertz (Hz). Les analyses RMN- $C^{13}$  sont enregistrées à 75 MHz dans le  $D_2O$  ou  $D_2O/DCl$ . Les analyses

de masse sont obtenues par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS). Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil de la société Stuart Scientific. Les analyses HPLC ont été effectuées sur un appareil 5 Acquity (Waters), en utilisant deux types des colonnes : A. colonne Kromasil Diol 250x4,6 (5µm). La phase mobile utilisée est un mélange du solvant A (10/90 H<sub>2</sub>O/Acétonitrile + 0,05% TFA) et du solvant B (50/50 H<sub>2</sub>O/Acétonitrile + 0,05% TFA), avec un gradient variant en 10 10 minutes de 90% A à 100% B et un débit de 1,2 ml/min. B. Colonne du type Thermo Hypercarb 100x4,6 (5µm). La phase mobile utilisée est un mélange du solvant A (100% H<sub>2</sub>O + 0,2% HCOOH) et du solvant B (100% Acétonitrile + 0,2% HCOOH), avec un gradient variant en 8 minutes de 100% A à 15 40% A et un débit de 1 ml/min. La détection s'effectue avec un détecteur universel ELSD (Sedere).

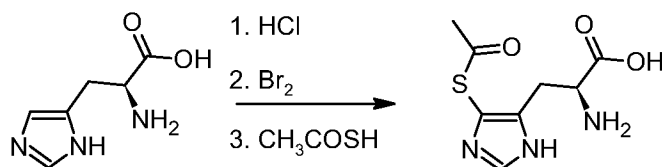
**I- Préparation des dérivés 5-acylsulfanyl-histidines en**  
20 **tant que précurseurs des 5-sulfanylhistidines et de leurs**  
**disulfures**

Dans le premier paragraphe sont donnés des exemples de préparation des dérivés 5-acylsulfanyl-histidines par 25 activation avec le dibrome ou le N-bromosuccinimide (NBS) et réaction de l'intermédiaire formé avec l'acide thioacétique.

Dans le deuxième paragraphe sont donnés des exemples d'utilisation de ces dérivés 5-acylsulfanyl, préparés 30 généralement *in situ*, en tant que précurseur de 5-sulfanylhistidines et ses dérivés.

I-1. Préparation des dérivés 5-acylsulfanyl-histidines par activation avec le dibrome ou avec le N-bromosuccinimide (NBS) et réaction avec l'acide thioacétique

Exemple 1 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1) par activation avec le dibrome et réaction avec l'acide thioacétique



Composé 1

Le chlorhydrate de la L-histidine monohydratée (52,93 g ;  
10 250 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 1,5 l d'eau déminéralisée, puis la solution est refroidie à 0°C en 30 minutes. Sous une forte agitation, le dibrome (16,7 ml ; 51,93 g; 325 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté goutte à goutte très rapidement. La solution vire au rouge. L'acide thio-  
15 acétique (73,3 ml ; 78,46 g; 1 mole; 4 éq.) est additionné très rapidement : la solution se décolore immédiatement et passe du rouge au jaune clair. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 1h.

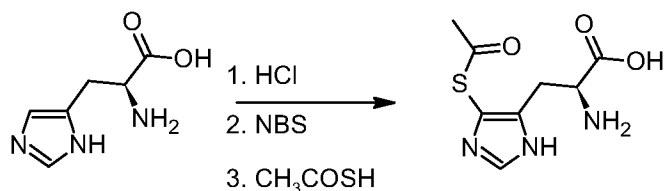
Le composé 1 est obtenu avec un rendement réactionnel de  
20 72% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN-<sup>1</sup>H.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O pH ~1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange: δ  
(ppm) = 2,57 (s, 3H); 3,38 (dd, J= 15,6 Hz et J=6,8 Hz,  
25 1H); 3,47 (dd, J=15,6 Hz, J=7,8 Hz, 1H); 4,34 (dd, J=7,8 Hz et J=6,8 Hz, 1H); 8,94 (s, 1H).

Un singulet correspondant à l'excès d'acide thio-acétique est détecté à 2,48 ppm, ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires, tel que  
30 l'acide acétique détecté à 2,0ppm. Un spectre représentatif est inclus dans la Figure 2.

LCMS (APCI): 228,0 [M-H]<sup>-</sup>

Exemple 2 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique



5

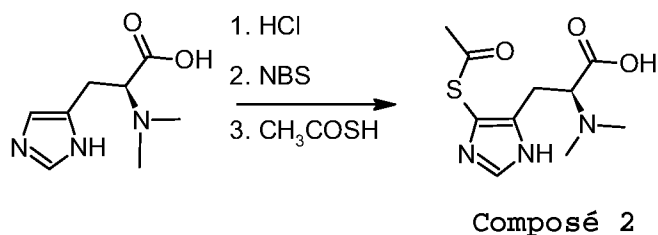
Composé 1

Le chlorhydrate de la L-histidine monohydratée (10,48 g ; 50 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 300 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentré à 37% (4,17 ml ; 4,92 g; 50 mmoles; 1 éq.) puis la solution est refroidie à 0°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (11,56 g ; 65 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté en une seule portion: le mélange devient orange limpide après 30 secondes. La température monte à 1°C. Après 2 minutes 30 secondes, l'acide thio-acétique (14,7 ml ; 15,69 g; 200 mmoles; 4 éq.) est ajouté d'un seul coup: la décoloration intervient très rapidement. La température monte à 4°C. Après refroidissement à 0°C, l'agitation est maintenue vigoureuse pendant 1h.

Le composé 1 est obtenu avec un rendement réactionnel de 75% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN-H<sup>1</sup> (dans le mélange réactionnel).

Les spectres RMN-H<sup>1</sup> et de masse sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple 1.

25 Exemple 3 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 2) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thio-acétique



Le chlorhydrate de la  $\alpha$ -N,N(diméthyl)-histidine monohydratée (6,06 g ; 25 mmoles; 1 équ.) (voir V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 11, 258-260) est dissout dans 135 ml d'eau déminéralisée. Puis une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37%, (2,1 ml ; 2,46 g ; 25 mmoles; 1 équ.) est additionnée, et la solution résultante est refroidie à 1°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (2,31 g ; 13 mmoles; 1,3 équ.) est ajouté rapidement. Après 1 minute, l'acide thioacétique (2,94 ml, 3,14 g; 40 mmoles; 4 équ.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes.

Le composé 2 est obtenu avec un rendement réactionnel de 70% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$ .

RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH  $\approx$  1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange:  $\delta$  (ppm) = 2,57 (s, 3H) ; 2,79 (s, 6H) ; 3,42 (dd, J=14,9 Hz et J=10,6 Hz, 1H) ; 3,49 (dd, J=14,9 Hz et J=4,4 Hz, 1H) ; 4,20 (dd, J=10,6 Hz et J=4,4 Hz, 1H) ; 8,92 (s, 1H).

Un singulet correspondant à l'excès d'acide thioacétique est détecté à 2,47 ppm, ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires, tel que l'acide acétique détecté à 2,0ppm. Un spectre représentatif est inclus dans la Figure 3.

Le composé 2 est purifié sur une colonne de silice utilisant un gradient acétate d'éthyle/éthanol suivi par l'élution avec de l'eau.

RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH 2-3, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,54 (s, 3H) ; 2,96 (s, 6H) ; 3,28 (dd, J=14,7 Hz et J=10,4 Hz, 1H) ; 3,39 (dd,

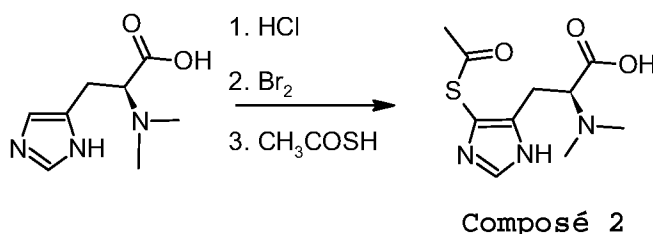
J=14,7 Hz, J=4,4 Hz, 1H) ; 3,87 (dd, J=10,4 Hz et J=4,4 Hz, 1H) ; 8,81 (s, 1H).

Un singulet de faible intensité correspondant au produit hydrolysé (composé 18b) est détecté à 8,33 ppm.

5 RMN-C<sup>13</sup> (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ (ppm) = 22,4; 30,0; 41,7; 68,4; 117,2; 134,3; 136,8; 170,9; 195,9.

LCMS (APCI): 258,9 [M+H]<sup>+</sup>

10 **Exemple 4 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 2) par activation avec le dibrome et réaction avec l'acide thioacétique**



15 Le chlorhydrate de la  $\alpha$ ,N,N(diméthyl)histidine monohydratée (1,66 g ; 6,98 mmoles; 1 éq.) (voir V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 11, 258-260) est dissout dans 57 ml d'eau déminéralisée, puis la solution est refroidit à 0°C. Sous forte agitation, le dibrome (470  $\mu$ l ; 1,45 g; 9,08

20 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté goutte à goutte en 3 minutes. La solution devient rouge. Après 1 minute, l'acide thioacétique (2,56 ml ; 2,74 g; 34,91 mmoles; 5 éq.) est additionné très rapidement : la solution se décolore immédiatement et passe du rouge au jaune clair. L'agitation

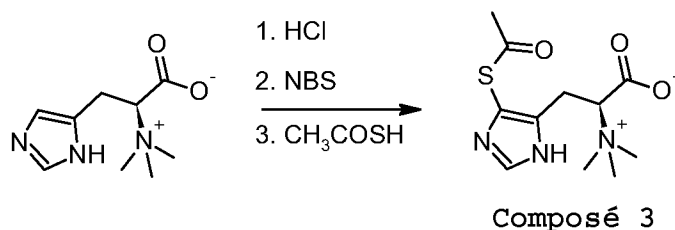
25 est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 1h.

Le composé 2 est obtenu avec un rendement réactionnel de 69% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN-H<sup>1</sup>.

30 Les spectres RMN-H<sup>1</sup> et masse sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple 3.

Exemple 5 : Préparation du la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 3) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique

5



La L-tryptophane (2,0 g ; 9,96 mmoles; 1 éq.) (voir V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 11, 258-260) est dissoute dans 55 ml d'eau déminéralisée. Puis une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (1,66 ml ; 1,96 g ; 19,91 mmoles; 2 éq.) est ajoutée, et refroidie à 0°C. Sous forte agitation, le N-bromosuccinimide (2,48 g (13,94 mmoles; 1,4 éq.) est ajouté : la solution devient rouge. Après 5 minutes, l'acide thioacétique (4,4 ml (4,69 g ; 59,74 mmoles; 6 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue pendant 40 minutes.

Le composé 3 est obtenu avec un rendement réactionnel de 65% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$ .

RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH  $\approx$  1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange:  $\delta$  (ppm) : 2,53 (s, 3H) ; 3,33 (s, 9H) ; 3,50 (m, 2H) ; 4,13 (m, 1H) ; 8,91 (s, 1H).

Deux singulets correspondant à l'excès de l'acide thioacétique et au succinimide sont détectés à 2,44 ppm et 2,76 ppm, ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires tel que l'acide acétique détectée à 2,0ppm. Un spectre représentatif est inclus dans la Figure 4.

30

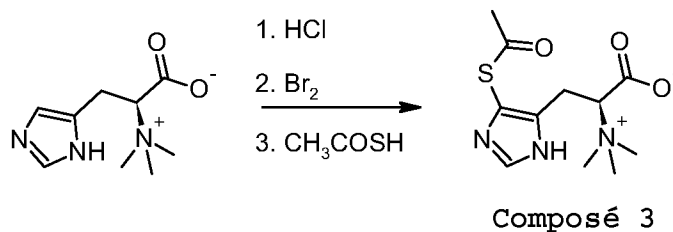
Le produit est purifié sur une colonne de silice (gradient acétate d'éthyle/éthanol/eau).

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , pH 2-3, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,53 (s, 3H); 3,30 (s, 9H); 3,37 (m, 1H); 3,44 (dd,  $J=14,0$  Hz et  $J=3,8$  Hz, 1H); 3,88 (dd,  $J=11,7$  Hz et  $J=3,8$  Hz, 1H); 8,72 (s, 1H).

RMN- $C^{13}$  ( $D_2O$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 22,9; 30,0; 52,5; 76,5; 117,9; 133,1; 137,2; 169,7; 196,0.

LCMS (APCI): 272,1  $[M+H]^+$

- 10 **Exemple 6 : Préparation du la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha,N,N,N$ (triméthyl)-histidine (Composé 3) par activation avec le brome et réaction avec l'acide thio-acétique**

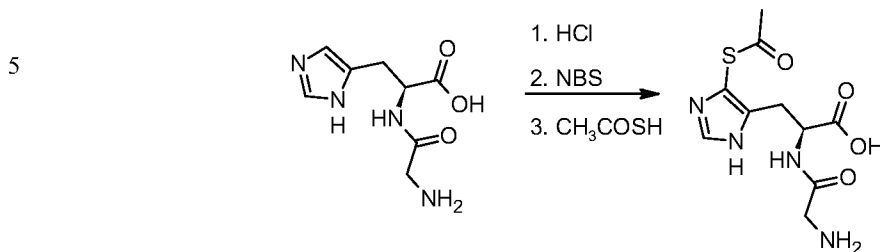


- 15 La L-tryptophane (1,0 g (5 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 35 ml d'eau déminéralisée. Puis une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (417  $\mu$ l ; 5 mmoles; 1 éq.) est ajoutée et la solution est refroidie à 1°C. Sous forte agitation, le dibrome (0,33 ml ; 1,03 g, 6,5 mmoles; 1,3
- 20 éq.) est ajouté : une gomme rouge se forme dans un premier temps qui se solubilise après 3 minutes. Après 4 minutes, l'acide thioacétique (2,20 ml ; 2,68 g; 25 mmoles; 10 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes.

- 25 Le composé 3 est obtenu avec un rendement réactionnel de 68% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$ .

Les spectres RMN- $H^1$  et masse sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple 5.

Exemple 7 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(glyciny)-histidine (Composé 4) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique



Composé 4

10 La  $\alpha$ ,N(glyciny)-histidine (212 mg, 1 mmole; 1 éq.) est dissoute dans 7 ml d'eau déminéralisé et 1 ml d'acétonitrile. Puis une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (170  $\mu$ l, 2 mmoles; 2 éq.) est ajoutée et la solution est refroidie à 0°C. Sous forte agitation, le N-bromosuccinimide (230 mg, 1,3 mmoles; 1,3 éq.) est  
15 ajouté. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (370  $\mu$ l, 5,0 mmoles; 5 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue à 0°C pendant 30 minutes.

20 Le composé 4 est obtenu avec un rendement réactionnel de 62% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$ .

RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH~1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange:  $\delta$   
25 (ppm) = 2,53 (s, 3H), 3,20 (dd, J=15,3 Hz et J=8,5 Hz, 1H), 3,36 (dd, J=15,3 Hz et J=5,7 Hz, 1H), 3,79 (dd, J=16,4 Hz et J=10,7 Hz, 2H) ; 3,84 (m, 1H), 8,86 (s, 1H).

Un singulet correspondant à l'excès de l'acide thioacétique est détecté à 2,48 ppm, un singulet à 2,78 ppm  
30 correspondant au succinimide ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires, tel que l'acide acétique détecté à 2,0ppm.

LCMS (APCI): 287,3 [M+H]<sup>+</sup>

35 Exemple 8 : Préparation du dérivé L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-1-méthylhistidine (Composé 5) par

activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique.

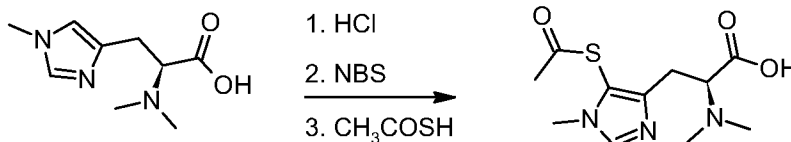
#### Préparation de la $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-L-histidine

5 La  $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-L-histidine est préparé en analogie avec le protocole décrit pour la  $\alpha,N,N$ (diméthyl)-L-histidine (V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 11, 258-260) à partir de la 1-méthyl-L-histidine et du formaldéhyde par amination réductrice en présence de  
10 palladium sur charbon actif (88%).

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,91 (s, 6H) ; 3,18 (d,  $J=6,4$  Hz, 2H) ; 3,66 (s, 3H) ; 3,85 (t,  $J=6,4$  Hz, 1H) ; 6,96 (s, 1H) ; 7,57 (s, 1H).

#### Préparation du dérivé L-5-acétylsulfanyl-

15  $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-histidine



20

Composé 5

La  $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-histidine (604 mg, 3 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 22 ml d'eau déminéralisée. L'acide chlorhydrique concentrée à 37% (250  $\mu$ l, 3 mmoles; 1 éq.) est ajoutée, puis la solution est refroidie à 0°C.  
25 L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (700 mg, 3,9 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté rapidement. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (1,1 ml, 15 mmoles; 5 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes.

30 Le composé 5 est obtenu avec un rendement réactionnel de 65% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$ .

RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH~1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange:  
35  $\delta$ (ppm) = 2,58 (s, 3H), 3,00 (s, 6H), 3,38 (dd,  $J=14,9$  Hz et  $J=10,7$  Hz, 1H), 3,46 (dd,  $J=14,9$  Hz et  $J=4,3$  Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 4,12 (dd,  $J=10,7$  Hz et  $J=4,3$  Hz, 1H), 8.97 (s, 1H)

Un singulet correspondant à l'excès de l'acide thioacétique est détecté à 2,48 ppm, un singulet à 2,78 ppm correspondant au succinimide ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires, tel que l'acide acétique détecté à 2,0ppm.

Le produit est purifié sur une colonne de silice utilisant un gradient acétate d'éthyle/éthanol/eau 2/2/1 suivi par l'élution avec un mélange d'éthanol/eau 1/1. On obtient le composé 5 (48%) sous forme d'une huile transparente.

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,56 (s, 3H) ; 2,95 (s, 6H) ; 3,25 (dd,  $J=15,0$  Hz et  $J=9,0$  Hz, 1H) ; 3,31 (dd,  $J=15,0$  Hz et  $J=5,4$  Hz, 1H) ; 3,69 (s, 3H) ; 3,86 (dd,  $J=9,0$  Hz et  $J=5,4$  Hz, 1H) ; 8.53 (s, 1H).

Les signaux de l'éthanol sont détectés à 1,18ppm et 3,65ppm.

LCMS (APCI): 272,3 [M+H]<sup>+</sup>

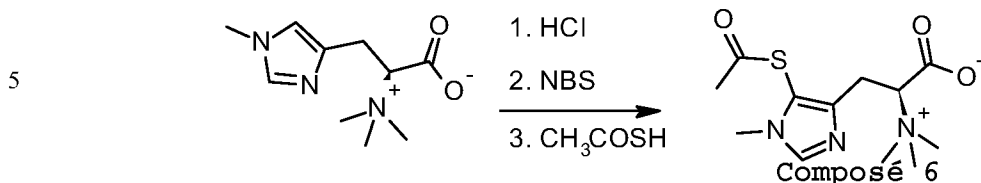
**Exemple 9 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha,N,N,N$ (triméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 6) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique**

#### Préparation de la 1-méthyl-hercynine

La 1-méthyl-hercynine est préparé en analogie avec le protocole décrit pour l'hercynine (V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 11, 258-260) à partir de la 1-méthyl-diméthyl-L-histidine et d'iodométhane par quaternisation dans le méthanol (89%).

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,19 (m, 2H) ; 3,28 (s, 9H) ; 3,67 (s, 3H) ; 3,89 (dd,  $J=10,6$  Hz et 4,5 Hz, 1H) ; 6,94 (s, 1H) ; 7,57 (s, 1H).

Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-  
1-méthyl-histidine (Composé 6)



La 1-méthyl-tryptophane (430 mg, 2 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 15 ml d'eau déminéralisée. L'acide chlorhydrique concentrée à 37% (170  $\mu$ l, 2 mmoles; 1 éq.) est ajouté puis la solution est refroidie à 0°C. Sous forte agitation, le N-bromosuccinimide (465 mg, 2,6 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (740  $\mu$ l, 10 mmoles; 5 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue à 0°C pendant 30 minutes.

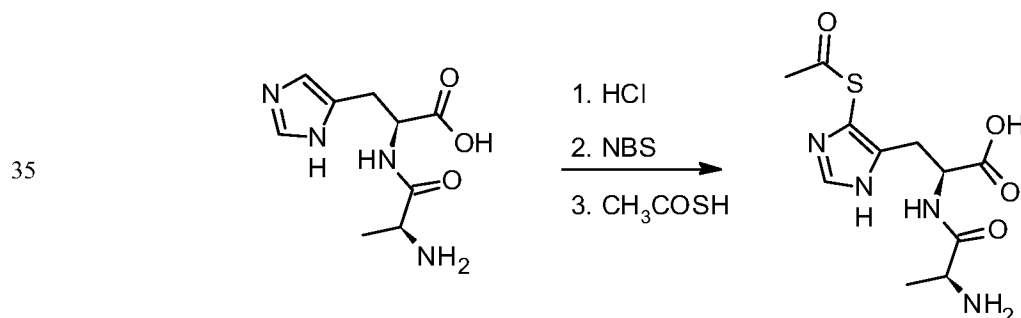
Le composé 6 est obtenu avec un rendement réactionnel de 67% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN-<sup>1</sup>H.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O pH~1, 400 MHz) d'un échantillon du mélange:  
20  $\delta$ (ppm) = 2,57 (s, 3H), 3,32 (s, 9H), 3,53 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 4,08 (dd, J=11,9 Hz et J=3,7 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H).

Un singulet correspondant à l'excès de l'acide thioacétique est détecté à 2,48 ppm, un singulet à 2,78 ppm correspondant au succinimide ainsi que des signaux de faible intensité correspondants aux produits secondaires, tel que l'acide acétique détecté à 2,0ppm.

LCMS (APCI): 286,0 [M+H]<sup>+</sup>

Exemple 10 : Préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ -N(L-alanyl)-histidine (Composé 7) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique



## Composé 7

L' $\alpha$ ,N(L-alanyl)-histidine (500 mg, 2,2 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 15 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (370  $\mu$ l, 4,4 mmoles; 2 éq.) puis la solution est refroidie à 0°C. Le N-bromosuccinimide (510 mg, 2,9 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté en une portion: le mélange devient orange limpide après 30 secondes. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (820  $\mu$ l, 11,0 mmoles; 5 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes.

Le composé 7 est obtenu avec un rendement réactionnel de 65% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$  d'un échantillon.

Le mélange réactionnel est lavé avec 2x25 ml d'acétate d'éthyle, puis le composé est purifié sur une colonne de silice (acétate d'éthyle/éthanol/eau 2/2/1. On obtient le composé 7 (410 mg, 54%, pureté 88%) sous forme d'une huile transparente.

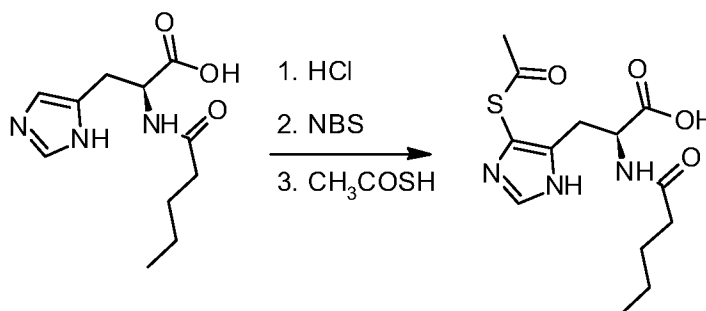
RMN- $H^1$  ( $D_2O$  pH acide, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,49 (d,  $J=7,2$  Hz, 3H) ; 2,53 (s, 3H); 3,20 (dd,  $J=15,3$  Hz et  $J=8,9$  Hz, 1H) ; 3.36 (dd,  $J = 15,3$  Hz et  $J=5,8$  Hz, 1H), 4,01 (q,  $J=7,2$  Hz, 1H) ; 4,77 (m superposé avec signal HOD) ; 8,86 (s, 1H).

Un singulet correspondant au succinimide est détecté à 2,68 ppm.

LCMS (APCI): 301,1 [M+H] $^+$

Exemple 11 : Préparation du dérivé 5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (Composé 8) par activation avec le N-bromosuccinimide et réaction avec l'acide thioacétique

35



**Composé 8**

L' $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (450 mg, 1,43 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 10 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (120  $\mu$ l, 1,43 mmoles; 1 éq.), puis la solution est refroidie à 0°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (330 mg, 1,86 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (530  $\mu$ l, 7,15 mmoles; 5 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureusement à 0°C pendant 30 minutes.

Le composé 8 est obtenu avec un rendement réactionnel de 67% molaire tel que calculé à partir du spectrogramme RMN- $H^1$  d'un échantillon.

Le produit est purifié sur une colonne de silice (mélange 90% d'acétate d'éthyle/éthanol 3/1 et 10% d'eau). La 5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (composé 8) est obtenu sous forme d'une huile transparente (320 mg, 64%, pureté 90%).

20

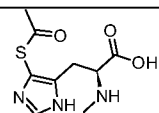
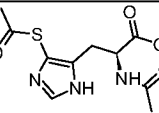
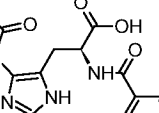
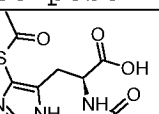
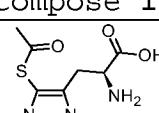
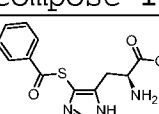
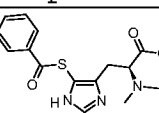
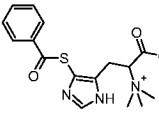
RMN- $H^1$  ( $D_2O$  ~1, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 0,85 (t, J=7,3 Hz, 3H) ; 1,17 (h, J=7,4 Hz, 2H) ; 1,47 (p, J=7,4 Hz, 2H) ; 2,22 (t, J=7,4 Hz, 2H) ; 2,55 (s, 3H) ; 3,17 (dd, J=15,2 Hz et J=9,6 Hz, 1H) ; 3,37 (dd, J=15,2 Hz et J=5,2 Hz, 1H) ; 4,79 (m superposé au signal de HOD) ; 8,88 (s, 1H).

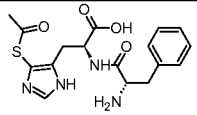
LCMS (APCI): 314,1 [M+H]<sup>+</sup>

Pour illustrer l'invention, les composés 9-17 sont préparés (Exemples 12-21) en analogie avec les exemples précédents.

Les résultats ainsi que les caractéristiques spectrales sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1 : Exemples 12-21 décrivant la préparation des Composés 9-17 selon l'invention.**

N°Ex.	Produit formé	En analogie avec	Réactif	% conv. en produit désiré	RMN-H <sup>1</sup> : Signaux caractéristiques			LC-MS [M+H] <sup>+</sup>
					$\delta$ H-2	$\delta$ $\alpha$ -H	$\delta$ ACS	
Ex. 12	 Composé 9	Ex. 2	NBS	78%	8,91	4,13 (dd, J=7,7Hz, J=5,6Hz)	2,55	244,1
Ex. 13	 Composé 10	Ex. 2 (1 éq HCl)	NBS	65%	8,83	4,73 (m)	2,51	272,1
Ex. 14	 Composé 11	Ex. 2 (1 éq HCl)	NBS	58%	8,85	4,93 (dd, J=9,3Hz, J=4,7Hz)	2,56	334,1
Ex. 15	 Composé 12	Ex. 2	NBS	63%	8,84	4,66 (m)	2,51	301,0
Ex. 16	 Composé 13	Ex. 2	NBS	63%	9,00	4,31 (dd, J=7,6Hz, J=6,9Hz)	2,58	244,6
Ex. 17		Ex. 1	Br <sub>2</sub>	55%				
Ex. 18	 Composé 14	Ex. 2 (eau/ CH <sub>3</sub> CN)	NBS	31%	8,98	4,37	-	292,1
Ex. 19	 Composé 15	Ex. 2 (eau/ CH <sub>3</sub> CN)	NBS	12%	8,95	4,28	-	320,9
Ex. 20	 Composé 16	Ex. 2 (eau/ CH <sub>3</sub> CN)	NBS	12%	9,06	4,32	-	334,1

Ex. 21	 Composé 17	Ex. 2	NBS	40%	8,89	4,36	2,58	377, 2
--------	---	-------	-----	-----	------	------	------	-----------

## II. Exemples d'application :

### 5 II.1 Transformation des dérivés 5-acylsulfanyl préparés in situ en dérivés 5-sulfanylhistidines correspondants par hydrolyse

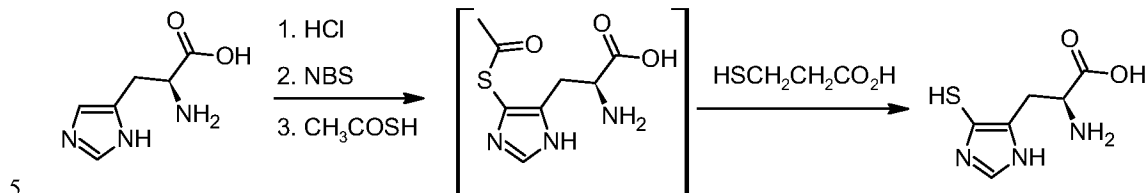
Pour illustrer l'application des dérivés 5-acylsulfanyl-histidines selon l'invention, d'une manière non-limitative, sont donnés, dans ce paragraphe, des  
10 exemples d'application des nouveaux dérivés 5-acylsulfanyl-histidines, préparés généralement *in situ*, en tant que précurseur de 5-sulfanylhistidines et de leurs dérivés.

Ces exemples illustrent l'utilité des nouveaux dérivés  
15 5-acylsulfanyles décrits dans l'invention pour préparer d'une manière aisée des composés 5-sulfanylhistidines et leurs dérivés tels que les disulfures, qui sont par ailleurs très difficile d'accès et nécessitent des synthèses multi-étapes.

20

Afin d'obtenir de meilleurs rendements en dérivés 5-sulfanylhistidines, les composés 5-acylsulfanyl sont préparés *in situ* puis hydrolysés ensuite directement, en agitant le milieu réactionnel, de préférence en chauffant  
25 le milieu réactionnel. La présence d'un thiol, tel que l'acide mercaptopropionique ou la dithiothréitol, s'avère bénéfique pour l'isolation aisée des dérivés de 5-sulfanylhistidines, mais elle n'est aucunement nécessaire pour l'hydrolyse même, comme démontré dans les exemples de  
30 suivi 18d, 19b et 19c.

Exemple 22 : Préparation « one pot » de la L-5-sulfanylhistidine via préparation *in-situ* de la 5-acétylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse (Composé 18)



Le chlorhydrate de la L-histidine monohydratée (10,48 g ; 50 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 300 ml d'eau  
 10 déminéralisée et l'acide chlorhydrique concentré à 37% (4,17 ml ; 4,92 g; 50 mmoles; 1 éq.), puis la solution est refroidie à 0°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (11,56 g ; 65 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté en une seule portion: le mélange devient orange  
 15 limpide. L'acide thio-acétique (14,7 ml ; 15,69 g; 200 mmoles; 4 éq.) est ajouté d'un seul coup. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 1h. L'acide 3-mercaptopropionique (26 ml ; 32,2 g; 300 mmoles; 6 éq.) est ajouté puis la solution légèrement jaune est chauffée à  
 20 90°C pendant 18h. La solution est extraite par trois fois 300 ml d'acétate d'éthyle. Après neutralisation et cristallisation en présence de dithiothréitol (231 mg ; 1,5 mmoles; 0,03 éq.), le composé désiré 18 cristallise. Le solide est filtré et séché sous vide pour donner 2,97 g  
 25 (31% ; 41% par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) de L-5-sulfanylhistidine (Composé 18) sous forme d'un solide blanc cassé.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,18 (dd,  $J=15,8$  Hz,  $J=7,3$  Hz, 1H) ; 3,26 (dd,  $J=15,8$  Hz et  $J=5,1$  Hz, 1H) ; 4,33 (dd,  $J=7,3$  Hz,  $J=5,1$  Hz, 1H) ; 8,25 (s, 1H).

30

RMN- $H^1$  ( $D_2O+DCl$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,11 (dd,  $J=15,1$  Hz,  $J=6,5$  Hz, 1H) ; 3,19 (dd,  $J=15,1$  Hz et  $J=6,6$  Hz, 1H) ; 4,12 (t,  $J=7,0$  Hz, 1H) ; 8,37 (s, 1H).

RMN- $C^{13}$  ( $D_2O+DCl$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 26,3; 55,2, 122,1; 130,1; 135,5; 173,6.

LC-MS (AP-): 186,0  $[M-H]^-$

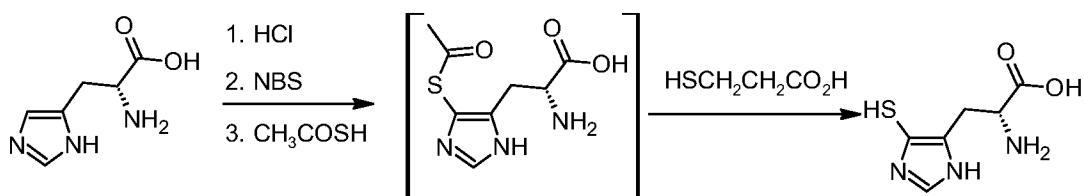
$[\alpha]_D$  : + 7,4° ( $c = 0,1$  ; 1N HCl)

Analyse élémentaire :  $C_6H_9N_3O_2S$  ; Théorique : C 38,49 % ; H 4,84 % N 22,44 ; Mesuré : C 38,0 % ; H 4,96 % ; N 22,06.

10

**Exemple 23 :** Préparation « one pot » de la D-5-sulfanylhistidine via préparation *in-situ* de la 5-acétylsulfanyl-histidine suivi par hydrolyse (Composé 19)

15



Composé 19

La D-histidine (3,92 g ; 25 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 150 ml d'eau déminéralisée et une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (4,17 ml ; 4,92 g; 50 mmoles; 2 éq.), puis la solution est refroidie à 0°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (5,78 g (32,5 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté d'un coup: la solution devient orange limpide. L'acide thioacétique (7,33 ml ; 7,85 g; 200 mmoles; 4 éq.) est ajouté d'un seul coup. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 1h. L'acide 3-mercaptopropionique (13 ml (16,1 g; 150 mmoles; 6 éq.) est ajouté puis la solution est chauffée à 100°C pendant 18h. Après refroidissement, la solution est extraite par trois fois 150 ml d'acétate d'éthyle. Le dithiothréitol (13 ml ; 16,1 g; 150 mmoles; 6 éq.) est

30

ajouté à la phase aqueuse. Après recristallisation en présence de charbon actif on obtient 1,25 g de D-5-sulfanylhistidine (Composé 19) (26 % ; 35 % par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) sous forme d'un solide  
5 beige.

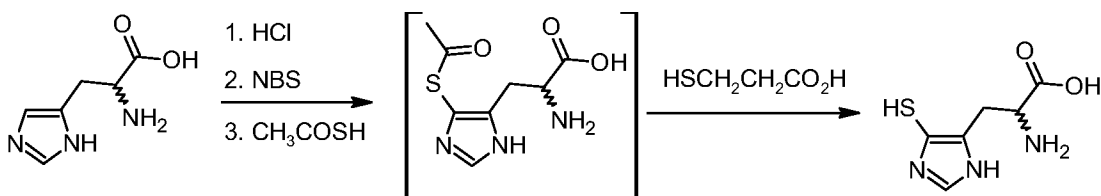
Les spectres RMN- $H^1$ , RMN- $C^{13}$  et masse sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple 13 pour le composé 9.

$[\alpha]_D$  : - 7,1° (c = 0,1 ; 1N HCl)

10

**Exemple 24** : Préparation « one pot » de la D,L-5-sulfanylhistidine via préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse (Composé 20)

15



Composé 20

Le chlorhydrate de la DL-histidine monohydratée (3,21 g ; 15 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 100 ml d'eau  
20 déminéralisée et une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (1,25 ml ; 1,48 g; 15 mmoles; 1 éq.), puis la solution est refroidie à 0°C. Sous agitation très forte, le N-bromosuccinimide (3,47 g ; 19,5 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté d'un coup. Après 2 minutes, l'acide thioacétique  
25 (4,4 ml ; 4,71 g; 60 mmoles; 4 éq.) est ajouté d'un seul coup. On laisse agiter à 0°C pendant 1h. L'acide 3-mercaptopropionique (8,0 ml ; 9,65 g; 90 mmoles; 6 éq.) est ajouté puis la solution est chauffée à 100°C pendant 18h. Un précipité correspondant au disulfure de l'acide thio-  
30 acétique et de l'acide mercaptopropionique est éliminé par filtration. Le filtrat est lavé par deux fois 100 ml

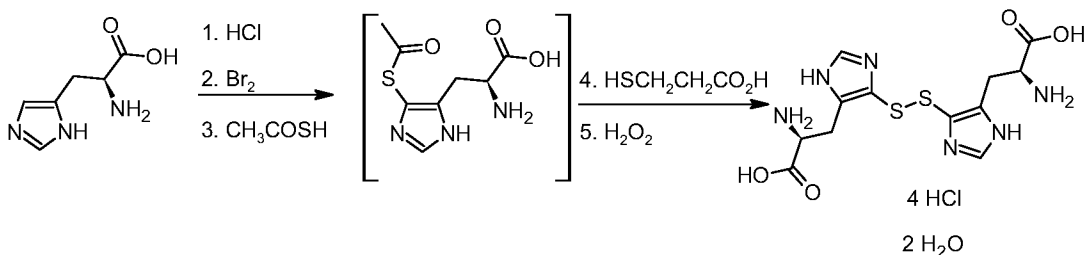
d'acétate d'éthyle. Après neutralisation et cristallisation en présence de dithiothréitol (233 mg ; 1,5 mmoles; 0,1 éq.), 650 mg de D,L-5-sulfanylhistidine (Composé 20) (23 %, 29 % par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAC) sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Les spectres RMN- $H^1$ , RMN- $C^{13}$  et masse sont identiques à ceux obtenus dans l'exemple 22 pour le composé 18.

10

**II.2 Transformation des dérivés 5-acylsulfanyles préparés in situ en dérivés 5,5'-disulfane-diyl-bis-histidines (disulfures) correspondants par hydrolyse**

15 **Exemple 25 : Préparation « one pot » du disulfure de la L-5-sulfanylhistidine via préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse et oxydation (Composé 21)**



20

**Composé 21x4HClx2H<sub>2</sub>O**

Le chlorhydrate de la L-histidine monohydratée (14,82 g ; 70 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 126 ml d'eau déminéralisée, puis la solution est refroidie à 0°C. Sous forte agitation, le dibrome (4,32 ml ; 13,42 g; 84 mmoles; 1,2 éq.) est ajouté goutte à goutte très rapidement. La solution devient rouge. L'acide thioacétique (18,0 ml ; 19,2 g; 245 mmoles; 3,5 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 20 minutes. L'acide 3-mercaptopropionique (25 ml ; 29,71 g; 280 mmoles; 4 éq.) est ajouté et la solution est

30

chauffée à 80°C pendant la nuit. La solution est refroidie puis extraite par 3 fois 150ml d'acétate d'éthyle. Après oxydation avec une solution d'eau oxygénée à 30% (3,5 ml (3,97 g; 35 mmoles; 0,5 éq.), suivie d'une purification sur la résine Dowex WX2, le disulfure de la L-5-sulfanylhistidine (Composé 21) (4,66 g ; 24 % ; 37 % par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) chlorhydrate hydraté est obtenu sous forme d'une poudre gris clair.

10 RMN-H<sup>1</sup> (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,27 (m, 2x1H) ; 3,32 (m, 2x1H) ; 4,17 (dd, J=8,0 Hz, J=6,6 Hz, 2x1H) ; 8,87 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 373,0 [M+H]<sup>+</sup>

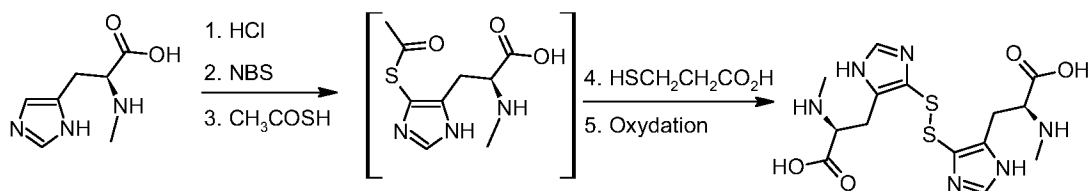
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> : + 23,6° (c = 0,1 ; 1N HCl)

15

#### Exemple 26 :

Préparation « one pot » du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 22) via préparation *in situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse et oxydation (Composé 22)

20



Composé 22

Le chlorhydrate de la  $\alpha$ ,N(méthyl)-L-histidine (1,05 g ; 5 mmoles; 1 éq.) (V. N. Reinhold et al., *J. Med. Chem.* 1968, 25 11, 258-260) est dissout dans 35 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% ; 420  $\mu$ l (5 mmoles; 1 éq.), puis la solution est refroidie à 1°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (1,17 g ; 6,5 mmoles; 1,3 éq.) est  
30 ajouté rapidement. Puis l'acide thioacétique (2,57 ml (2,74

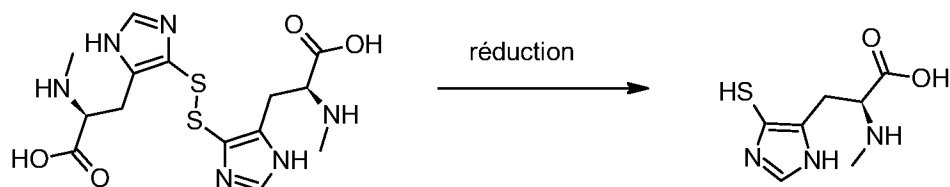
g; 35 mmoles; 7 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes. La solution est extraite avec 40 ml d'acétate d'éthyle puis l'acide 3-mercaptopropionique (2,2 ml ; 2,65 g; 25 mmoles; 5 éq.) est ajouté à la phase aqueuse. L'hydrolyse est effectuée par chauffage à 100°C pendant 20h. Après refroidissement de la solution, le milieu réactionnel est extrait par 4 fois 35 ml d'acétate d'éthyle. Après oxydation et purification sur la résine DOWEX 50WX2-400, le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 22) est obtenu (620 mg, 61%, 75% par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) est obtenu sous forme d'une poudre marron.

15 RMN- $^1\text{H}$  (MeOD/D $_2$ O 20/1, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,69 (s, 2x3H) ; 2,94 (dd, J=14,0 Hz, J=7,0 Hz, 2x1H) ; 2,99 (dd, J=14,0 Hz, J=5,0 Hz, 2x1H) ; 3,92 (dd, J=7,0 Hz, J=5,0 Hz, 2x1H) ; 7,79 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 401,0 [M+H] $^+$

20

**Préparation de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine par réduction du disulfure (Composé 23)**



25

**Composé 23**

Le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)- histidine (620 mg ; 1,52 mmoles, 1 éq.) (Composé 22) est mis en solution dans 50 ml d'eau. Le dithiothréitol (473 mg ; 3,03 mmoles; 2 éq.) et le charbon actif (300 mg) sont ajoutés. Le mélange est agité 4h à température ambiante. Après filtration et cristallisation dans l'éthanol absolu la L-5-

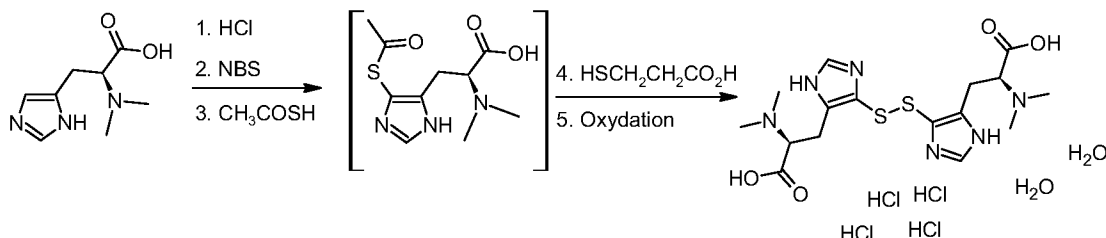
30

sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 23) (351 mg, 56%) est obtenue sous forme d'une poudre beige.

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,80 (s, 3H) ; 3,21 (dd, J=15,9 Hz, J=6,4 Hz, 1H) ; 3,28 (dd, J=15,9 Hz, J=5,2 Hz, 1H) ; 3,92 (m, 1H) ; 8,25 (s, 1H).  
LCMS (APCI): 202,1 [M+H]<sup>+</sup>

**Exemple 27 :**

10 Préparation « one pot » du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine via préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse et oxydation (Composé 24)



**Composé 24x4HClxH<sub>2</sub>O**

Le chlorhydrate de la  $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine monohydratée (2,43 g ; 10 mmoles; 1 éq.) est dissout dans 54 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (835  $\mu$ l ; 985 mg; 10 mmoles; 1 éq.), puis la solution est refroidie à 1°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (2,31 g ; 13 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté rapidement. Après 2 minutes, l'acide thioacétique (3,0 ml ; 3,14 g; 40 mmoles; 4 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes. La solution légèrement jaune obtenue est extraite par 2 fois 120 ml d'acétate d'éthyle. Après hydrolyse à chaud, oxydation et purification sur la résine DOWEX 50WX2-400 le chlorhydrate hydrate du disulfure de la

20

25

30

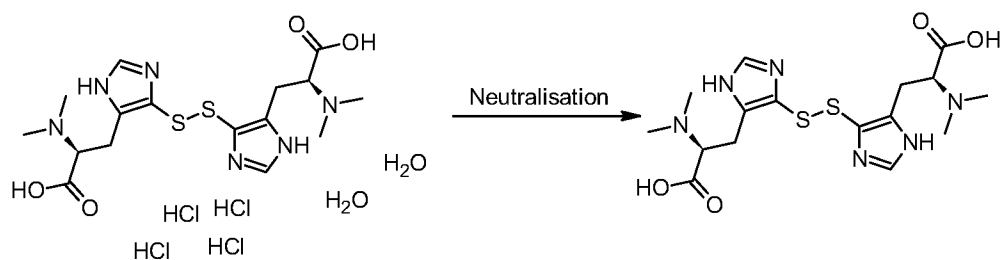
L-5-sulfanyl- $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine (Composé **24** $\times$ 4HCl $\times$ H<sub>2</sub>O, 1,2 g, 41 %) est obtenu sous forme d'une poudre beige.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,01 (s, 2x6H) ; 3,37 (dd, J=14,6 Hz, J=11,2 Hz, 2x1H) ; 3,51 (dd, J=14,6 Hz, J=4,0 Hz, 2x1H) ; 4,09 (dd, J=11,2 Hz, J=4,0 Hz, 2x1H) ; 8,86 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 429,2 [M+H]<sup>+</sup>

10

### Préparation du Composé 24 base libre



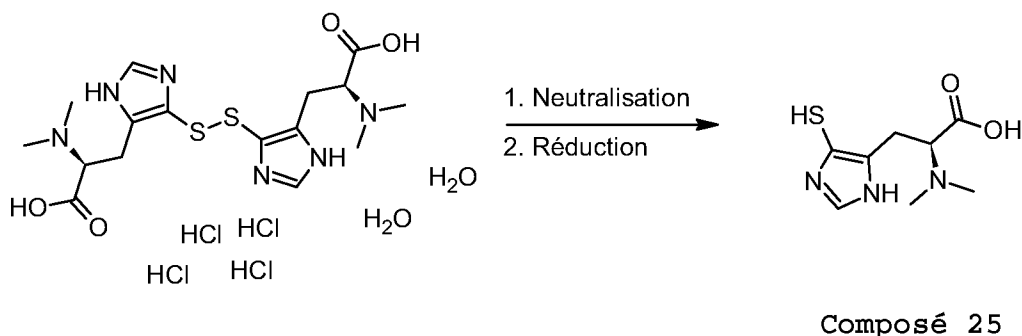
Composé 24

Le chlorhydrate hydrate du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine (3,6 g ; 5,89 mmoles; 1 éq.) est mis en solution dans 53 ml d'eau déminéralisée. La résine Amberlite®IRA-410 (8g) sous forme hydrogénocarbonate (selon *K. A. Piez et al., J. Biol. Chem. 194, 669-672 (1952)*) est ajoutée. La suspension est agitée sous vide pendant 30 minutes puis filtrée. Le filtrat est évaporé pour conduire au disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ N,N(diméthyl)-histidine base libre (Composé **24**) (2,47 g, 84%) sous forme d'un solide jaune.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,88 (s, 2x6H) ; 2,92 (m, 2x2H); 3,70 (m, 2x1H) ; 8,17 (s, 2x1H).

25

Obtention du composé 25 par réduction du Composé  
18x4HClxH<sub>2</sub>O)



5 Le chlorhydrate hydraté du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (1,2 g ; 2,07 mmoles; 0,5 éq.) est mis en solution dans 40 ml d'eau déminéralisée. La résine Amberlite®IRA-410 (2 g) sous forme hydrogénocarbonate est ajoutée. La suspension est agitée  
10 sous vide pendant 30 minutes puis filtrée. Après réduction avec du dithiothréitol (967 mg ; 6,20 mmoles; 1,5 éq.) et cristallisation avec l'éthanol absolu, sous azote, la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 25) (450 mg, 58 %) est obtenue sous forme d'un solide blanc.

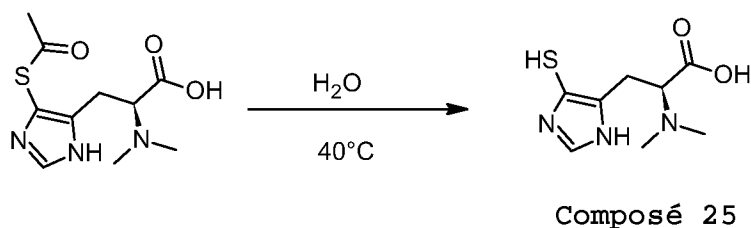
15

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,00 (s, 6H) ; 3,23 (dd, J=15,5 Hz et J=7,5 Hz, 1H) ; 3,31 (dd, J=15,5 Hz et J=5,8 Hz, 1H) ; 4,00 (dd, J=7,5 Hz et J=5,8 Hz, 1H) ; 8,28 (s, 1H).

20 RMN-C<sup>13</sup> (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 22,7; 41,8, 67,3; 124,5; 129,6; 131,7; 171,0.

LCMS (APCI): 216,1 [M+H]<sup>+</sup>

Suivi analytique de l'hydrolyse du composé 5-  
25 acylsulfanyl (composé 2) en composé 5-sulfanylhistidine 25



Le composé 2 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 3, utilisant un gradient acétate d'éthyle/éthanol suivi par l'élution avec de l'eau. La fraction aqueuse contenant le composé 2 pur est placée dans un bain d'eau à 40°C, et chauffé sous agitation pendant 8h. Des échantillons sont prélevés toutes les 60 minutes, et le mélange analysé par HPLC.

L'hydrolyse du composé 2 est quasi-complète après 8h, et le composé 19 est obtenu avec un rendement de 70%.

10

Tableau 2 : Suivi de la formation du composé 25 par hydrolyse du composé 2 :

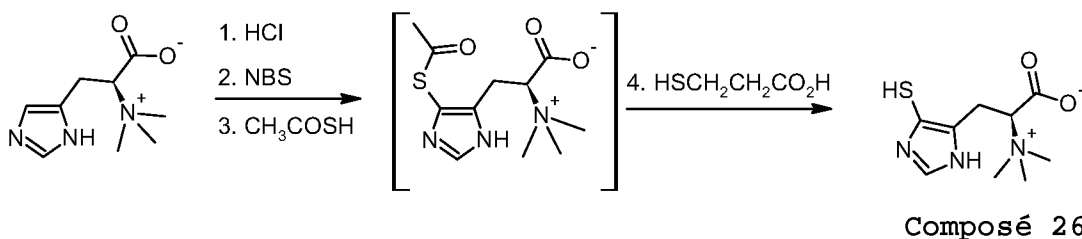
t (h)	0	1	2	3	5	8
% composé 25	0%	14%	23%	34%	49%	70%

15

Exemple 28 :

Préparation « one pot » de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine via préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse  
(Composé 26)

20



La L-hercynine (5,02 g ; 25 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 135 ml d'eau déminéralisée et une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37%, (4,17 ml ; 4,93 g; 50 mmoles; 2 éq.) est additionnée ; puis la solution est refroidie à 0°C. Sous forte agitation, le N-

25

bromosuccinimide (5,78 g ; 32,5 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté. Après 5 minutes, l'acide thio-acétique (18,33 ml ; 19,61 g; 250 mmoles; 10 éq.) est additionné très rapidement. L'agitation est maintenue pendant 40 minutes.  
 5 La solution est extraite par 2 fois 135 ml d'acétate d'éthyle. L'acide 3-mercaptopropionique (11,07 ml ; 13,4 g; 125 mmoles; 5 éq.) est ajouté à la phase aqueuse puis la solution est chauffée à 130°C pendant 3h. Après extraction, neutralisation et cristallisation en présence de  
 10 dithiothréitol (1,95 g (12,5 mmoles; 0,5 éq.) la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 26) (2,22 g ; 38 % ; 58 % par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) est obtenu sous forme d'une poudre blanche (à conserver sous atmosphère inerte).

15

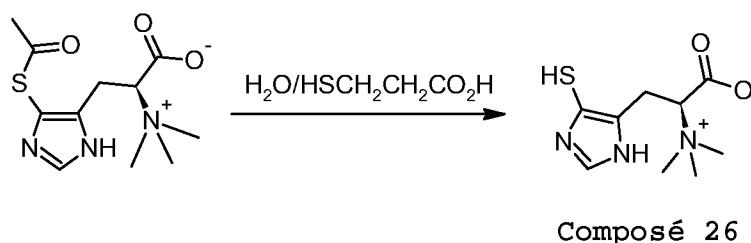
RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,29 (s, 9H) ; 3,19 (m, 1H) ; 3,35 (m, 1H) ; 4,00 (dd, J=10,6 Hz, J=3,9 Hz, 1H) ; 8,22 (s, 1H).

LCMS (APCI): 230,0 [M+H]<sup>+</sup>

20

Suivi analytique par RMN- $H^1$  de l'hydrolyse du composé 5-acylsulfanyl 3 en composé L-5-sulfanyl- $\alpha$ N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 26) en présence d'un thiol

25



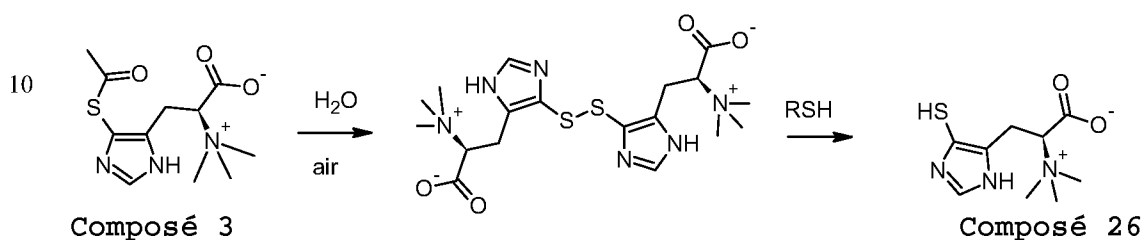
Le composé 3 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 5. 100 mg (0,33 mmoles, 1 éq) du composé 3 sont solubilisés dans 2,4 mL de  $D_2O$ . 172 mg de l'acide 3-mercaptopropionique (142  $\mu$ l, 5 équivalents) sont ajoutés, et la solution est chauffée à 40°C. La conversion

30

est suivie par RMN- $H^1$  et par HPLC-ELSD. Le rendement d'hydrolyse du composé 3 est de 90% après 3h (suivi par RMN- $H^1$ ). Le composé 26 est formé après 3h30 avec un rendement de 97% (HPLC-ELSD).

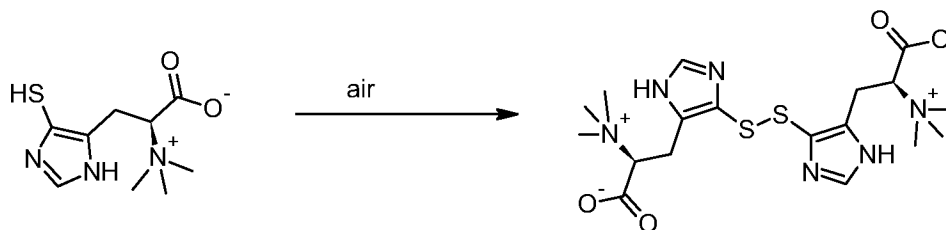
5

**Préparation du composé L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-  
histidine (composé 26) par hydrolyse du composé 5-  
acylsulfanyl 3**



Le composé 3 est préparé et purifié par colonne comme  
15 décrit dans l'exemple 5. 170 mg (0,6 mmoles) du composé 3  
sont solubilisé dans 10 mL d'eau, et la solution est  
chauffée à 90°C à l'air pendant 7h. La conversion est  
suivie par HPLC. L'hydrolyse du composé 3 est complète  
après 7h. La solution est évaporée à sec. Le résidu est  
20 repris dans un mélange de 5 mL de méthanol et 93 mg (0,6  
mmol) de dithiothréitol. Après agitation pendant 4h sous  
atmosphère inerte, 2mL d'éthanol sont ajoutés. Un précipité  
se forme immédiatement, qui est filtré et lavé avec de  
l'éthanol (2x2mL) puis de l'éther éthylique (2x2mL). Après  
25 séchage, 104mg (72%) de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-  
histidine sont obtenus sous forme d'une poudre beige.  
Les spectres RMN- $H^1$  et de masse sont identiques à ceux  
obtenus dans l'exemple 28a.

préparation du disulfure de la L-5-sulfanyl-  
 $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 27)



5

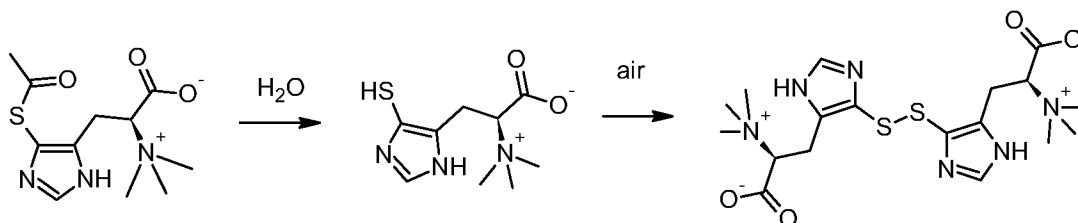
Composé 27

La L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 26, 300 mg, 1,29 mmoles, 1 éq) est mis en solution dans 50 ml d'eau déminéralisée. La solution incolore est agitée à température ambiante pendant 4 jours. Après filtration et  
 10 lyophilisation du filtrat, le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 27) (263 mg ; 89%) est obtenu sous forme d'une poudre jaune.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,68 (dd,  $J=13,5$  Hz,  $J=11,0$  Hz, 2x1H) ; 2,75 (dd,  $J=13,5$  Hz,  $J=4,3$  Hz, 2x1H) ; 3,19 (s, 2x9H) ; 3,68 (dd,  $J=11,0$  Hz,  $J=4,3$  Hz, 2x1H) ; 7,97 (s, 2x1H).

LCMS (APCI) : 457,1 [M+H] $^+$ .

20 Suivi analytique par HPLC de l'hydrolyse du composé 5-  
 acylsulfanyl 3 et oxydation *in situ* en composé 27



Composé 27

Le composé 3 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 5, utilisant un gradient acétate d'éthyle/éthanol suivi par l'éluion avec de l'eau. La fraction aqueuse contenant le composé 3 pur est placée dans  
 25

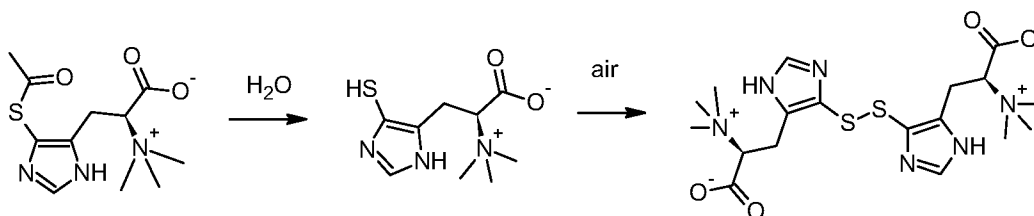
un bain d'eau à 40°C, et chauffé sous agitation pendant deux jours. Des échantillons sont prélevés chaque heure, et le mélange analysé par HPLC.

L'hydrolyse du composé 3 est quasi-complète après 2 jours, et le composé 27 est obtenu avec un rendement de 80%.

Tableau 3 : Suivi de l'hydrolyse du composé 3:

t	0h	2h	4h	6h	8h	18h	2 j
% hydrolyse	0%	7%	21%	38%	60%	85%	95%

10 Suivi analytique de l'hydrolyse par RMN- $H^1$  du composé 5-acylsulfanyl 3 et oxydation *in situ* en composé 27



Composé 3

Composé 27

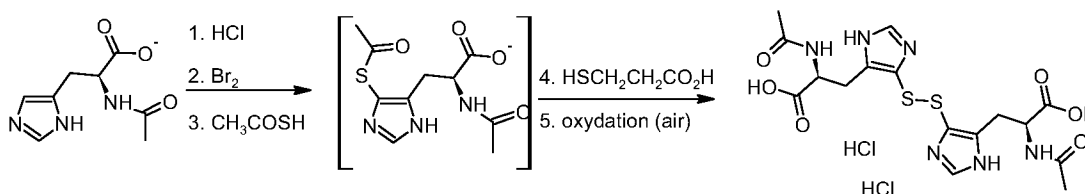
Le composé 3 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 5. 30 mg du composé 3 sont solubilisé dans 600µL de D<sub>2</sub>O, la solution transféré dans un tube RMN, qui est gardé à température ambiante. La conversion est suivie par RMN- $H^1$ . L'hydrolyse du composé 3 est quasi-complète après 2 jours, et on obtient un mélange contenant le disulfure 27 et le thiol 26 (~ 3 :1).

Tableau 4 : Suivi de l'hydrolyse du composé 3:

t	0h	2h	10h	2 j
% hydrolyse	0%	19%	26%	86%

25 Exemple 29 :

Préparation « one-pot » du disulfure de la L-5-sulfanyl-



$\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé 28 chlorhydrate) via  
préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine  
suivi par hydrolyse et oxydation

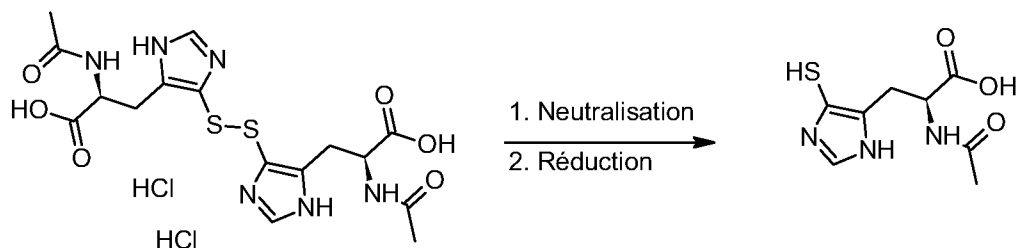
Composé 28x2HCl

5 La  $\alpha$ ,N(acétyl)-L-histidine monohydratée (2,15 g, 10 mmoles;  
1 éq.) est dissoute dans 63 ml d'eau déminéralisée  
contenant l'acide chlorhydrique concentré à 37% (1,67 ml,  
1,97 g; 20 mmoles; 2 éq.) ; puis la solution est refroidie  
à 0°C. Le dibrome (668  $\mu$ l, 2,07 g; 13 mmoles; 1,3 éq.) est  
10 additionné. L'acide thioacétique (3,67 ml ; 3,92 g; 50  
mmoles; 5 éq.) est ajouté d'un seul coup. L'agitation est  
maintenue à 0°C pendant 45 minutes. La solution est  
réchauffée à température ambiante. L'acide 3-  
mercaptopropionique (5,26 ml, 6,36 g; 60 mmoles; 6 éq.) est  
15 ajouté puis la solution est chauffée à 80°C pendant la  
nuit. La solution est refroidie à température ambiante puis  
extraite par 4 fois 50 ml d'acétate d'éthyle. La phase  
aqueuse est purifiée sur silice pour conduire au  
chlorhydrate du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ N(acétyl)-  
20 histidine (composé 28) sous forme d'une huile orange (520  
mg, 17% ; 36% par rapport à la quantité de l'intermédiaire  
SAC).

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,86 (s, 2x3H) ; 2,92 (dd,  
25 J=15,0 Hz, J=8,0 Hz, 2x1H) ; 3,03 (dd, J=15,0 Hz, J=5,5 Hz,  
2x1H) ; 4,47 (dd, J=8,0 Hz, J=5,5 Hz, 2x1H) ; 8,73 (s,  
2x1H).

LCMS (APCI): 457,4 [M+H]<sup>+</sup>

Préparation de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine  
(Composé 29)



5

## Composé 29

Le chlorhydrate du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé 28) (520 mg ; 834  $\mu$ moles, 1  $\text{éq.}$ ) est mis en solution dans 50ml d'eau puis le pH de la solution de couleur marron est ajusté à 4,5 par ajout de

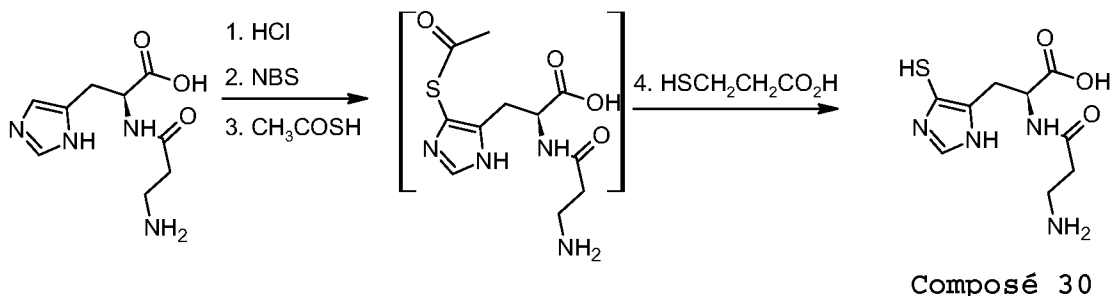
10  $\text{NH}_4\text{OH}$ . L'acide 3-mercaptopropionique (4,38 ml ; 5,31 g ; 50  $\mu$ moles ; 5  $\text{éq.}$ ) est ajouté. La solution est chauffée à 70°C pendant 2h. La solution est extraite par 4 fois 50 ml d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est évaporée à sec pour donner la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé

15 29) (390 mg ; 86 %) sous forme d'un solide beige.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,97 (s, 3H) ; 3,01 (dd,  $J=15,2$  Hz,  $J=8,6$  Hz, 1H) ; 3,16 (dd,  $J=15,2$  Hz,  $J=4,8$  Hz, 1H) ; 4,50 (dd,  $J=8,6$  Hz,  $J=4,8$  Hz, 1H) ; 8,22 (s, 1H).

20 LCMS (APCI): 230,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Exemple 30 : Préparation « one pot » de la L-5-sulfanylcarnosine via préparation *in-situ* de la 5-acylsulfanylhistidine suivi par hydrolyse (Composé 30)



5

La L-carnosine (425 mg ; 1,88 mmoles; 1 éq.) est dissoute dans 12 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (370 mg ; 3,75 mmoles; 2 éq.), puis la solution est refroidie à 0°C. Le N-bromosuccinimide (440 mg ; 2,44 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté en une portion: la solution devient orange limpide. L'acide thioacétique (960 µl ; 1,03 g, 13,14 mmoles; 7 éq.) est ajouté. Le mélange est agité à 0°C pendant 1h. La solution est extraite par 4 fois 12 ml d'acétate d'éthyle. Après

15 neutralisation et purification sur silice en présence de dithiothréitol (290 mg ; 1,88 mmoles; 1 éq.), la L-5-sulfanylcarnosine (Composé 30) (70 mg ; 14 % ; 22 % par rapport à la quantité de l'intermédiaire SAc) est obtenue sous forme d'une laque incolore.

20

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,69 (t,  $J=6,7$  Hz, 2H) ; 3,00 (m, 1H) ; 3,12 (m, 1H) ; 3,23 (t,  $J=6,7$  Hz, 2H) ; 4,43 (dd,  $J=8,5$  Hz,  $J=4,2$  Hz, 1H) ; 8,20 (s, 1H).

LCMS (APCI): 259,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

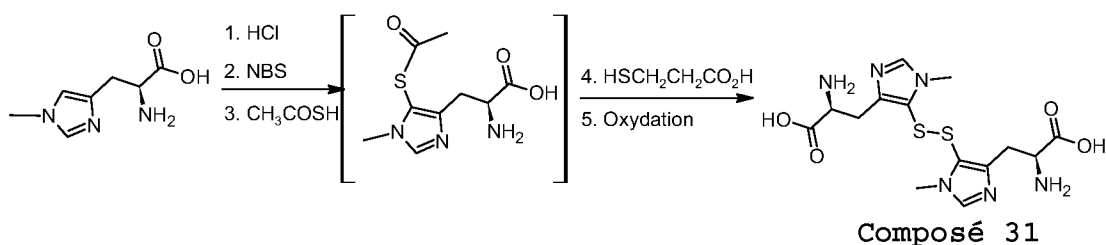
25

## Exemple 31 : Préparation des composés 31 et 32

Préparation « one pot » du disulfure de l'iso-ovothiol A via préparation *in-situ* de la 5-acetylsulfanyl-1-méthyl-histidine suivi par hydrolyse et oxydation

5

(Composé 31)

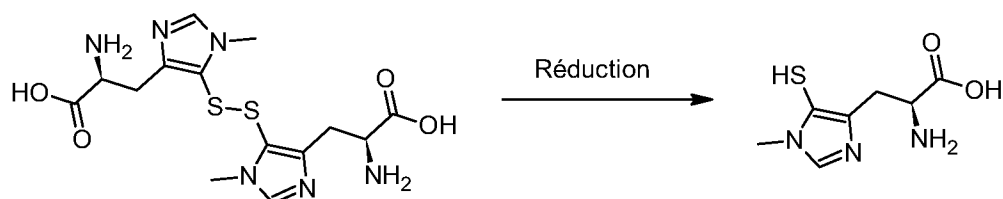


La 1-méthyl-L-histidine (0,84 g ; 5 mmoles; 1 éq.) est  
 10 dissoute dans 35 ml d'eau déminéralisée et une solution  
 d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (835 µl (10 mmoles;  
 2 éq.) est ajoutée ; puis la solution est refroidie à 1°C.  
 L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide  
 (1,17 g ; 6,5 mmoles; 1,3 éq.) est ajouté rapidement. Après  
 15 3 minutes, l'acide thioacétique (2,57 ml ; 2,74 g; 35  
 mmoles; 7 éq.) est ajouté très rapidement. L'agitation est  
 maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes. La solution  
 est extraite avec 40 ml d'acétate d'éthyle puis l'acide 3-  
 mercaptopropionique (2,2 ml ; 2,65 g; 25 mmoles; 5 éq.) est  
 20 ajouté à la phase aqueuse. L'hydrolyse est effectuée par  
 chauffage à 100°C pendant 20h. Après refroidissement de la  
 solution, le milieu réactionnel est extrait par 4 fois 35  
 ml d'acétate d'éthyle. Après oxydation et purification avec  
 la résine DOWEX 50WX2-400, le disulfure de la L-1-méthyl-L-  
 25 5-sulfanylhistidine (Composé 31) (740 mg, 65%, 90 % par  
 rapport à la quantité de l'intermédiaire SAC) est obtenu  
 sous forme d'une poudre marron.

RMN- $H^1$  ( $D_2O+DCI$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,14 (m, 2x2H); 3,85  
 30 (s, 2x3H) ; 4,17 (m, 2x1H) ; 8,89 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 401,1 [M+H] $^+$

## Préparation de l'iso-ovothiol A (Composé 32)



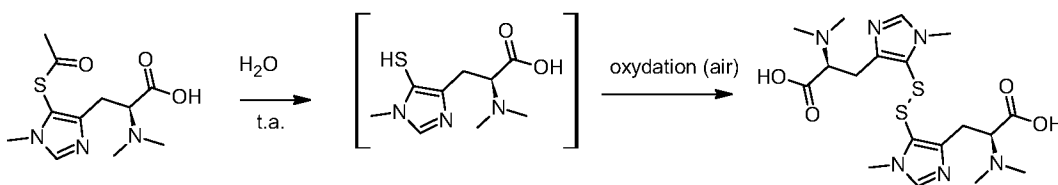
Composé 32

Le disulfure de la L-5-sulfanyl-1-méthyl-histidine (Composé 25) (427 mg ; 0,52 mmoles, 1 éq.) est mis en suspension dans 25 ml de méthanol. Le milieu est chauffé à 50°C puis le dithiothréitol (299 mg ; 1,92 mmoles; 2 éq.) est ajouté. Après agitation pendant 1h à température ambiante et précipitation avec de l'éther éthylique, la L-5-sulfanyl-1-méthyl-histidine (Iso-ovothiol A, Composé 32) (295 mg ; 69%) est obtenue sous forme d'une poudre légèrement grisâtre.

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,19 (dd,  $J=15,7$  Hz,  $J=7,2$  Hz, 1H) ; 3,29 (dd,  $J=15,7$  Hz,  $J=5,2$  Hz, 1H) ; 3,66 (s, 3H) ; 4,09 (dd,  $J=7,1$  Hz,  $J=5,2$  Hz, 1H) ; 8,33 (s, 1H).

LCMS (APCI): 202,1 [M+H] $^+$

Exemple 32 : Préparation du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-histidine via hydrolyse du dérivé 5-acetylsulfanyl- $\alpha,N,N$ (diméthyl)-1-méthyl-histidine suivi par oxydation à l'air (Composé 33)



Composé 33

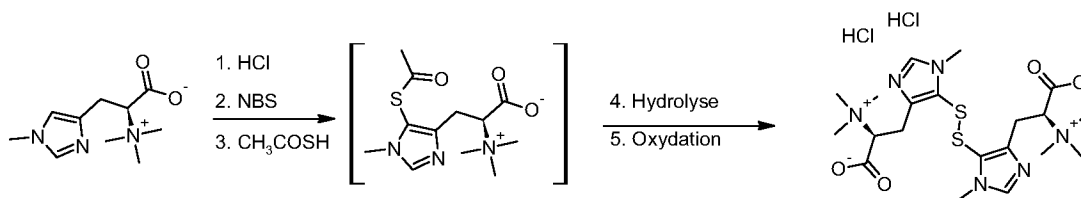
Le composé 5 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 8. 180 mg (0,63 mmoles, 1 éq.) du composé 5 sont solubilisés dans 20 ml d'eau. La solution limpide est agitée en présence de l'oxygène pendant 20h à température ambiante. Après lyophilisation, le disulfure de

la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 33, 98%) est obtenu sous forme d'un solide amorphe verdâtre.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2,97 (s, 2x6H) ; 3,17 (m, 2x1H) ; 3,28 (dd, J=15,8 Hz et J=4,3 Hz, 2x1H) ; 3,69 (s, 2x3H) ; 4,00 (m, 2x1H) ; 8,44 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 457,2 [M+H] $^+$ .

Exemple 33 : Préparation « one pot » du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 34 dichlorhydrate) via préparation *in-situ* de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-histidine suivi par hydrolyse et oxydation



15

Composé 34x2HCl

La 1-méthyl-hercynine (510 mg, 2 mmoles; 1 équ.) est dissoute dans 15 ml d'eau déminéralisée contenant une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% (170  $\mu\text{l}$ , 2 mmoles; 1 équ.), puis la solution est refroidie à 0°C. L'agitation est maintenue très forte. Le N-bromosuccinimide (465 mg, 2,6 mmoles; 1,3 équ.) est ajouté rapidement. Après 3 minutes, l'acide thioacétique (740  $\mu\text{l}$ , 10 mmoles; 5 équ.) est ajouté très rapidement. L'agitation est maintenue vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes. Le mélange est extrait avec 2x20 ml d'acétate d'éthyle puis diluée dans 160 ml d'un mélange acétate d'éthyle/éthanol (3/1) pour purification sur une colonne de silice (acétate d'éthyle/éthanol/eau 2/2/1). L'huile légèrement rose obtenu est oxydé avec le diméthyle sulfoxyde (140  $\mu\text{l}$ , 2 mmoles, 1 équ.) dans une solution d'acide acétique glacial. La solution est chauffée pendant une heure à 80°C. Le dichlorhydrate du disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-histidine (composé 34) est obtenu après purification sur colonne de silice (acétate

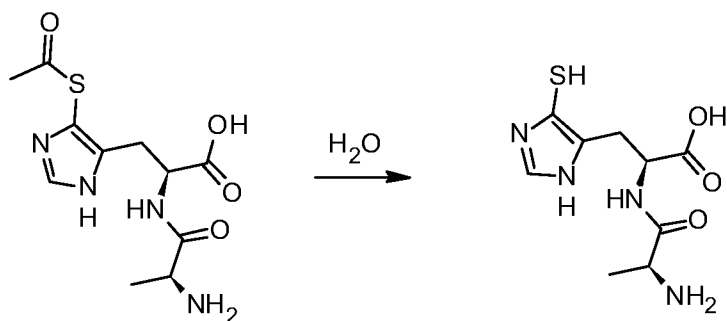
d'éthyle/éthanol/eau 2/2/1 puis élution par l'acide chlorhydrique 0,5M) sous forme d'une huile légèrement jaune (110 mg, 10%).

5 RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3,30 (s, 2x9H) ; 3,61 (dd, J=14,1 Hz et 3,4 Hz, 2x1H) ; 3,72 (m, 2x1H) ; 3,73 (s, 2x3H) ; 4,09 (dd, J=12,2 Hz et 3,4 Hz, 2x1H) ; 8,98 (s, 2x1H).

LCMS (APCI): 485,1 [M+H]<sup>+</sup>

10

**Exemple 34 : Préparation du dérivé L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(L-alanyl)-histidine (Composé 35) par hydrolyse du composé 5-acylsulfanyl**



Composé 35

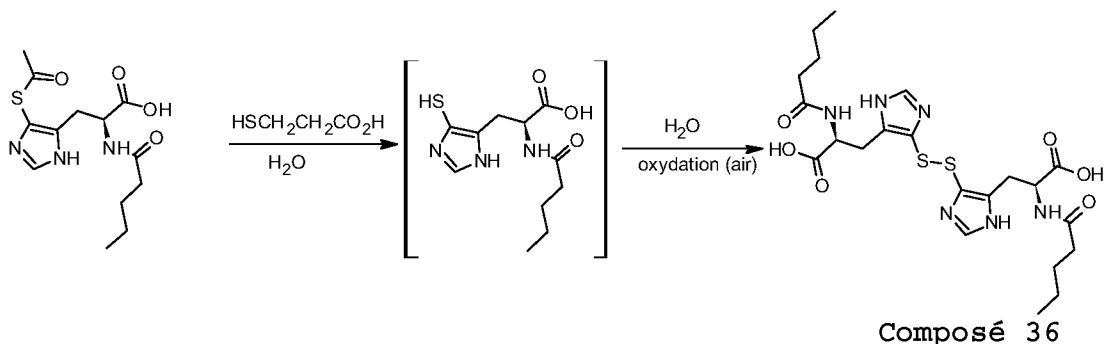
15

Le composé 7 est préparé et purifié par colonne comme décrit dans l'exemple 10. 340 mg (1 mmol, 1 éq.) du composé 7 sont solubilisés dans 20 ml d'eau. La solution limpide est agitée à l'abri de l'oxygène pendant 6 jours à  
20 température ambiante. Après évaporation à sec, la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(L-alanyl)-histidine (Composé 35, 92%) est obtenu sous forme d'un solide amorphe beige.

RMN- $H^1$  ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,42 (d, J=7,2 Hz, 3H) ;  
25 3,12 (dd, J=15,2 et J=8,0 Hz, 1H) ; 3,22 (dd, J=15,2 Hz et J=6,2 Hz, 1H) ; 4,05 (q, J=7,2 Hz, 1H) ; 4,65 (m, 1H) ; 8,71 (s, 1H).

LCMS (APCI): 258,9 [M+H]<sup>+</sup>

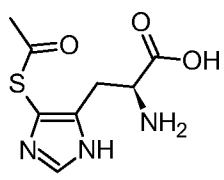
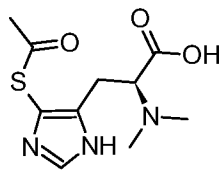
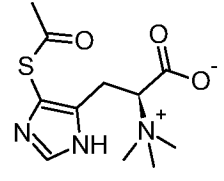
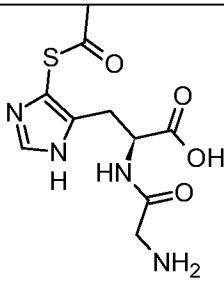
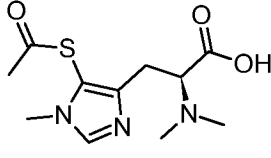
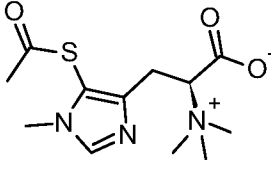
Exemple 35 : Préparation du disulfure de la 5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (Composé 36) par hydrolyse et oxydation du composé 5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine

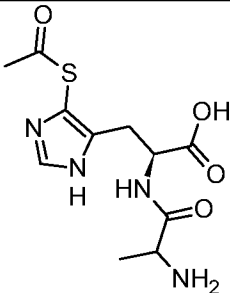
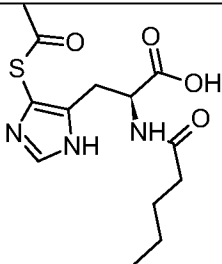
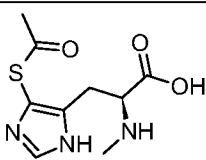
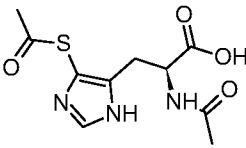
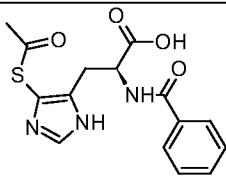
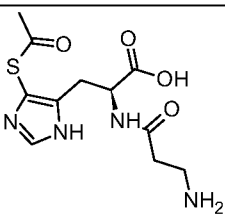
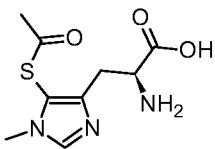


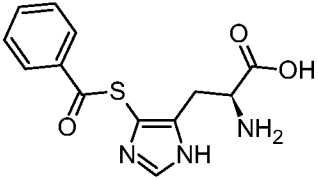
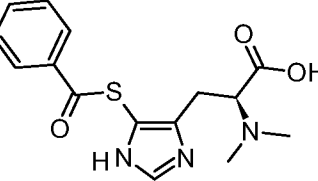
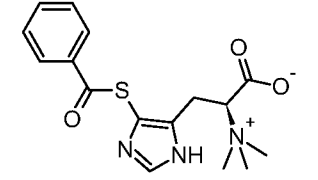
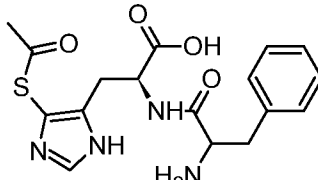
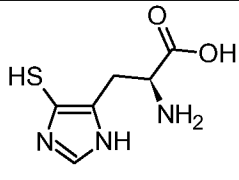
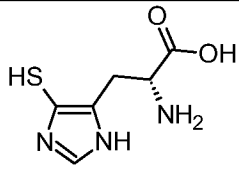
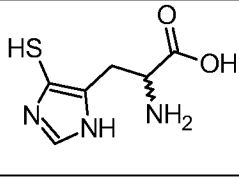
Le dérivé 5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (composé 8) est préparé et purifié comme décrit dans l'exemple 11. 320mg (0,9 mmoles; 1 éq.) du composé 8 sont solubilisés dans 8,0 ml d'eau déminéralisée. L'acide 3-mercaptopropionique (400  $\mu$ l, 4,60 mmoles; 5 éq.) est ajouté. La solution est chauffée à 90°C pendant 3h. Le mélange réactionnel est extrait avec 4x10 ml d'acétate d'éthyle, puis la phase aqueuse est évaporée à sec. Le résidu est mis en solution dans 10ml d'eau. La solution est chauffée à 90°C sous agitation pendant 2 heures puis à température ambiante pendant 18 heures. Après évaporation à sec, le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (Composé 36) est obtenu sous la forme d'une laque orange (44%).

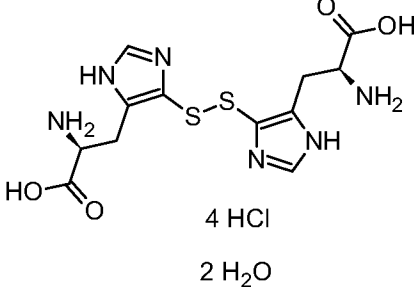
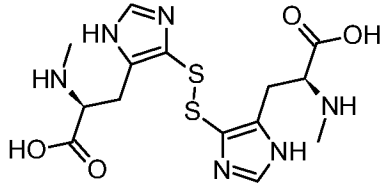
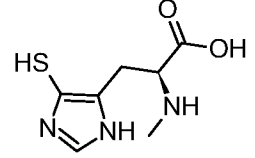
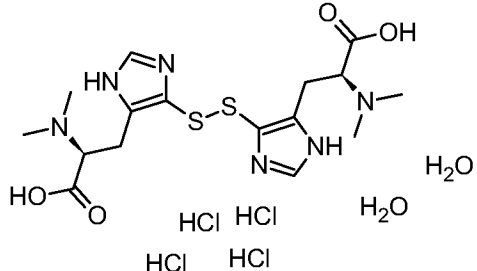
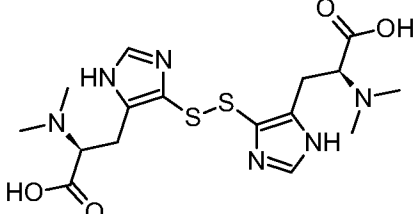
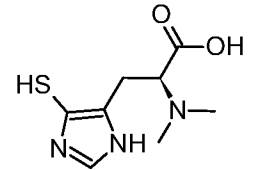
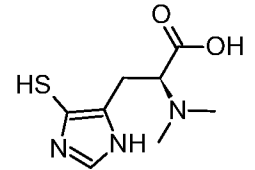
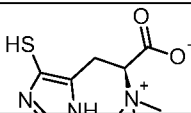
LCMS (APCI): 541,2 [M+H]<sup>+</sup>

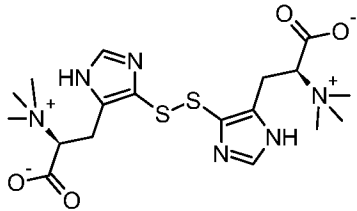
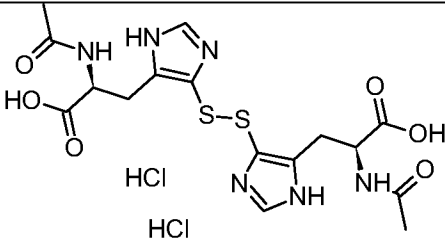
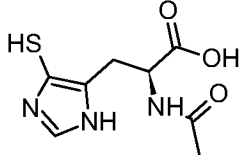
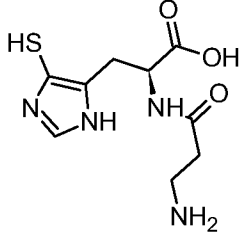
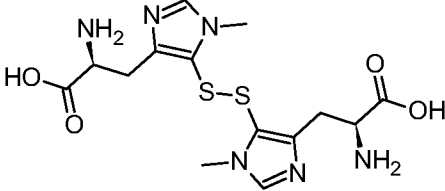
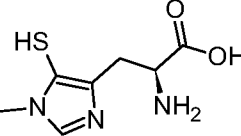
Tableau 5 : Récapitulatif des exemples :

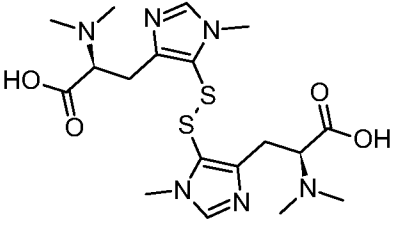
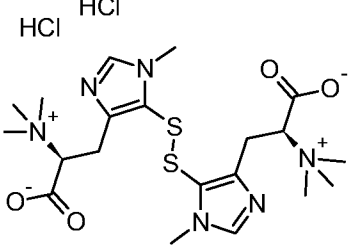
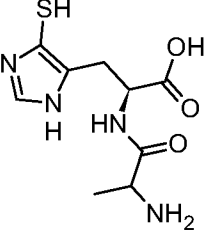
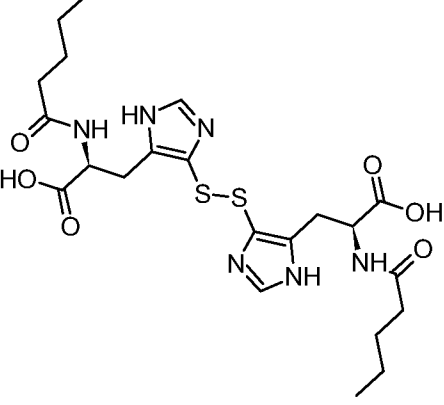
Exemple	Composé préparé	Structure
1	1	
2	1	
3	2	
4	2	
5	3	
6	3	
7	4	
8	5	
9	6	

10	7	
11	8	
12	9	
13	10	
14	11	
15	12	
16	13	
17	13	

18	14	
19	15	
20	16	
21	17	
22	18	
23	19	
24	20	

25	21 x 4HClx2H <sub>2</sub> O	 <p>4 HCl 2 H<sub>2</sub>O</p>
26a	22	
26b	23	
27a	24 x 4HClx2H <sub>2</sub> O	 <p>HCl HCl HCl HCl H<sub>2</sub>O H<sub>2</sub>O</p>
27b	24	
27c	25	
27d	25	
28a	26	

28b	26	
28c	26	
28d	27	
28e	27	
28f	27	
29a	28x2HCl	
29b	29	
30	30	
31a	31	
31b	32	

<p>32</p>	<p>33</p>	
<p>33</p>	<p>34x2HCl</p>	
<p>34</p>	<p>35</p>	
<p>35</p>	<p>36</p>	

REVENDICATIONS

1. Composé de type 5-acylsulfanyl-histidine et ses  
dérivés répondant à la formule générale (I)  
5 suivante :



(I)

Dans laquelle :

15  $R^1 = H$ , alkyle, en particulier  $CH_3$  ;  
 $R^2 = R^3 = H$ , alkyle, en particulier  $CH_3$  ;  
 $R^4 = H$ , alkyle, en particulier méthyle,  
 alkyle(C=O), alkyle substitué(C=O), aryle(C=O) ;  $\beta$ -  
 alanyle ( $H_2NCH_2CH_2(C=O)$ ) ;  $\alpha$ -amino-acyle ;  
 20  $R^5 =$  alkyle, en particulier  $CH_3$  ; phényle ;  
 ainsi que tous les stéréoisomères,  
 diastéréoisomères et énantiomères notamment au niveau de  
 l'atome de carbone portant le groupement  $COOH$ , pris  
 isolément ou en mélange ; et tous les sels d'acides  
 25 pharmaceutiquement acceptables dudit composé de formule  
 générale (I).

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce  
que  $R^4$  représente hydrogène, ou le groupe  $CH_3$ , ou le  
30 groupe acétyle, ou le groupe benzoyle, ou le groupe  
 $\beta$ -alanyle ( $H_2NCH_2CH_2(C=O)$ ) ;

3. Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé  
en ce qu'il est choisi parmi le groupe consistant  
35 de :

la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1) ;

- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine  
(Composé 2) ;
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine  
(Composé 3) ;
- 5 la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(glyciny)-histidine  
(Composé 4)
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl-1-méthyl-  
histidine (Composé 5)
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-  
10 histidine (Composé 6)
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(alanyl)-histidine  
(Composé 7)
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine  
(Composé 8)
- 15 la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine  
(Composé 9) ;
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine  
(Composé 10) ;
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(benzoyl)-histidine  
20 (Composé 11) ;
- la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N( $\beta$ -alanyl)-histidine  
(Composé 12) ;
- la L-1-méthyl-5-acétylsulfanyl-histidine  
(Composé 13) ;
- 25 la L-5-benzoylsulfanyl-histidine (Composé 14) ;
- la L-5-benzoylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine  
(Composé 15) ;
- la L-5-benzoylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine  
(Composé 16)
- 30 la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N(phenylalanyl)-histidine  
(Composé 17) .

4. Composé selon l'une des revendications précédentes,  
caractérisé en ce que l'acide pharmaceutiquement  
35 acceptable précité est choisi parmi un acide minéral  
tel que chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique,  
sulfurique, tartrique, phosphorique ou parmi un

acide organique tel que l'acide formique, acétique, trifluoro-acétique, propionique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique ; un acide alcane-sulfonique tel que un acide méthane-sulfonique, trifluorométhane-sulfonique, éthane-sulfonique, un acide aryl-sulfonique tel que l'acide benzène- et paratoluène-sulfonique.

10

5. Procédé (A) de préparation du nouveau composé de type 5-acylsulfanyl-histidine et ses dérivés de formule générale (I), selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 1) La réaction de l'histidine, racémique (DL) ou l'un de ses énantiomères (D ou L), ou - l'un de ses dérivés alkylé sur l'azote en position 1 du noyau imidazole, racémique (DL) ou l'un de ses énantiomères (D ou L),

20

ou

- l'un de ses dérivés alkylé ou acylé sur l'azote de la fonction  $\alpha$ -amine, racémique (DL) ou l'un de ses énantiomères (D ou L),

ou

25 - l'un de ses dérivés alkylé sur l'azote en position 1 du noyau imidazole et alkylé ou acylé sur l'azote de la fonction  $\alpha$ -amine, racémique (DL) ou l'un de ses énantiomères (D ou L),

en présence de 1 à 2 équivalents d'acide minéral ou  
30 organique, avec

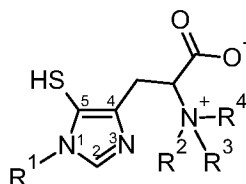
a) un agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  dans un solvant protique polaire, à température comprise entre 0-25°, puis avec

b) un réactif soufré de type acide carbothioïque de  
35 formule alkyle  $C(=O)SH$  ou l'un de ses sels dans un solvant protique polaire,

puis

- 2) éventuellement la purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.
- 5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  est choisi parmi :
- du brome  $Br_2$ , en tant que réactif commercial ou préparé *in situ*; ou
- 10 du NBS ou tout dérivé N-bromo-imide et N-bromo-amide
7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que le solvant protique polaire est de l'eau ou
- 15 une solution aqueuse.
8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que le réactif soufré de type acide carbothioïque est choisi parmi l'acide
- 20 thioacétique, l'acide thiobenzoïque, le thioacétate de potassium, ou leurs mélanges.
9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la température est comprise
- 25 entre 0-5°C.
10. Utilisation du composé de type 5-acylsulfanyl-histidine et de ses dérivés répondant à la formule générale (I) tel que défini à l'une des
- 30 revendications 1 à 4 pour la fabrication de composé de type 5-sulfanylhistidine et de ses dérivés répondant à la formule générale (II) suivante :

35



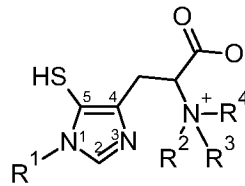
66

(II)

Dans laquelle :

$R^1$  à  $R^4$  étant tels que précédemment définis à l'une des revendications 1 à 4, étant entendu que lorsque  $R^1 = H$  alors  $R^2$ ,  $R^3$  et  $R^4$  ne peuvent pas être simultanément H.

11. Composé de type 5-sulfanylhistidine et ses dérivés répondant à la formule générale (II) suivante :



15

(II)

Dans laquelle :

$R^1$  à  $R^4$  étant tels que précédemment définis à l'une des revendications 1 à 4; étant entendu que lorsque  $R^1 = H$  alors  $R^2$ ,  $R^3$  et  $R^4$  ne peuvent pas être simultanément H.

Ainsi que tous les stéréo-isomères, diastéréoisomères et énantiomères notamment au niveau de l'atome de carbone portant le groupement COOH, ainsi que tous les disulfures correspondants, pris isolément ou en mélange ; tous les sels d'acides pharmaceutiquement acceptables desdits composés de formule générale (II).

12. Composé de formule générale (II), selon la revendication 11, caractérisé en ce que  $R^4$  représente hydrogène, ou le groupe méthyle, ou le groupe acétyle, ou le groupe benzoyle, ou le groupe  $\beta$ -alanyle ( $H_2NCH_2CH_2(C=O)$  ;

35

13. Composé de formule générale (II), selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe consistant de :
- le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 22) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(méthyl)-histidine (Composé 23) ;
  - le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 24) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-histidine (Composé 25) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 26) ;
  - le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-histidine (Composé 27) ;
  - le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ N(acétyl)-histidine (Composé 28) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(acétyl)-histidine (Composé 29) ;
  - la L-5-sulfanylcarnosine (Composé 30) ;
  - le disulfure de l'iso-ovothiol A (Composé 31) ;
  - l'iso-ovothiol A (Composé 32) ;
  - le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N(diméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 33) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N,N,N(triméthyl)-1-méthyl-histidine (Composé 34) ;
  - la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(alanyl)-histidine (Composé 35) ;
  - et
  - le disulfure de la L-5-sulfanyl- $\alpha$ ,N(pentanoyl)-histidine (Composé 36)
14. Composé de formule générale (II), selon la revendication 11, 12 ou 13, caractérisé en ce que l'acide pharmaceutiquement acceptable précité est choisi parmi un acide minéral tel que chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique, sulfurique, tartrique, phosphorique ou parmi un acide organique tel que l'acide formique, acétique, trifluoro-acétique, propionique, benzoïque, maléique, fumarique,

succinique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique ; un acide alcane-sulfonique tel que un acide méthane-sulfonique, trifluorométhane-sulfonique, éthane-sulfonique, un acide aryl-sulfonique tel que l'acide benzène- et paratoluène-sulfonique.

15 15. Procédé (B) de préparation des composés de type 5-sulfanylhistidine et de leurs dérivés de formule générale  
10 (II) obtenus à partir des composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et de leurs dérivés de formule générale (I) décrit dans le procédé A selon l'une des revendications 5 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

1) Soit directement (procédé B1) :

15 e) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à température supérieure à 20°C en présence d'un thiol,

20 f) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

2) Soit indirectement (procédé B2) :

25 f) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à une température supérieure à 20°C pour obtenir le disulfure correspondant,

30 g) puis réduction du disulfure par réaction avec un thiol,

h) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

35

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le solvant protique polaire est choisi parmi l'eau ou une solution aqueuse.
- 5 17. Procédé selon les revendications 15 ou 16, caractérisé en ce que le thiol est choisi parmi l'acide mercaptopropionique, le dithiothréitol ou leurs mélanges.
- 10 18. Procédé selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé en ce que la température est comprise entre 20 et 130°C.
- 15 19. Procédé (C) de préparation de disulfures des 5-sulfanylhistidines et de leurs dérivés définis à l'une des revendications 15 à 18, caractérisé en ce que les dits disulfures sont préparés :
- 20 i) soit directement à partir des composés de type 5-acylsulfanyl-histidine et de leurs dérivés de formule générale (I) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 25 a) hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine de formule générale (I) obtenus selon l'invention dans un solvant protique polaire par agitation à l'air et à une température supérieure à 20°C pour obtenir le disulfure correspondant,
- 30 b) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art ;
- ii) soit à partir de 5-sulfanylhistidines et de leurs dérivés de formule générale (II) caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 35 c) oxydation de la 5-sulfanylhistidine ou de ses dérivés par l'oxygène ou le diméthylsulfoxyde ou

toute autre méthode d'oxydation bien connue de l'Homme de l'Art,

d) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

20. Procédé (D) en « one-pot » de préparation des dérivés 5-sulfanylhistidines et leurs disulfures correspondants à partir des dérivés histidines correspondants, en combinant les procédés (A) avec (B) ou avec (C) tels que précédemment définis respectivement aux revendications 5 à 9 ; 15 à 18 et 19, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

en présence de 1 à 2 équivalents d'acide minéral ou organique, la réaction avec

c) un agent générateur d'ion halogénium  $X^+$  dans un solvant protique polaire, à température comprise entre 0-25°, puis avec

d) un réactif soufré de type acide carbothioïque de formule  $alkyleC(=O)SH$  ou l'un de ses sels dans un solvant protique polaire, suivie de

1) Soit :

g) l'hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus dans un solvant protique polaire par agitation à température comprise entre 70 et 130°C en présence d'un thiol,

h) puis éventuellement la purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

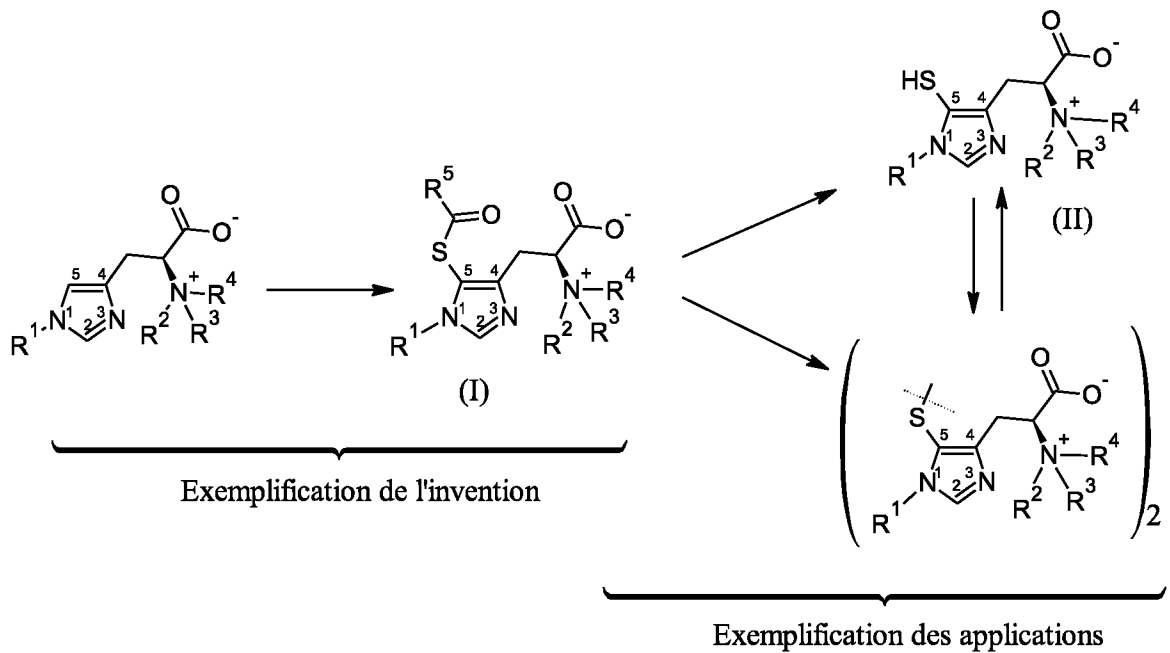
2) Soit :

j) par hydrolyse des dérivés 5-acylsulfanyl-histidine obtenus dans un solvant protique polaire par agitation à une température comprise

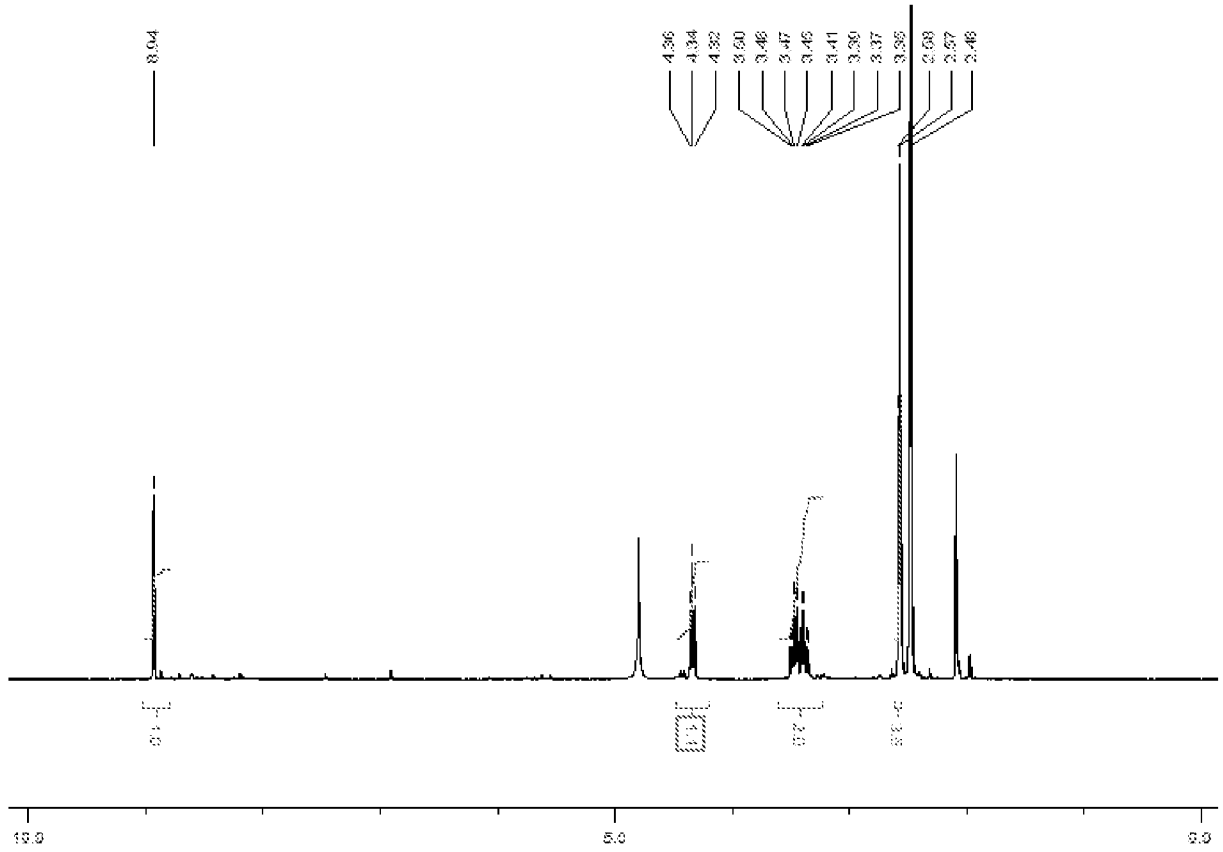
entre 70 et 130°C pour obtenir le disulfure correspondant,

- 5 k) puis éventuellement purification par chromatographie liquide sur colonne ou tout autre méthode de purification bien connue de l'Homme de l'Art.

**Figure 1 :** Schéma de synthèse des nouveaux composés 5-acylsulfanyl-histidines en tant que précurseurs des 5-sulfanylhistidines correspondantes et de leurs disulfures

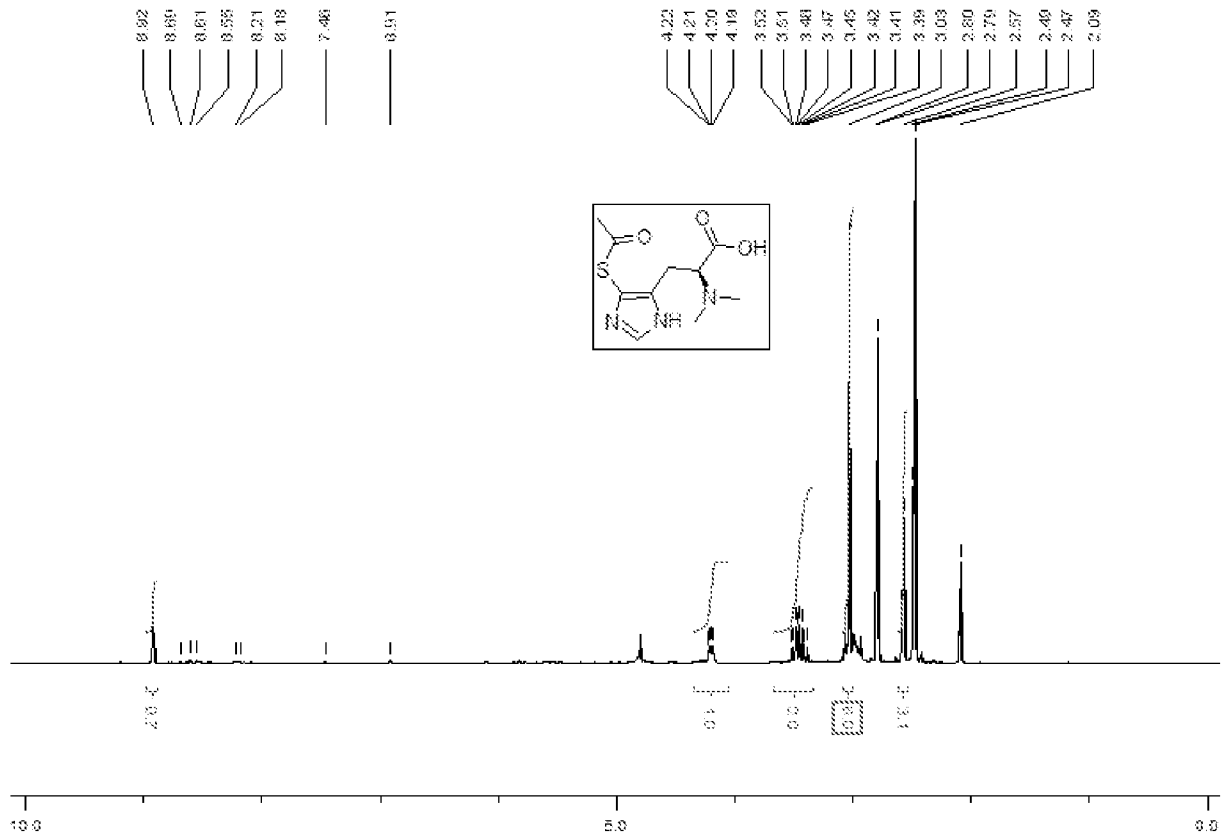


**Figure 2 :** Spectre représentatif (RMN-H<sup>1</sup>, 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 1, préparation de la L-5-acétylsulfanyl-histidine (Composé 1)



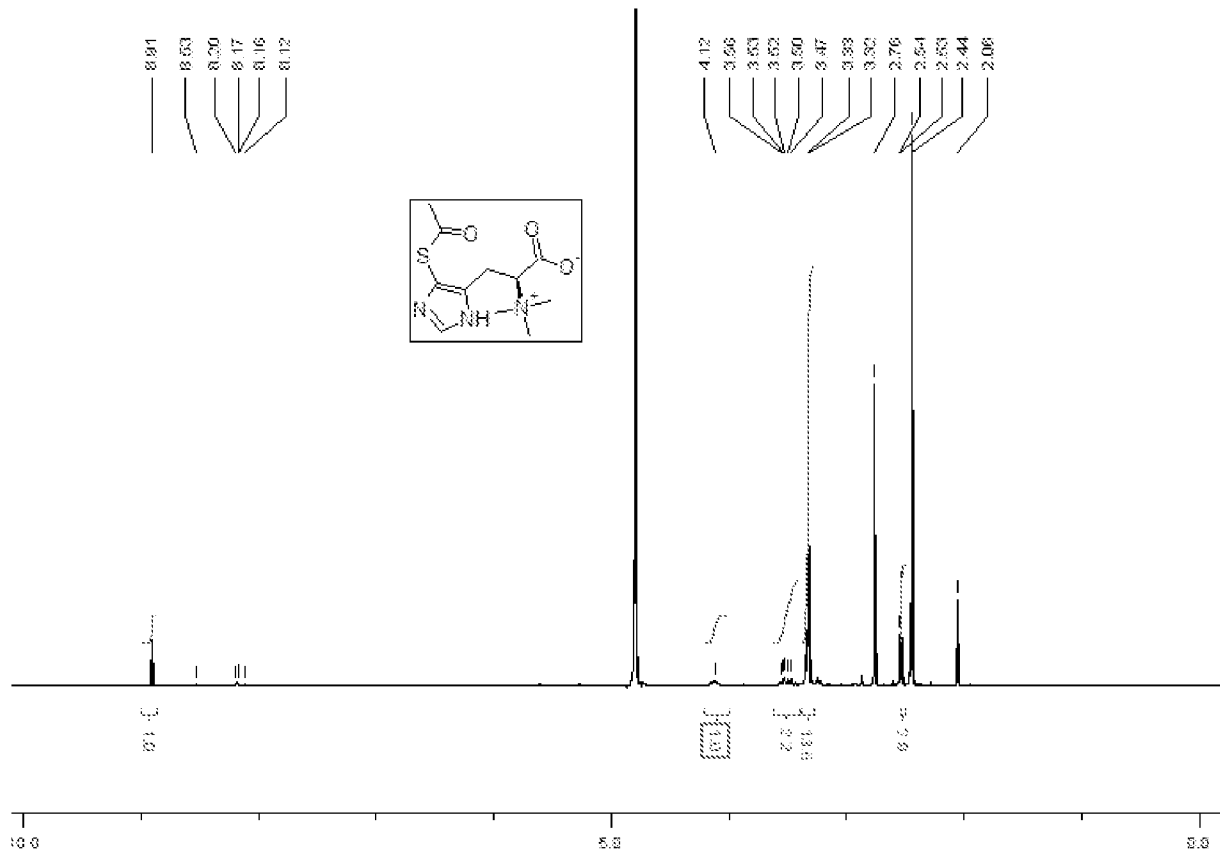
3/4

**Figure 3 :** Spectre représentatif (RMN-H<sup>1</sup>, 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 3, préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha$ ,N,N-diméthyl-histidine (Composé 2)



4/4

**Figure 4 :** Spectre représentatif (RMN- $H^1$ , 400MHz) du mélange réactionnel obtenu dans l'exemple 5, préparation de la L-5-acétylsulfanyl- $\alpha,N,N,N$ -triméthyl-histidine (Composé 3)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2015/051416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D233/84 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANDREAS SPALTENSTEIN ET AL: "New synthesis of 4- and 5-imidazolethiols", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 52, no. 14, 1 July 1987 (1987-07-01), pages 2977-2979, XP055137821, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo00390a004	11-14,19
A	page 2977; compounds 5, 6 page 2978; compound 8	1-10, 15-18,20
A	HENG SONG ET AL: "Regioselectivity of the Oxidative C-S Bond Formation in Ergothioneine and Ovothiol Biosyntheses", ORGANIC LETTERS, vol. 15, no. 18, 20 September 2013 (2013-09-20), pages 4854-4857, XP055138255, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/o1402275t page 4855; compound (8)	1-20
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  10 August 2015	Date of mailing of the international search report  19/08/2015	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Jeanjean, Fabien	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OHBA M ET AL: "Synthetic Studies on the Starfish Alkaloid Imbricatin. A Chiral Synthesis of Tri-O-methylimbricatin", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 16, 16 April 1999 (1999-04-16), pages 4999-5016, XP004161084, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00199-4 page 5002; compounds 26a,b, 27, 28a,b -----	1-20
A	PING LIU ET AL: "Discovery of MK-3168: A PET Tracer for Imaging Brain Fatty Acid Amide Hydrolase", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 4, no. 6, 13 June 2013 (2013-06-13), pages 509-513, XP055138171, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ml4000996 page 511; compounds 22-25 -----	1-20
A	TOD P. HOLLER ET AL: "Synthesis and structure reassignment of mercaptohistidines of marine origin. Syntheses of L-ovothiols A and C", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 52, no. 19, 1 September 1987 (1987-09-01), pages 4420-4421, XP055138088, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo00228a060 page 4420 -----	1-20
Y	SHOSUKE ITO ET AL: "Structures of Adenochromins A and B, the Iron(III) binding Amino-acids of a Unique Group of Peptides, Adenochromes from Octopus vulgaris", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, 1 January 1976 (1976-01-01), pages 1042-1043, XP055206868, page 1043; compounds (2), (3) -----	11-14,19
A		1-10, 15-18,20

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE                  INV. C07D233/84                  ADD.</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)                  C07D</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)                  EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ANDREAS SPALTENSTEIN ET AL: "New synthesis of 4- and 5-imidazolethiols", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 52, no. 14, 1 juillet 1987 (1987-07-01), pages 2977-2979, XP055137821, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo00390a004	11-14,19
A	page 2977; composés 5, 6 page 2978; composé 8 ----- -/--	1-10, 15-18,20
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span></p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p style="text-align: center;">10 août 2015</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">19/08/2015</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2                  NL - 2280 HV Rijswijk                  Tel. (+31-70) 340-2040,                  Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align: center;">Jeanjean, Fabien</p>

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HENG SONG ET AL: "Regioselectivity of the Oxidative C-S Bond Formation in Ergothioneine and Ovothiol Biosyntheses", ORGANIC LETTERS, vol. 15, no. 18, 20 septembre 2013 (2013-09-20), pages 4854-4857, XP055138255, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/ol402275t page 4855; composé (8)	1-20
A	OHBA M ET AL: "Synthetic Studies on the Starfish Alkaloid Imbricatine. A Chiral Synthesis of Tri-O-methylimbricatine", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 16, 16 avril 1999 (1999-04-16), pages 4999-5016, XP004161084, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00199-4 page 5002; composés 26a,b, 27, 28a,b	1-20
A	PING LIU ET AL: "Discovery of MK-3168: A PET Tracer for Imaging Brain Fatty Acid Amide Hydrolase", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 4, no. 6, 13 juin 2013 (2013-06-13), pages 509-513, XP055138171, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ml4000996 page 511; composés 22-25	1-20
A	TOD P. HOLLER ET AL: "Synthesis and structure reassignment of mercaptohistidines of marine origin. Syntheses of L-ovothiols A and C", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 52, no. 19, 1 septembre 1987 (1987-09-01), pages 4420-4421, XP055138088, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo00228a060 page 4420	1-20
Y	SHOSUKE ITO ET AL: "Structures of Adenochromnines A and B, the Iron(III) binding Amino-acids of a Unique Group of Peptides, Adenochromes from Octopus vulgaris", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, 1 janvier 1976 (1976-01-01), pages 1042-1043, XP055206868, page 1043; composés (2), (3)	11-14,19
A		1-10, 15-18,20