



11 N.º de publicación: ES 2 020 148  
21 Número de solicitud: 9001578  
51 Int. Cl.<sup>5</sup>: C07K 5/06  
//A61K 7/50

12

## PATENTE DE INVENCION

A6

22 Fecha de presentación: 07.06.90

73 Titular/es: Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano 117  
28006 Madrid, ES

45 Fecha de anuncio de la concesión: 16.07.91

72 Inventor/es: Infante, M. Rosa;  
Molinero, Josefina y  
Erra, Pilar

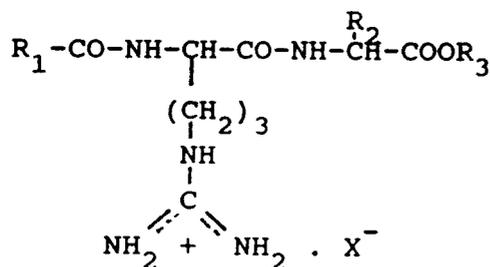
45 Fecha de publicación del folleto de patente: 16.07.91

74 Agente: No consta

54 Título: Procedimiento para la síntesis de dipéptidos de N- $\alpha$ -acil arginina de cadena grasa y amino-ácidos puros como tensioactivos iónicos de acción antimicrobiana.

57 Resumen:

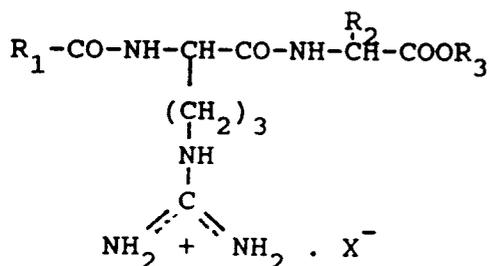
El procedimiento para la síntesis de dipéptidos de N- $\alpha$ -acil arginina de cadena grasa y amino-ácidos puros como tensioactivos iónicos de acción antimicrobiana está relacionado con la preparación de tensioactivos lipopeptídicos en los que la parte hidrofílica está formada por un dipéptido cuyo aminoácido portador del grupo carbonilo al enlace peptídico es arginina y la parte hidrofóbica está constituida por un ácido graso unido al grupo -amino libre de la arginina a través de un enlace acilo según el esquema de la fórmula.



Estos dipéptidos son aplicables en múltiples áreas industriales: cosmética, dermofarmacia, alimentación, biotecnología, etc.

## DESCRIPCION

La presente invención está relacionada con la síntesis de tensioactivos lipopeptídicos antimicrobianos y más particularmente con una familia de N<sup>α</sup>-acil dipéptidos en los que la parte hidrofílica está formada por un dipéptido cuyo aminoácido portador del grupo carbonilo al enlace peptídico es arginina y la parte hidrofóbica está constituida por un ácido graso unido al grupo α-amino libre de la arginina a través de un enlace acilo según el esquema [I]



Estos tensioactivos pueden ser catiónicos o anfóteros y en cualquier caso presentan unas excelentes propiedades antimicrobianas y no son irritantes. Además son capaces de formar micelas, cristales líquidos, emulsiones y microemulsiones cuya tecnología es aplicable en múltiples áreas industriales: cosmética, demofarmacia, alimentación, biotecnología, etc.

Es bien conocido que materiales tales como cosméticos, productos dermafarmacéuticos, alimentos, etc. son fácilmente atacados por microorganismos descomponiéndose con el tiempo si no se encuentran debidamente protegidos.

Para estos fines existen diferentes antihongos o antisépticos. No obstante o bien estos compuestos no inhiben totalmente el crecimiento microbiano o bien adolecen la irritabilidad o toxicidad. Entre las investigaciones conducentes a la obtención de agentes antisépticos o antihongos no irritantes los tensioactivos derivados de material proteico han despertado mucho interés especialmente en los últimos años, no solamente por la simplicidad de su estructura sino por la multifuncionalidad que presentan.

Hasta ahora la mayoría de trabajos publicados y patentes registradas acerca de tensioactivos derivados de aminoácidos y/o péptidos con actividad antimicrobiana se ha centrado en el estudio y aplicación de derivados de N<sup>α</sup>-acil aminoácidos obtenidos de la condensación de un ácido graso al grupo α-amino del aminoácido en forma de éster. Entre los derivados más destacados figuran los derivados del Acido Glutámico, Sarcosina, Lisina y Arginina ( ) los cuales están N<sup>α</sup>-Acilados con ácidos grasos de cadena comprendida entre 12 y 16 átomos de carbono.

Hasta el año 1964 no se encuentra en la literatura ningún dato acerca de la actividad antimicrobiana de péptidos anfílicos no cíclicos obtenidos por vía sintética. Fue Molin N. quien primero presentó los datos de actividad antimicrobiana del éster etílico de N<sup>α</sup>-Palmitoil-Lis-Lis y más tarde Kupryszewski, D. en el año 1976 confirma estos mismos resultados asociando la

actividad antimicrobiana de estos derivados dipéptidos a los siguientes requisitos estructurales

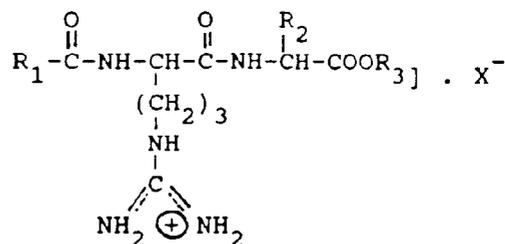
- el grupo α-amino terminal acilado con el ácido palmítico
- los dos ω-amino libres y protonados
- los residuos de lisina unidos por un enlace peptídico
- el grupo α-carboxilo esterificado.

En otras palabras, la consecuencia tensioactivo-base peptídica poder antimicrobiano parecía estar asociada solo a aquellos derivados de aminoácido y/o péptido que tuvieran características de tensioactivo catiónico.

En 1986 Infante, M<sup>á</sup>R. patenta un procedimiento para la síntesis de dipéptidos de N-Acil Arginina de cadena grasa e hidrolizados de proteína como tensioactivos iónicos de acción antimicrobiana. La naturaleza iónica de estos tensioactivos podía ser catiónica y/o anfótera en función de la naturaleza química del grupo carboxilo. Estos tensioactivos presentaron la ventaja sobre lo anteriormente publicado y/o patentado de ser tensioactivos de base peptídica antimicrobianos y de naturaleza anfotérica y en consecuencia menos irritantes que cualquier otro tensioactivo catiónico de base peptídica.

Hay que indicar que las moléculas cuya patente se solicita son semejantes a las patentadas por Infante, M<sup>á</sup>R en 1986. Estas últimas químicamente pueden considerarse como una mezcla polidispersa de derivados de dipéptidos de Arginina acilada con un ácido graso mientras que las que presentamos como novedad son derivados de Arginina acilada con ácido graso de estructura química definida y homogénea. Se ha conseguido potenciar sus propiedades antimicrobianas manteniéndose sus índices de irritabilidad muy bajos y en algún caso nulo.

La presente invención está relacionada con la preparación de tensioactivos lipopeptídicos en los que la parte hidrofílica está formada por un dipéptido cuyo aminoácido portador del grupo carbonilo al enlace peptídico es arginina y la parte hidrofóbica está constituida por un ácido graso unido al grupo α-amino libre de la arginina a través de un enlace acilo según el esquema de la fórmula.



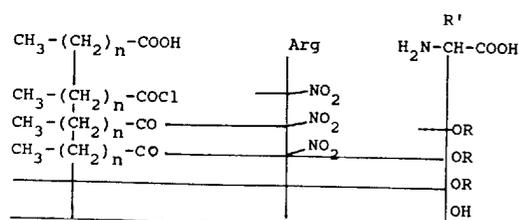
En donde

- R<sub>1</sub> es una cadena lineal hidrocarbonada de 9 a 17 átomos de carbono, saturada o insaturada pudiendo contener hidroxisustituyentes.

- R<sub>2</sub> es la cadena lateral de un aminoácido, pudiendo ser uno o cualquiera de los 20 aminoácidos naturales: H- para la Glicina, HO-CH<sub>2</sub>- para la Serina, φ-CH<sub>2</sub> para la Fenilalanina, etc.
- R<sub>3</sub> es un resto alquílico de cadena corta o un monocatión incluido H<sup>+</sup>.
- X<sup>-</sup>: Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup>

La naturaleza iónica de estas moléculas depende fundamentalmente del sustituyente R<sub>3</sub>. Serán catiónicas si R<sub>3</sub> es un resto alquílico. Serán anfóteras si R<sub>3</sub> es un monocatión.

Se obtienen por la condensación del derivado graso de N<sup>α</sup>-Acil Arginina y el éster alquílico (me, Et ó Pro) de un aminoácido puro lutilizando para ello el método de condensación del anhídrido mixto tal y como se indica en la siguiente esquema:



La presente invención engloba entre otros la preparación de los siguientes compuestos:

1. nitro-Arinina.
2. N<sup>α</sup>-Decil, N<sup>α</sup>-Dodecil, N<sup>α</sup>-Tetradecil ó N<sup>α</sup>-Hexadecil nitro Arginina.
3. Esteres metílico, etílico o propílico de aminoácido.
4. Esteres alquílicos de dipéptidos de N<sup>α</sup>-Decil, N<sup>α</sup>-Dodecil, N<sup>α</sup>-Tetradecil ó N<sup>α</sup>-Hexadecil nitro Arginina.
5. Esteres alquílicos de dipéptidos de NN<sup>α</sup>-Decil, N<sup>α</sup>-Dodecil, N<sup>α</sup>-Tetradecil ó N<sup>α</sup>-Hexadecil Arginina.
6. Dipéptidos de N<sup>α</sup>-Decil, N<sup>α</sup>-Dodecil, N<sup>α</sup>-Tetradecil ó N<sup>α</sup>-Hexadecil Arginina.

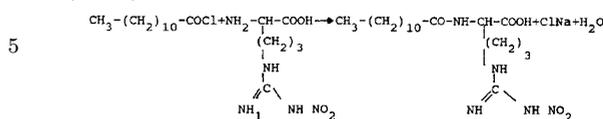
La importancia de esta síntesis reside fundamentalmente en las propiedades tensioactivas y antimicrobianas que presenta el producto final en cada caso así como en las características naturales de su estructura química compatible con las estructuras proteicas de la piel human.

A modo de ejemplo y sin que ello limite el procedimiento, describiremos con detalle la síntesis de los siguientes compuestos

1. Clorhidrato del éster metílico de N<sup>α</sup> - Lauroil - Arginil - Fenilalanina (derivado catiónico)
2. Clorhidrato de N<sup>α</sup> - Lauroil - Arginil - Fenilalanina (derivado anfótero)

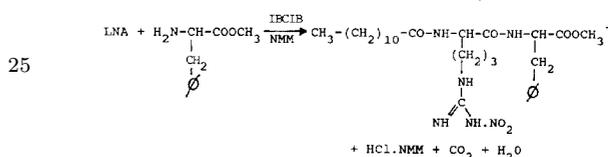
### Ejemplo 1

#### 1. Preparación de la N -Lauroil-nitro Arginina (LNA)



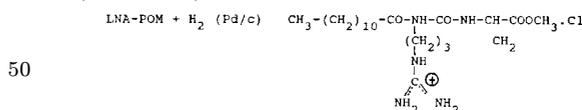
Se suspenden 45 g de Nitroarginina en una mezcla agua/acetona y se añade la cantidad equivalente de NaOH. La solución se enfría a -5°C y se añaden 53.8 ml de cloruro de lauroilo y un ligero exceso de NaOH de manera que el pH se mantenga entre 11 y 13. Acabada la adición, la mezcla de reacción se deja unas horas a 0°C y después se añade HCl 1N hasta pH ácido. Aparece un sólido blanco que se filtra y se lava hasta pH neutro. Se seca y se cristaliza en etanol/agua. Rto: 60%, pf: 174-178°C, [α]<sub>20</sub> = 4.4° (c=1, metanol).

#### 2. Preparación del éster metílico de la N -Lauroil nitro-Arginil-Fenilalanina (LNA-POM)



Cantidades equimoleculares de LNA (8.5 g) y N-metil morfolina (NMM) se disuelven en 50 ml de Dimetilformamida (DMF) seca. La mezcla se enfría y se añaden lentamente 2.9 ml de Isobutil cloroformiato (IBClF). La mezcla resultante se agita energicamente e inmediatamente después se añade una solución que contiene la cantidad equimolecular del éster metílico de la Fenilalanina disuelta en 100 ml de DMF. La mezcla de reacción así preparada se mantiene en agitación durante 1h en frío y 24 h más a temperatura ambiente. El solvente se evapora y el residuo se lava con bicarbonato sódico a 5%, HCl 0.1N y agua. De esta manera se obtiene el LNA-POM con un 70% de rendimiento. pf: 102-107°C.

#### 3. Preparación del clorhidrato del éster metílico de la N-Lauroil-Arginil-Fenilalanina (LA-POM)



5 g del sólido anterior se disuelven en 50 ml de ácido formico y se hidrogena sobre 1 g de Pd/c durante 6 horas.

El derivado desprotegido en forma de sal fórmica, se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de Metanol/Cloroformo en diferentes proporciones. De esta manera se obtiene 4 g de un sólido muy higroscópico que cristaliza en HCl (MeOH)/Eter Etilico y que corresponde al LA POM en forma de clorhidrato.

La estructura del compuesto se determina por análisis elemental, H<sup>1</sup>-RMN, EM-FAB, análisis automático de aminoácidos.

Determinaciones de propiedades tensioactivas

fundamentales, antimicrobianas e irritantes (test de Draize), indicaron que se trataba de un tensioactivo antimicrobiano, no irritante.

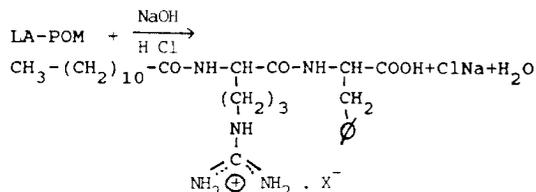
Todos los datos correspondientes a las características de la síntesis, características del compuesto y sus propiedades se indican en la Tabla I y II.

### Ejemplo 2

Síntesis del clorhidrato de N<sup>α</sup>-Lauroil-Arginil-Fenilalanina (LA-POH)

La obtención del derivado LA-POH se obtuvo sin diferencias acusables por dos vías diferentes:

a) Por saponificación directa del LA-POM



1g de LA POM, obtenido según el procedimiento descrito anteriormente se disuelve en 10 ml de metanol y en frío se añaden 3.2 ml de NaOH 1N. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas después de las cuales aparece un sólido blanco el cual se lava con agua repetidas veces hasta pH neutro. Este sólido se disuelve en HCl (MeOH) en una relación molar 1/4 y se añade Eter Etilico hasta turbidez. Precipita un sólido muy higroscópico que se purifica en columna de gel de sílice y que corresponde, tras las oportunas determinaciones estructurales al compuesto LA-POH objeto de la síntesis. Tras la purificación en columna, el rendimiento de la reacción es un 50%.

b) Por saponificación de LNA-POM y posterior hidrogenación  
2.25 g de LNa-POM se suspenden en 9.91 ml de NaOH 0.5N. La solución se agita durante 3 h a 30°C. Se enfría y se agrega HCl 1N hasta pH 1.5-2. Aparece 2.15 de un sólido blanco que se lava con agua y se seca y que corresponde al derivado LNa-goh, el cual se somete a hidrogenación tal y como se describe en el método a) ya descrito.

Análogamente al compuesto anterior, todos los datos se indican en la Tabla I y II.

Tabla I. Características de los compuestos sintetizados

Compuesto	Rto.	Análisis Elemental		
		% C	% H	% N
LA POM peso molecular 553.5	60 %	teórico 58.79 esp. 58.85	8.75 8.85	12.25 12.21

Tabla I (Continuación)

Compuesto	Rto.	Análisis Elemental		
		teórico	exp.	
LA-POH peso molecular 539.5	a) 50 %  b) 60 %	58.12 57.45	8.61 8.74	12.56 12.86

Tabla I (Continuación)

Compuesto	pf (° C)	[α] <sub>20°C</sub> <sup>D</sup>
LA POM peso molecular 553.5	35-39°C	C= 1, metanol  -1.68°C
LA-POH peso molecular 539.5	62-62°C	-1.60°C

Tabla II. Tensión superficial estabilizada (δ), concentración micelar crítica (cmc) y concentración mínima inhibitoria (MIC) de LA-POM y LA-POH.

Compuesto	γ m New/m	cmc moles/l
LA POM	34.6	1.5x10 <sup>-3</sup>
LA-POH	30.0	0.25x10 <sup>-3</sup>

Tabla II Continuación)

Compuesto	MIC (g/ml)					
	1	2	3	4	5	6
LA POM	16	4	4	16	16	256

Tabla II Continuación)

Compuesto	MIC (g/ml)					
	1	2	3	4	5	6
LA.POH	4	4	2	4	4	128

- 1: Candida Albicans, CCM<sup>(1)</sup>;
- 2: Staphylococcus epidermidis ATCC 12228;
- 3: Micrococcus aurantiacus ATCC 11731;
- 4: Bacillus subtilis ATCC6623
- 5: Escherichia coli ATCC;
- 6: Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145.

(1) Cátedra Microbiología. Facultad Farmacia de Barcelona.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

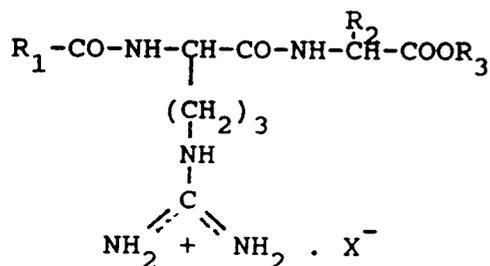
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. "Procedimiento para la síntesis de dipéptidos de N - Acil arginina de cadena grasa y amino ácidos puros (ácidos básicos o neutros) como ten-



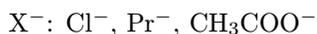
en donde

R<sub>1</sub> es una cadena lineal hidrocarbonada de 9 a 17 átomos de carbono, saturada o insaturada pudiendo contener hidroxilo sustituyentes.

R<sub>2</sub> es la cadena lateral de aminoácido, pudiendo ser uno cualquiera de los 20 aminoácidos naturales:

H- para la glicina, HO-CH<sub>2</sub>- para la Serina, φ-CH<sub>2</sub> para la Fenilalanina, etc.

R<sub>3</sub> es un resto alquílico de cadena corta o un monocatión incluido H<sup>+</sup>



**Caracterizado** porque en una primera etapa tiene lugar la condensación del cloruro de ácido graso al derivado de aminoácido nitro-arginina. En una segunda etapa tiene lugar la formación del dipéptido por condensación de un segundo aminoácido en forma de éster al compuesto N - acil nitro arginina de cadena grasa y por último y en una tercera etapa tiene lugar fundamentalmente la reducción del grupo nitro del N<sup>α</sup> - acil nitro arginil-aminoácido por hidrogenación catalítica y/o saponificación del grupo éster del aminoácido terminal.

2. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** por utilizar como aminoácido de partida L-Arg, D-Arg, ó DL-Arg.

3. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** por utilizar como protector del grupo guanidino de la arginina el grupo nitro.

4. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** por utilizar cloruros de ácido graso lineales, puros o mezcla saturados, insaturados o hidroxisustituidos de 10 a 18 átomos de carbono como acilantes de la nitro arginina en un medio hidroalcohólico de pH: 9-10.

5. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** por utilizar ésteres alquílicos de cadena corta de aminoácidos puros para formar los dipéptidos de N<sup>α</sup>-Acil arginina de cadena grasa objeto de la presente patente.

6. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** por la condensación de la N<sup>α</sup>-Acil nitro arginina con el éster del aminoácido puro para obtener el N<sup>α</sup>-Acil nitro arginil -aminoácido tiene lugar a través de la formación de un anhidrido mixto de la forma siguiente: Durante 90 segundos y en frío se mezclan equimolecularmente Isobutil cloroformiato, N-metil morfolina y N<sup>α</sup>-acil nitro arginina en presencia de dimetilformamida. A continuación se añade a esta mezcla el éster del aminoácido previamente neutralizado con N-metil morfolina, dejándola en agitación hasta un máximo de 24 h a temperatura ambiente.

7. Un procedimiento según reivindicación 1 y 6 **caracterizado** porque la purificación de los dipéptidos de N - acil nitro arginina se lleva a cabo fácilmente por extracciones orgánicas y acuosas.

8. Un procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la desprotección del grupo nitro para la consecución de los dipéptidos anfílicos objeto de la presente patente tiene lugar con hidrógeno gas en un medio que contiene Pd/c y ácido fórmico.

9. Un procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la desprotección de los derivados esterificados para formar los derivados con grupo -carboxilo terminal libre tiene lugar por saponificación directa de los ésteres de N<sup>α</sup> - acil-arg-aminoácidos en un medio alcohólico que contiene NaOH.

10. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque la purificación extrema de los productos tiene lugar por cromatografía en columna, utilizando un sistema de gradiente de

Procedimiento para la obtención de dipéptidos de N<sup>α</sup>-Acil arginina de cadena grasa y aminoácidos puros como tensioactivos iónicos, solubles en agua, biodegradables, no irritantes y de acción antimicrobiana.