

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 149**

21 Número de solicitud: 201931007

51 Int. Cl.:

C07K 5/103 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.11.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.05.2021

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (95.0%)**

C/ Serrano,117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (5.0%)

72 Inventor/es:

GARCÍA DEL PORTILLO, Francisco;

RICO PÉREZ, Gadea;

RAMOS MARQUÉS, Estel;

SAN-FÉLIX GARCÍA, Ana;

VELÁZQUEZ DÍAZ, Sonsoles;

DE LA PUENTE SECADES, Sofía;

GARCÍA DOYAGÜEZ, Elisa;

DE CASTRO DE LA OSA, Sonia y

PUCCIARELLI MORRONE, María Graciela

74 Agente/Representante:

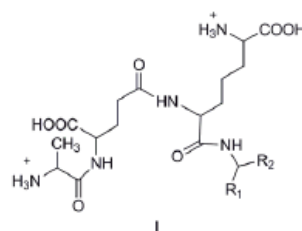
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PÉPTIDOS QUE CONTIENEN D-ALANINA (D-ALA) O AMINOALCOHOLES RELACIONADOS**

57 Resumen:

Péptidos que contienen D-Alanina (D-Ala) o aminoalcoholes relacionados.

La invención se refiere a péptidos de fórmula general I, donde el extremo carboxilo terminal (D-Alanina, D-Ala) es reemplazado por un aminoalcohol análogo. La invención también se refiere a su procedimiento de síntesis y al uso de los péptidos mencionados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.



DESCRIPCIÓN

**PÉPTIDOS QUE CONTIENEN D-ALANINA (D-ALA) O AMINOALCOHOLES
RELACIONADOS**

5

La invención se refiere a péptidos de fórmula general I, donde el extremo carboxilo terminal (D-Alanina, D-Ala) se ha sustituido por un aminoalcohol análogo. La invención también se refiere a su procedimiento de síntesis y al uso de los péptidos mencionados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

El peptidoglicano es un componente esencial de la pared celular de la mayoría de las bacterias. En células de mamífero, la inmunidad innata controla infecciones bacterianas intracelulares mediante el reconocimiento de los fragmentos de peptidoglicano por receptores citosólicos denominados proteína 1 y 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD1 y NOD2). Ambos receptores tienen un patrón de reconocimiento diferente. La unión de los fragmentos de peptidoglicano a estos receptores culmina en la activación del regulador de la respuesta inflamatoria, NFκB (Caruso *et al.*, 2014; Keestra-Gounder *et al.*, 2016; Keestra-Gounder y Tsolis, 2017).

El receptor NOD1 es expresado por todos los tipos de células, incluyendo células inmunitarias y no inmunitarias, tales como epiteliales y fibroblastos (Caruso *et al.*, 2014). El fragmento mínimo de peptidoglicano reconocido por NOD1 es el dipéptido ácido D-glutámico-meso-ácido diaminopimélico (D-Glu-meso-DAP) (Girardin *et al.*, 2003).

La bacteria Gram-negativa *Salmonella enterica* (*S. enterica*) causa infecciones intracelulares que producen patologías gastrointestinales tras el consumo de alimentos o agua contaminados (Monack, 2012; Rivera-Chavez y Baumler, 2015; Thiennimitr *et al.*, 2012). Este patógeno también puede causar infecciones asintomáticas crónicas y persistentes en seres humanos y en ganado (Monack, 2012).

Usando un modelo *in vitro* de infección basado en el uso de fibroblastos, se ha demostrado que *S. enterica* "persiste" dentro de estas células sin ser destruida por los

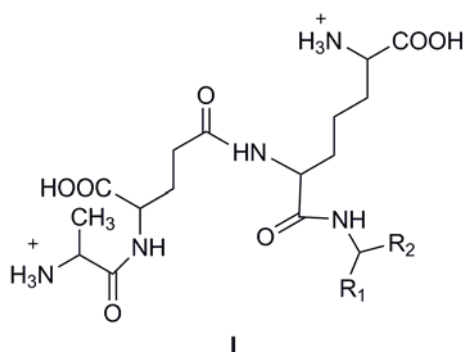
sistemas de defensa. Durante esta infección persistente, se aisló una pequeña cantidad de peptidoglicano de bacterias intracelulares. La masa molecular (m/z) de un fragmento del peptidoglicano no convencional aislado era de 928,42 Da. Esta masa molecular corresponde con una sustitución del aminoácido terminal D-alanina [D-Ala: - NHCH(CH₃)COOH], presente en el tetrapéptido convencional **1 (PGN-1)** por un aminoalcohol similar. Por lo tanto, la masa molecular podría corresponder con una molécula de [N-acetil-glucosamina-N-acetil-muramil]-D-alanina(D-Ala)-D-ácido glutámico(D-Glu)-*meso*-DAP-**X**, en la que **X** podría ser D-alanilol (NHCH(CH₃)CH₂OH), presente en el tetrapéptido **2 (PGN-2)**; o 1-amino-2-propanol (NHCH₂CH(OH)CH₃), presente en el tetrapéptido **3 (PGN-3)**. El resto **X** estaría unido al resto de la molécula a través de su grupo NH₂. Este tipo de modificación, que se detecta "exclusivamente" cuando el patógeno está dentro de la célula eucariota, podría tener consecuencias en el reconocimiento del péptido no convencional resultante por NOD1. La defensa atenuada observada en fibroblastos infectados por *Salmonella* podría deberse a la falta de reconocimiento del péptido modificado por NOD1 o, como alternativa, podría deberse a la inactivación del receptor de NOD1 por el péptido modificado. En cualquiera de los dos escenarios, NFκB de los fibroblastos infectados por *Salmonella* muestra un bajo grado de activación. Este tipo de alteración ha sido observada previamente por nuestro grupo de investigación (Ramos-Marquès, *et al.* "Virulence", 2017, 8, 719-740).

Para demostrar si la modificación con aminoalcohol del tetrapéptido convencional **PGN-1** altera su reconocimiento por NOD1 se requieren cantidades de los tetrapéptidos no convencionales mencionados anteriormente mucho mayores a las obtenidas a partir de bacterias intracelulares.

Por lo tanto, sería deseable tener un método de síntesis para obtener grandes cantidades de estos tetrapéptidos no convencionales para probarlos como moduladores de los estados de inflamación, en especial, como inhibidores de NOD1. Estos compuestos podrían considerarse una alternativa a los antiinflamatorios de tipo esteroideo, muchos de los cuales presentan bastantes efectos secundarios.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

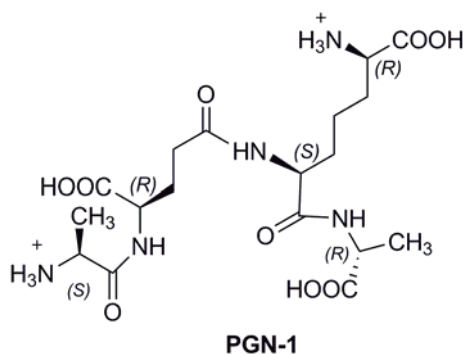
Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general I:



donde:

R_1 es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;

- 5 R_2 es C_{1-4} alquilo, $-OR_3$ o $-COOR_3$, donde C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible; y
 cada R_3 es independientemente hidrógeno o C_{1-4} alquilo,
 con la condición de que el compuesto **PGN-1** se excluye de la definición de fórmula general I:



10

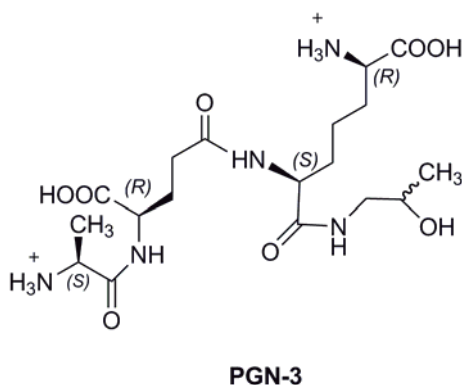
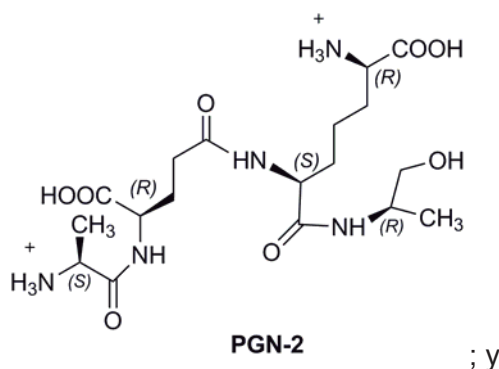
En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I, donde R_1 es metilo.

- 15 En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I, donde R_2 es C_{1-4} alquilo o $-OR_3$, y C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible.

En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I, donde R_3 es hidrógeno.

20

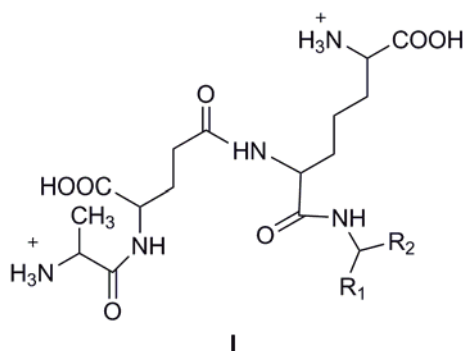
En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I, seleccionado entre:



Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general I.

5

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un proceso de obtención de un compuesto de fórmula general I:



donde:

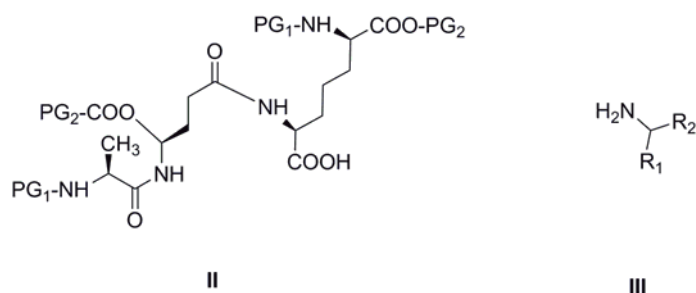
10 R_1 es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;

R_2 es C_{1-4} alquilo, $-OR_3$ o $-COOR_3$, donde C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible; y

cada R_3 es independientemente hidrógeno o C_{1-4} alquilo,

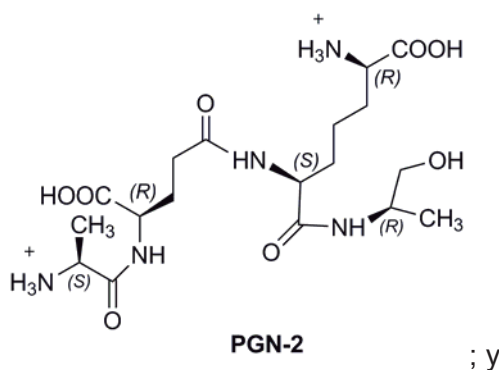
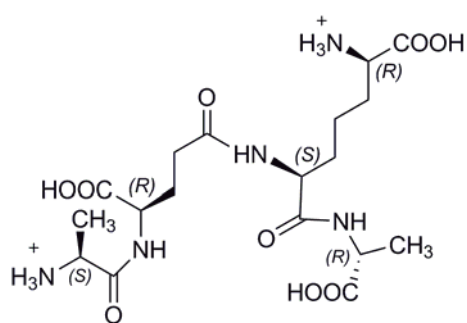
15 que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula II y un compuesto de fórmula III en presencia de una base, preferentemente DIPEA, y un reactivo de

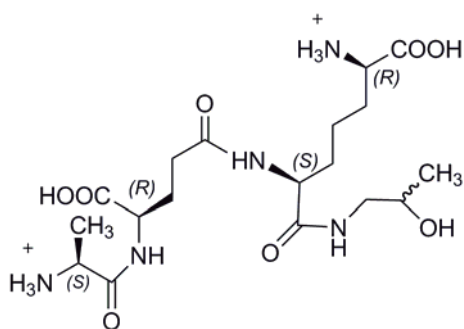
acoplamiento, preferentemente seleccionado entre HBTU y HATU:



donde R_1 y R_2 tienen el significado descrito anteriormente para un compuesto
 5 de fórmula I, y PG_1 y PG_2 representan respectivamente grupos protectores de amina y
 ácido carboxílico, seguida de la eliminación de los grupos protectores PG_1 y PG_2 .

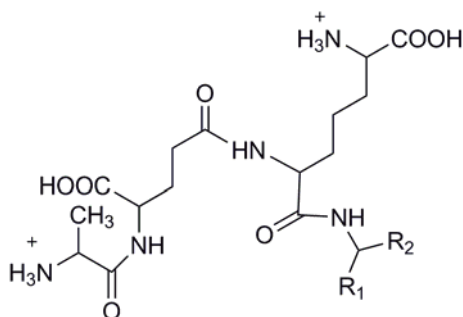
En otra realización, la invención se refiere al proceso de obtención de un
 compuesto de fórmula general I, donde el compuesto de fórmula general I se
 10 selecciona entre:





PGN-3

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula general I o a una composición farmacéutica del mismo:



I

5 donde:

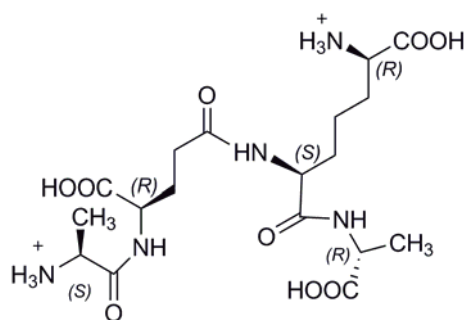
R₁ es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;

R₂ es C₁₋₄ alquilo, -OR₃ o -COOR₃, donde C₁₋₄ alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo -OR₃ en cualquier posición disponible; y

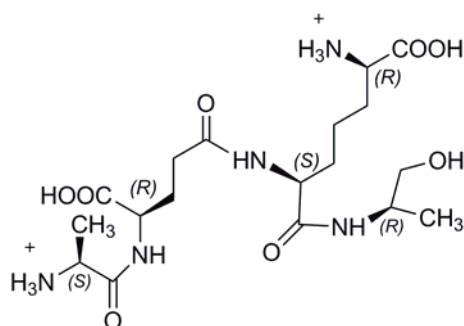
10 cada R₃ es independientemente hidrógeno o C₁₋₄ alquilo,

para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que cursa con inflamación.

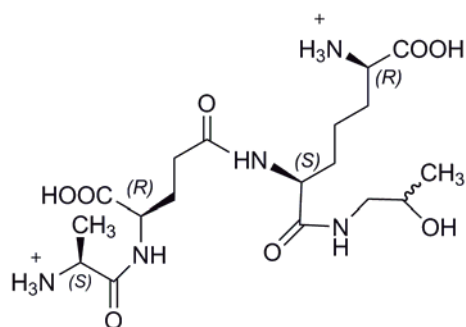
En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I
15 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad inflamatoria, donde el compuesto se selecciona entre:



PGN-1



PGN-2



PGN-3

En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad cursada con inflamación, donde la inflamación se selecciona entre infecciones microbianas y reacciones alérgicas a formulaciones derivadas de la pared celular microbiana que contienen peptidoglicano, y trastornos inmunitarios y autoinmunitarios.

10 En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones microbianas y, preferentemente, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones microbianas con patología inflamatoria asociada donde el agente etiológico se selecciona entre bacterias, virus, hongos y protozoos.

15

En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I

para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas seleccionadas entre salmonelosis, listeriosis y enfermedades causadas por patógenos bacterianos intracelulares que producen un peptidoglicano que contiene *meso*-DAP reconocido por NOD1.

5

En otra realización, la invención se refiere al compuesto de fórmula general I para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos inmunitarios y autoinmunitarios seleccionados entre enfermedades inflamatorias del intestino y artropatías.

10

En la presente invención, el término “C₁₋₄ alquilo”, como un grupo o parte de un grupo, significa una cadena de alquilo lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono e incluye los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y *terc*-butilo.

15

El grupo protector “PG₁” se refiere a un grupo protector amino. Los ejemplos incluyen, entre otros, grupos protectores *terc*-butilooxicarbonilo (BOC) o carboxibencilo (Cbz).

20

El grupo protector ácido carboxílico “PG₂” incluye, entre otros, *terc*-butilo, metilo, etilo y bencilo.

25

El reactivo de acoplamiento incluye, entre otros, HATU (hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio-3-óxido o Hexafluorofosfato Azabenzotriazol Tetrametil Uronio), HBTU ((hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP).

30

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de los tetrapéptidos de fórmula general I plantea un gran reto sintético, ya que todos ellos tienen en su estructura un resto de ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP), un aminoácido inusual con dos centros estereogénicos que tienen diferente estereoquímica y se sustituyen de manera diferente. Además de una vía sintética alternativa, la presente invención incluye la caracterización inequívoca, mediante RMN y espectrometría de masas, de los compuestos sintetizados.

35

Los tetrapéptidos **PGN-1**, **PGN-2** y **PGN-3** se sintetizaron como se indica en el Esquema 3 para ser ensayados como agonistas/antagonistas de la proteína 1 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (Nod 1) que está implicada en las respuestas inflamatorias contra los patógenos microbianos. Esta síntesis se ve
 5 obstaculizada por la dificultad que supone la obtención del fragmento de ácido *meso*-2,6-diaminopimérico (DAP), presente en las estructuras de estos compuestos. DAP es un aminoácido inusual con dos centros quirales con diferente estereoquímica, dos grupos amina y dos carboxilo. La síntesis de derivados de DAP supone un gran reto sintético ya que implica una selección cuidadosa de los grupos protectores
 10 (ortogonalmente) de los dos grupos carboxílico y amina presentes en su estructura para introducir selectivamente las modificaciones deseadas. Además, es fundamental el uso de condiciones de reacción adecuadas para evitar la racemización y controlar la quiralidad de los compuestos diana.

15 El fragmento DAP se preparó mediante una reacción de metátesis cruzada de olefinas entre derivados de alilglicina y vinilglicina adecuadamente protegidos usando un catalizador Grubb de segunda generación, seguida de la reducción del doble enlace del producto de acoplamiento cruzado resultante.

20 La síntesis comenzó cuando el compuesto Boc-(D)-alilglicina-OtBu **2**, obtenido por tratamiento de (D)-alilglicina con Boc-anhídrido y *tert*-butil-2,2,2-tricloroacetimidato (Deborah *et al.*, 2003), se hizo reaccionar durante la noche con un pequeño exceso (2,7 eq) del reactivo comercial Cbz-vinilglicina-OMe **3** en presencia del catalizador de Grubbs de segunda generación, proporcionando el producto de
 25 acoplamiento cruzado **4** con un rendimiento aceptable (50 %) (Esquema 1) (Žiga *et al.*, 2013). La hidrogenación catalítica de **4**, en presencia de Pd/C en acetato de etilo, dio lugar a la reducción del doble enlace con la eliminación simultánea del grupo protector *N*-benciloxycarbonilo (Cbz), obteniéndose el derivado de DAP **5** (% cuant.). Dicho compuesto es un intermedio de reacción clave porque posee un grupo amino libre,
 30 ideal para su funcionalización. El acoplamiento de **5** con Fmoc-D-Glu-OtBu en presencia de hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio-3-óxido (HATU) como reactivo de acoplamiento y *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA) como base condujo al dipéptido **6** (67 %) (Esquema 2). El tratamiento de **6** con piperidina en DMF (20 %), para eliminar el grupo protector Fmoc, condujo a un
 35 intermedio con un grupo amino libre que se hizo reaccionar de inmediato, sin purificación, con Fmoc-D-Glu-OtBu en presencia de HATU y DIPEA, para dar el

tripéptido **7**. El tratamiento de **7** con LiOH/H₂O, seguido de acidificación a pH = 2, condujo con rendimiento cuantitativo al compuesto **8** (Esquema 2), con un grupo ácido carboxílico libre, que es el producto intermedio clave de las etapas sintéticas posteriores. A continuación, el intermedio **8** se hizo reaccionar respectivamente con H-
5 D-Ala-OtBu, *terc*-butil-D-alaninol y *terc*-butil-1-amino-2-propanol en presencia de HATU/DIPEA, obteniéndose los tetrapéptidos correspondientes **9** (68 %), **10** (60 %) y **11** (65 %) (Esquema 3). El posterior tratamiento con TFA en diclorometano (20 %), para eliminar simultáneamente los grupos protectores Boc y *terc*-butilo, proporcionó los **PGN-1**, **PGN-2** y **PGN-3** con rendimiento cuantitativo (Esquema 3). Las sales de
10 cloruro se obtuvieron mediante el tratamiento de una solución del péptido correspondiente en agua con varias gotas de ácido clorhídrico (37 %) y posterior liofilización.

La caracterización de estos compuestos se realizó mediante espectroscopia de
15 RMN de ¹H y ¹³C y HRMS.

Con los tetrapéptidos obtenidos, se llevarán a cabo estudios de actividad biológica tanto en modelos de cultivo celular como en modelos de ratones transgénicos deficientes en este receptor que poseen indicadores para medir la
20 actividad NFκB.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente
25 invención. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención resultarán evidentes
30 para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Efecto de los péptidos **PGN-1**, **PGN-2** y **PGN-3** en la estimulación de la cascada de señalización de NOD1/NF- κ B. Se microinyectaron los péptidos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de ratones transgénicos que expresaban GFP-p65. La translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B se controló mediante microscopía de fluorescencia. Los péptidos se microinyectaron en una solución que contenía dextrano rojo Texas (70 kDa), que sirvió como indicador para identificar las células microinyectadas.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos. A menos que se indique lo contrario, se usaron reactivos y disolventes comerciales tal y como se recibieron de los proveedores sin purificación adicional. Los disolventes usados en algunas reacciones se secaron antes de su uso. La DMF seca estaba disponible en el mercado (Aldrich).

La cromatografía analítica de capa fina (TLC) se realizó en placas de aluminio previamente recubiertas con gel de sílice 60 (F_{254} , 0,25 mm). Los productos se visualizaron usando una lámpara ultravioleta (254 y 365 nm) o calentando en una placa caliente (aprox. 200 °C), directamente o después del tratamiento con una solución al 5 % de ácido fosfomolibdico, ninhidrina o vanillina en etanol.

Los compuestos se purificaron mediante: a) cromatografía en columna flash sobre gel de sílice (230-400 mesh, Merck 60); b) cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en cromatotrón (chromatotron®), empleando placas de 1 mm de espesor (Kiesegel 60 PF254 gipshaltig, Merck) y velocidad de flujo 2-4 ml/min.

Los análisis de HPLC, se realizaron en un cromatógrafo Agilent (CL 1120 Compact de Agilent Technologie) con una columna de fase reversa ACE 5 C18-300 (4,6 mm x 150 mm, 3,5 μ m) dotado de un detector de PDA (matriz de diodos fotoeléctricos) Waters 2996. Como fase móvil se empleó acetonitrilo (fase móvil A), y agua con 0,05 % de TFA (fase móvil B), velocidad de flujo 1 ml • min⁻¹. Todos los tiempos de retención se indican en minutos, y los gradientes se especifican para cada compuesto en los datos experimentales.

Para la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), se usó un equipo QTOF Accurate Mass Agilent 6520 (tiempo de vuelo de cuadrúpulo) acoplado con CL/EM usando una interfaz de electronebulización (ESI) funcionando en modo positivo (ESI+) y negativo (ESI-).

5

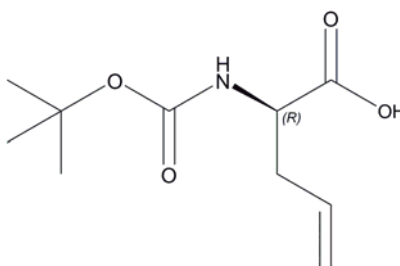
Los espectros de RMN (RMN de ^1H , ^{13}C) se registraron en los espectrómetros UNIT INOVA-300 de Varian (300 MHz), AVANCE 300 de Bruker (300 y 75 MHz), INOVA-400 de Varian (400 y 100 MHz), MERCURY-400 de Varian (400 y 100 MHz) y Varian-500 (500 y 125 MHz), usando $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ y CDCl_3 como disolventes. Los valores de desplazamiento químico (δ) se presentan en partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano (TMS) en ^1H y CDCl_3 ($\delta = 77,0$) en RMN de ^{13}C . La constante de acoplamiento (valores de J) se presenta en hercios (Hz), y las multiplicidades de señales se indican mediante el siguiente símbolo: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), m (multiplete) y sa (singlete ancho). Se realizaron espectros bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) para identificar la estructura de los compuestos finales.

10

15

Los compuestos finales se liofilizaron usando un sistema Telstar 6-80.

20 **Boc-(R)-Alilglicina-OH (1)**



Se disolvió (*R*)-2-alilglicina (1 g, 8,69 mmol, 1 equiv.) en una mezcla de NaOH 1 M (20 ml) y dioxano (10 ml). Se añadió anhídrido de Boc (3,79 g, 17,38 mmol, 2 equiv.) mientras se enfría con hielo. La mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, y se continuó la agitación durante 18 h. Una vez finalizada la reacción, se concentró la mezcla a presión reducida, y se lavó la fase acuosa con éter dietílico para retirar el exceso de anhídrido de Boc. Se ajustó el pH hasta 2,5 con HCl y se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El compuesto deseado (**1**) se obtuvo en forma de un aceite incoloro (1,68 g, 89 %).

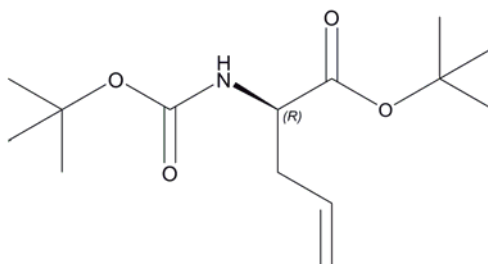
25

30

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,02 (d, J = 8,1 Hz, 1H, NH), 5,85 – 5,69 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,17 – 4,96 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,93 (m, 1H, H α), 2,36 (m, 2H, CH_2), 1,38 (s, 9H, OtBu).

5 Este compuesto ha sido descrito previamente por Kilian *et al.*, 2016.

Boc-(*R*)-Alilglicina-OtBu (2)

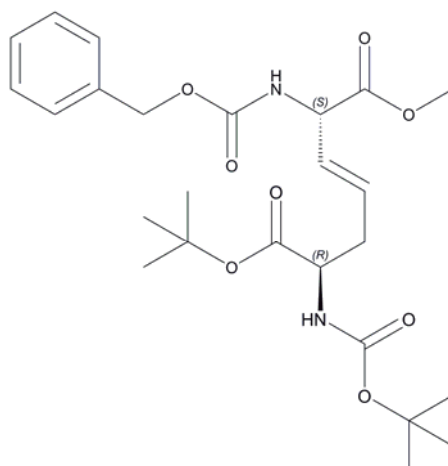


Se disolvió Boc-(*R*)-AlilGli-OH **1** (935,4 mg, 4,35 mmol, 1 equiv.) en 8 ml de una
 10 mezcla de diclorometano anhidro: tetrahidrofurano (4:1). A la disolución, se le añadió
 mientras se agitaba *tert*-butil-2,2,2-tricloroacetimidato (3,08 ml, 17,38 mmol, 4 equiv.).
 La reacción se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante una
 noche y posteriormente se concentró a presión reducida. El residuo se lavó con
 NaHCO₃ (3 x 100 ml) y salmuera (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄), filtró
 15 y evaporó. El bruto de reacción se purificó mediante cromatografía de columna flash
 empleando (Hex:AcOEt, 1:1) como eluyente para obtener, 845 mg (71 %) de **2** en
 forma de un aceite incoloro. HPLC [gradiente: A:B, 50-100 % de A en 10 min]:
 5,11 min.

^1H -RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ 5,76 – 5,64 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,15 – 5,07
 20 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,04 (d, J = 8,1 Hz, 1H, NH), 4,25 (m, 1H, H α), 2,48 (m, 7,1 Hz, 2H,
 CH_2), 1,45 (s, OtBu).

Este compuesto ha sido descrito previamente por Deborah *et al.*, 2003.

25 **1-Metil-7-*tert*-butil-(2*S*,6*R*)-2-(benciloxycarbonilamino)-6-[(*tert*-
 butoxycarbonil)amino]-hept-3-enedioato (4)**



Sobre una disolución del derivado de alilglicina **2** (366 mg, 1,35 mmol) y Cbz-(S)-vinilglicina-OMe **3** (674 mg, 2,70 mmol) en diclorometano (10 ml) se burbujeó Ar durante 5 min. A continuación se añadió el catalizador de Grubbs de segunda generación (GII) (115 mg, 10 % molar) y la mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante una noche y posteriormente se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna flash empleando (Hex:EtOAc, 5:1) como eluyente, obteniéndose 336 mg (50 %) de **4** en forma de un aceite marrón amarillento. HPLC [gradiente: A:B, 10-100 % de A en 10 min]: 9,7 min.

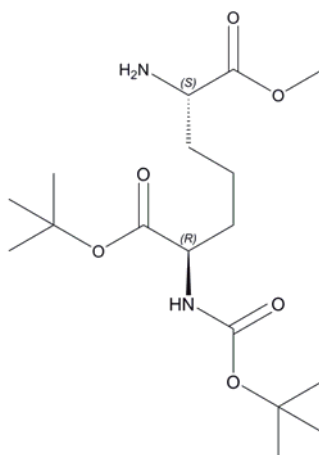
10

¹H-RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,26 (m, 5H, Cbz), 5,72 – 5,39 (m, 3H, CH=CH y NH), 5,03 (m, 3H, CH₂ y NH), 4,80 (m, 1H, H α), 4,17 (m, 1H, H α), 3,67 (s, 3H, CH₃), 2,52 – 2,27 (m, 2H, CH₂), 1,36 (s, OtBu y Boc). MS (ES⁺): *m/z* 493,3 (M+H)⁺.

15

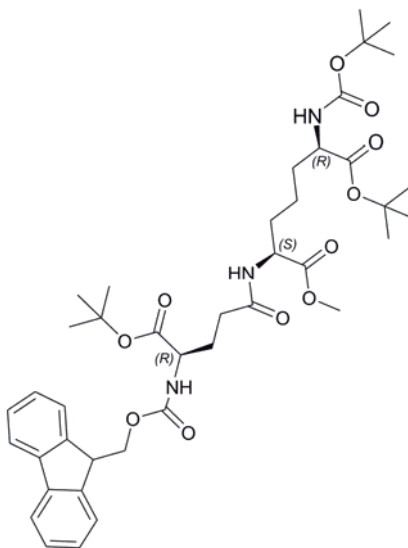
Este compuesto ha sido descrito previamente por Žiga *et al.*, 2013.

1-Metil-7-*terc*-butil-(2S,6R)-N^ε-(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (5)



Una disolución del compuesto insaturado **4** (336 mg, 0,68 mmol) en acetato de etilo se calienta a 30 °C y se somete durante 4-6 h a hidrogenación a presión atmosférica en presencia de Pd/C al 10 % (10 % en peso). Para ello se empleó un globo lleno de gas hidrógeno y un matraz de vidrio como recipiente de reacción. Se filtró el Pd/C a través de papel de filtro Whatman® 42 y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose 234 mg (cuant.) del compuesto deseado en forma de un sólido blanco amorfo. ¹H-RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,95 (s, 1H, NH), 5,01 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH), 4,09 (m, 1H, H_α), 3,65 (s, 3H, CH₃), 3,38 (dd, *J* = 7,3; 5,4 Hz, 1H, H_α), 1,82 – 1,62 (m, 5H, CH₂), 1,60 – 1,44 (m, 1H, CH₂), 1,38 (s, OtBu y Boc). MS (ES⁺): *m/z* 361,23 (M+H)⁺.

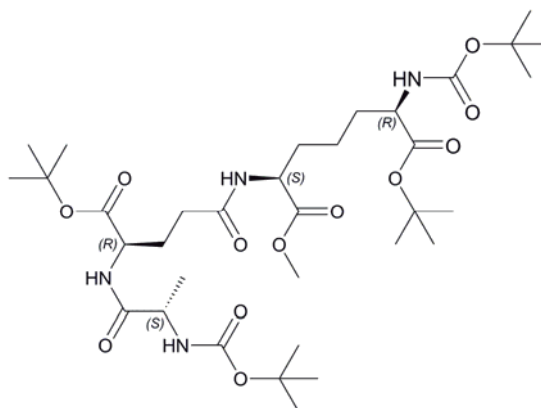
1-Metil-7-*terc*-butil-(2*S*,6*R*)-*N*^α-(*N*-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-D-glutamil-α-*terc*-butiléster)-*N*^ε-(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (6**)**



A una disolución del intermedio **5** (*meso*-DAP) convenientemente protegido (132 mg, 0,36 mmol) en DMF (10 ml), se le añadieron Fmoc-(*R*)-Glu-OtBu (187 mg, 0,43 mmol), HATU (182 mg, 0,43 mmol) y DIPEA (142 µl, 0,81 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante una noche y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de ácido cítrico (10 %) (3 x 20 ml), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml), y salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄ anhidro), filtró y evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía circular centrífuga empleando Hex:EtOAc (6:4 a 1:1) como eluyente, obteniéndose 191 mg (67 %) del compuesto **6** en forma de un jarabe incoloro. HPLC [gradiente: A:B, 50-100 % de A en 10 min]:

7,7 min. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,70 (d, J = 7,6 Hz, 2H, Fmoc), 7,54 (d, J = 7,5 Hz, 2H, Fmoc), 7,33 (t, 2H, Fmoc), 7,25 (t, 2H, Fmoc), 6,62 (d, J = 7,8 Hz, 1H, NH), 5,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H, NH), 4,99 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH), 4,49 (m, 1H, H_α), 4,34 (m, 3H, H_α y CH_2Fmoc), 4,15 (s, 1H, H_α), 4,06 (s, 1H, H_α), 3,65 (s, 3H, OMe), 2,22 (m, 3H, CH_2), 1,80 (m, 2H, CH_2), 1,67 (m, 2H, CH_2), 1,55 (m, 3H, CH_2), 1,37 (s, 27H, Boc y OtBu). MS (ES^+): m/z 761,40 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1-Metil-7-*terc*-butil-(2*S*,6*R*)- N^α -[N -(*N*-*terc*-butoxicarbonil-L-alanil)-D-glutamil- α -*terc*-butiléster]- N^ϵ -(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (7)

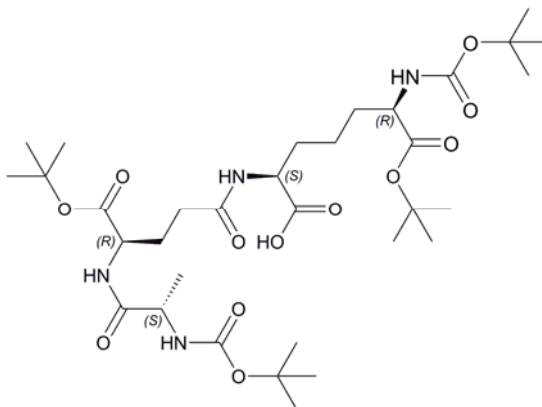


El intermedio **6** (191 mg, 0,24 mmol) se disolvió en una disolución de piperidina:DMF (20 %). La reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose 135 mg (cuant.) de la correspondiente amina libre, que se empleó directamente para la siguiente etapa de reacción.

Una disolución de la amina anterior (135 mg, 0,24 mmol) en DMF (10 ml) se trató con Boc-L-Ala-OH (56,1 mg, 0,29 mmol), HATU (122,8 mg, 0,29 mmol) y DIPEA (95 μl , 0,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 $^\circ\text{C}$ durante una noche y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas de ácido cítrico (10 %) (3 x 20 ml), solución saturada de NaHCO_3 (3 x 20 ml), y salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4 anhidro), filtró y evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía circular centrífuga empleando diclorometano:MeOH (100 a 10:1) como eluyente, obteniéndose 120 mg (67 %) de compuesto **7** en forma de una espuma amarilla. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,00 (s, 1H, NH), 5,03 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH), 4,94 (s, 1H, NH), 4,45 (m, 1H, H_α), 4,33 (s, 2H, NH y H_α), 4,09 (d, J = 9,1 Hz, 2H,

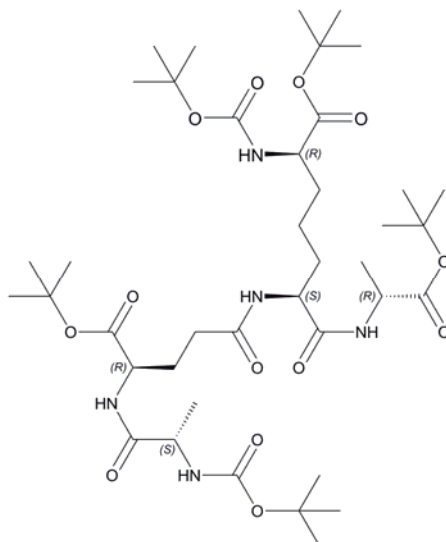
Ha), 3,67 (s, 3H, OMe), 1,97 – 1,61 (m, 4H, CH₂), 1,38 (s, 42H, Boc, OtBu y CH₂), 1,31 (d, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃). MS (ES⁺): m/z 718,42 (M+H)⁺.

1-Carboxi-7-*terc*-butil-(2*S*,6*R*)-*N*^α-[*N*-(*N*-*terc*-butoxicarbonil-L-alanil)-D-glutamil-α-
5 *terc*-butiléster]-*N*^ε-(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (8)



A una disolución a 0 °C del metiléster **7** (84 mg, 0,11 mmol) en THF (10 ml), se añadió una segunda disolución de LiOH·H₂O (4,95 mg, 0,11 mmol) en agua (2,5 ml). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, se añadió una disolución acuosa de ácido clorhídrico (1 N) hasta alcanzar un pH = 3-4, y la mezcla se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en isobutanol (20 ml) y se lavó con H₂O (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose 56,8 mg (68 %) de **8** en forma de un jarabe amarillo. HPLC [gradiente: A:B, 50-100 % de A en 10 min]: 6,55 min. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,08 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, NH), 8,02 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, NH), 7,05 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, NH), 6,81 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, NH), 4,26 – 3,86 (m, 3H, H_α), 3,74 (m, 1H, H_α), 2,17 (dd, *J* = 13,3; 5,5 Hz, 2H, CH₂), 1,98 – 1,71 (m, 3H), 1,66-1,36 (m y s, 41H, Boc, OtBu y CH₂), 1,18 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃). MS (ES⁺): *m/z* 703,41 (M+H)⁺.

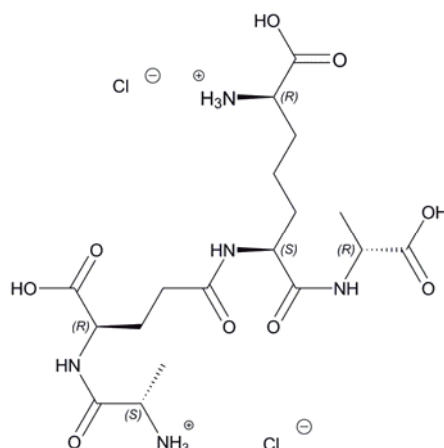
1-(D-alanil *terc*-butiléster)-7-*terc*-butil-(2*S*,6*R*)-*N*^α-[*N*-(*N*-*terc*-butoxicarbonil-L-alanil)-D-glutamil-α-*terc*-butiléster]-*N*^ε-(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato
(9)



5

A una disolución del intermedio ácido **8** (68,5 mg, 0,097 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron H-D-Ala-OtBu (21,2 mg, 0,12 mmol), HATU (40,3 mg, 0,09 mmol) y DIPEA (39 μ l, 0,19 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante una noche y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas de ácido cítrico (10 %) (3 x 20 ml), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml), y salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄ anhidro), filtró y evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía circular centrífuga empleando diclorometano:MeOH (100:1 a 20:1) como eluyente, obteniéndose 55 mg (68 %) del compuesto **9**. EM (ESI⁺): m/z 830,5 (M+H)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*₆) δ 7,67 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, NH), 7,53 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH), 7,35 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, NH), 6,27 (s, 1H, NH), 5,94 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NH), 4,19 (m, 3H, H α), 4,01 (m, 1H, H α), 3,84 (m, 1H, H α), 2,19 (m, 4H, CH₂), 1,80-1,45 (m, 4H, CH₂), 1,42 – 1,27 (m, 47H, Boc, OtBu y CH₂), 1,23 (2d, *J* = 2,33 Hz, 3H, CH₃), 1,22 (d, *J* = 2,46 Hz, 3H, CH₃).

(S)-Alanil-γ-(R)-glutamil-meso-diaminopimelil-(R)-alanina (PGN-1)

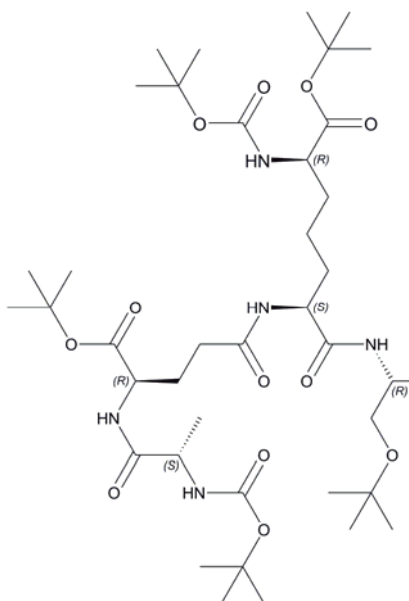


A una disolución del intermedio protegido **9** (55 mg, 0,06 mmol) en diclorometano (10 ml), se añadió trifluoroacético (TFA). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la disolución se evaporó a sequedad. El residuo se coevaporó varias veces con una mezcla de diclorometano y metanol para retirar el TFA residual.

¹H-RMN (500 MHz, Metanol-*d*₄) δ 4,40 (m, 3H, H_α), 3,99 (m, 1H, H_α), 3,87 (m, 1H, H_α), 2,37 (m, 2H, CH₂Glu), 2,27 (m, 1H, CH_{Glu}), 1,96 (m, 2H, CH_{DAP}, CH_{Glu}), 1,86 (m, 2H, CH_{DAP}, CH_{DAP}), 1,68 (m, 1H, CH_{DAP}), 1,53 (m, 5H, CH_{3(S)Ala} y CH₂CH_{2DAP}CH₂), 1,39 (d, 3H, CH_{3(R)Ala}). RMN de ¹³C (126 MHz, Metanol-*d*₄) δ 174,52; 173,19; 173,16; 172,27; 169,82; 168,23; 52,84; 52,80; 51,94; 48,87; 48,07; 31,26; 31,23; 29,83; 27,15; 21,09; 16,41.

Para la obtención del clorhidrato, se trató una disolución en agua del compuesto en forma de sal de TFA con varias gotas de ácido clorhídrico (37 %). La disolución acuosa se lavó varias veces con acetato de etilo y posteriormente se liofilizó, obteniéndose 11,7 mg (35 %) de **PGN-1** en forma de una espuma verdosa. HRMS (ESI, positiva): *m/z* calculada para C₁₈H₃₂N₅O₉ 462,2267; encontrada 462,22054. Esta fue la forma en la que se ensayó el compuesto.

1-[(R)-(1-*terc*-butoxipropan-2-il)amino]-7-*terc*-butil-(2S,6R)-N^α-[N-(N-*terc*-butoxicarbonil-L-alanil)-D-glutamyl-α-*terc*-butiléster]-N^ε-(*terc*-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (10)

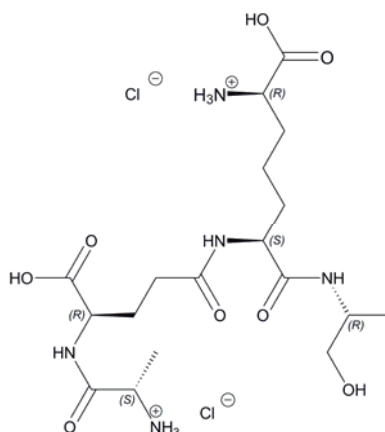


A una disolución del intermedio ácido **8** (40 mg, 0,057 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron *terc*-butil-D-alaninol (9 mg, 0,068 mmol), HATU (23,5 mg, 0,057 mmol) y
 5 DIPEA (19 μ l, 0,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante una noche y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de ácido cítrico (10 %) (3 x 20 ml), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml), y salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄ anhidro), filtró y evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante
 10 cromatografía circular centrífuga empleando diclorometano:MeOH (100:1 a 10:1) como eluyente, obteniéndose 32,8 mg (60 %) del compuesto **10** en forma de un jarabe incoloro. HPLC [gradiente: A:B, 50-100 % de A en 10 min]: 6,45 min.

¹H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*₆) δ 7,60 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, NH), 7,26 (d, *J* =
 15 7,8 Hz, 2H, NH), 6,32 (s, 1H, NH), 5,99 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NH), 4,29 (m, 2H, 2H α), 4,13 (m, 1H, H α), 3,98 (m, 2H, 2H α), 3,35 (m, 1H, CH₂OH), 3,24 (m, 1H, CH₂OH), 2,26 (m, 1H, CH₂), 1,91 – 1,56 (m, 2H, CH₂), 1,42 (d, *J* = 13,1 Hz, 43H, Boc, OtBu y CH₂
 DAP), 1,36 (d, *J* = 7,2 Hz, CH₃), 1,15 (m, 12H, O^tBu y CH₃). MS (ES⁺): *m/z* 817,05 (M+H)⁺.

20

1-[(*R*)-(1-hidroxipropan-2-il)amino]-(2*S*,6*R*)-*N* ^{α} -[*N*-(L-alanil)-D-glutamil]-2,6-diaminopimelato (PGN-2)

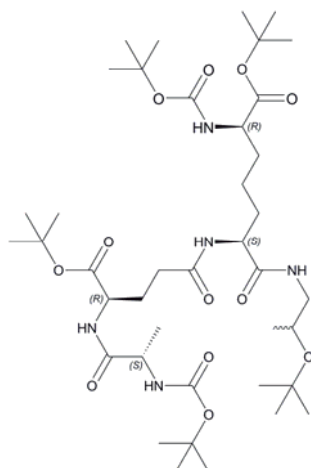


A una disolución del intermedio protegido **10** (32,8 mg, 0,04 mmol) en diclorometano (10 ml), se le añadió TFA. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, se evaporó la disolución a sequedad. El residuo se coevaporó varias veces con una mezcla de diclorometano y MeOH para retirar el TFA residual.

Para la obtención del correspondiente clorhidrato, se trató una disolución en agua del compuesto en forma de sal de TFA con varias gotas de ácido clorhídrico (37 %). La disolución acuosa se lavó varias veces con acetato de etilo y a continuación se liofilizó, obteniéndose 19,1 mg (69 %) de **PGN-2** en forma de una espuma verdosa. Esta fue la forma en la que se ensayó y caracterizó el compuesto. HRMS (ESI, positiva): m/z calculado para C₁₈H₃₅N₅O₈ 449,2486; encontrada 449,2481.

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 4,24 (m, 1H, H_α), 4,10 (m, 1H, H_α), 3,98 (c, J = 7,0 Hz, 1H, H_α), 3,85 (m, 1H, CH, H_α), 3,80 (m, 1H, CHCH₂OH), 3,41 (m, 1H, CH_{2A}OH), 3,35 (m, 1H, CH_{2B}OH), 2,26 (m, 2H, CH_{2Glu}), 2,07 (m, 1H, CH_{Glu}), 1,88 (m, 1H, CH_{Glu}), 1,80 (m, 2H, CH_{2DAP}), 1,63 (m, 2H, CH_{2DAP}), 1,41 (d, J = 7,0 Hz, 3H, CH_{3(S)Ala}), 1,35 (m, 2H, CH_{2CH_{2DAP}CH₂}), 0,96 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH_{3CHCH₂OH}). ¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ 174,76; 174,65; 173,27; 172,33; 170,74; 64,22; 53,70; 52,90; 52,14; 48,97; 47,21; 31,21; 30,60; 29,34; 26,40; 20,76; 16,51; 15,71.

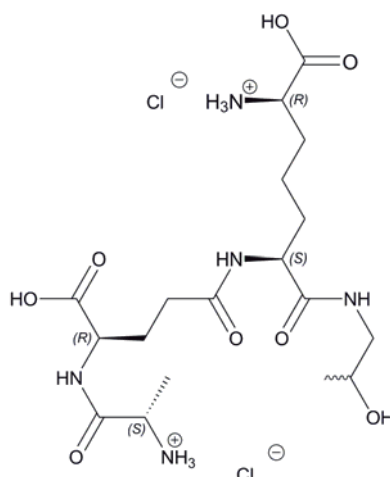
1-(1-terc-butoxi-2-hidroxipropilamino)-7-terc-butil-(2S,6R)-N^α-[N-(N-terc-butoxicarbonil-L-alanil)-D-glutamil-α-terc-butiléster]-N^ε-(terc-butoxicarbonil)-2,6-diaminopimelato (11)



A una disolución del intermedio ácido **8** (56,8 mg, 0,081 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron *tert*-butil-1-amino-2-propanol (12,7 mg, 0,09 mmol), HATU (33,4 mg, 0,081 mmol) y DIPEA (14 μ l, 0,081 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante una noche y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas de ácido cítrico (10 %) (3 x 20 ml), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml), y salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄ anhidro), filtró y evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía circular centrífuga empleando diclorometano:MeOH (100:1 a 10:1) como eluyente, obteniéndose 43 mg (65 %) del compuesto **11** en forma de un aceite incoloro.

¹H-RMN (400 MHz, Acetona-*d*₆) δ 7,51 (s, 1H, NH), 7,38 (d, *J* = 19,5 Hz, 1H, NH), 7,20 (dd, *J* = 17,8; 7,7 Hz, 1H, NH), 6,23 (s, 1H, NH), 5,86 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NH), 4,19 (m, 2H, H α), 4,01 (s, 1H, H α), 3,84 (m, 1H, H α), 3,67 (m, 1H, H α), 2,99 (m, 2H, CH₂), 2,17 (m, 5H, CH₂), 1,78 – 1,56 (m, 2H, CH₂), 1,51 (m, 2H, CH₂), 1,32 (m, 37H, OtBu, Boc y CH₂), 1,04 (s, 12H, OtBu y CH₃), 0,92 (t, *J* = 5,5 Hz, 3H, CH₃).

1-[2-hidroxipropilamino]-(2*S*,6*R*)-*N* $^{\alpha}$ -[*N*-(*L*-alanil)-*D*-glutamil]-2,6-diaminopimelato (PGN-3)



A una disolución del intermedio protegido **11** (43 mg, 0,05 mmol) en diclorometano (10 ml), se le añadió TFA. Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, se evaporó la disolución a sequedad y el residuo se coevaporó varias veces con una mezcla de diclorometano y MeOH para retirar el TFA residual.

Para la obtención del correspondiente clorhidrato, se trató una disolución en agua de del compuesto en forma de sal de TFA con varias gotas de ácido clorhídrico (37 %). La disolución acuosa se lavó varias veces con acetato de etilo y a continuación se liofilizó, obteniéndose 22,1 mg (63 %) de **PGN-3** en forma de una espuma verdosa. Esta fue la forma en la que se ensayó y caracterizó el compuesto. HRMS (ESI, positiva): m/z calculado para $C_{18}H_{35}N_5O_8$ 449,2486; encontrada 449,2499.

1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ 4,11 (m, 2H, $2H\alpha$), 3,98 (c, $J = 7,0$ Hz, 1H, $H\alpha$), 3,78 (c, $J = 6,1$ Hz, 1H, CH_3CHOH), 3,62 (m, 1H, $H\alpha$), 3,09 (m, 2H, CH_2N), 2,25 (m, 2H, CH_2Glu), 2,02 (m, 1H, CH_{Glu}), 1,90 – 1,48 (m, 4H, CH_{Glu} , CH_{2DAP} y CH_{2DAP}), 1,41 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, $CH_{3(S)Ala}$), 1,33 (m, 2H, $CH_2CH_{2DAP}CH_2$), 1,01 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, CH_3CHOH).

1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ 4,19 (m, 1H, $H\alpha$), 4,17 (m, 1H, $H\alpha$), 4,05 (c, $J = 7,1$ Hz, 1H, $H\alpha$), 3,84 (c, $J = 6,1$ Hz, 1H, $H\alpha$), 3,69 (m, 1H, CH_3CHOH), 3,17 (m, 2H, CH_2N), 2,32 (m, 2H, CH_{2Glu}), 2,09 (m, 1H, CH_{2Glu}), 1,92 (m, 1H, CH_{2Glu}), 1,83 (m, 2H, CH_{2DAP}), 1,70 (m, 2H, CH_{2DAP}), 1,49 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, $CH_{3(S)Ala}$), 1,41 (m, 2H, $CH_2CH_{2DAP}CH_2$), 1,07 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, CH_3CHOH). ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O) δ 175,43; 174,23; 170,47; 66,14; 54,51; 53,91; 49,19; 46,00; 31,76; 30,67; 29,89; 27,20; 20,98; 19,43; 16,61.

Lineas celulares. Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) procedentes de ratones “C57BL/6 knock-in” que expresaban GFP-p65 en medio “Dulbecco (DMEM) modified Eagles’s” suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina al 1 % (p/v), piruvato de sodio al 1 % (p/v) y aminoácidos no esenciales al 1 %, según lo descrito (Ramos-Marques et al., 2017). Las células se cultivaron a 37 °C con atmósfera de CO₂ humidificada al 5 %. Para los experimentos de microinyección, las células se cultivaron en placas de fondo de vidrio de rejilla alta 50 de μ -placa de 35 mm (Ibidi, Martinsried, Alemania).

Microinyección de péptidos sintéticos. Los péptidos sintetizados se disolvieron en agua estéril hasta alcanzar una concentración de 20 mM. A esta disolución se le añadió dextrano rojo Texas 70 kDa hasta llegar a una concentración final de 2 mg/ml. Para evitar la obstrucción de la aguja del microinyector, se centrifugó un volumen de 50 μ l de esta solución de péptido/dextrano rojo Texas a 14.000 xg durante 30 min, 4 °C, antes de su uso. Tras la microinyección de una media de 8 a 10 rejillas por placa, se mantuvo el cultivo celular a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada durante el tiempo deseado (30 min). Seguidamente, se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 3 % durante 20 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se retiró el PFA mediante dos lavados en serie con PBS, pH 7,4 y las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Leica DIM6000).

Resultados y análisis

Ensayo de estimulación de NF- κ B

Los péptidos **PGN-1**, **PGN-2** y **PGN-3** se microinyectaron en fibroblastos indicadores que expresaban GFP-p65 y a continuación se determinó su actividad biológica. Los resultados (Figura 1) demostraron claramente que el péptido **PGN-1** (con estructura estimulante canónica) fue capaz de desencadenar la translocación al núcleo de la subunidad GF-65 de NF- κ B. Más del 95 % de las células microinyectadas con este péptido muestran la señal de GFP-p65 en el núcleo tras 30 o 90 min de microinyección de péptidos (Figura 1). Este hecho fue indicativo de la estimulación de NF- κ B, ya que es todo el complejo NF- κ B activo (p50/p65) el que se traslada al núcleo tras la degradación de la proteína I κ B inhibidora.

Respecto a los péptidos **PGN-2** y **PGN-3**, se observó una menor capacidad estimulante, específicamente para el caso de **PGN-2**, en el que solo el 10-20 % de las células microinyectadas mostraron una señal de GFP-65 en el núcleo tras 30 min y no se observó ninguna célula con dicho fenotipo a los 90 min de la inyección (Figura 1).

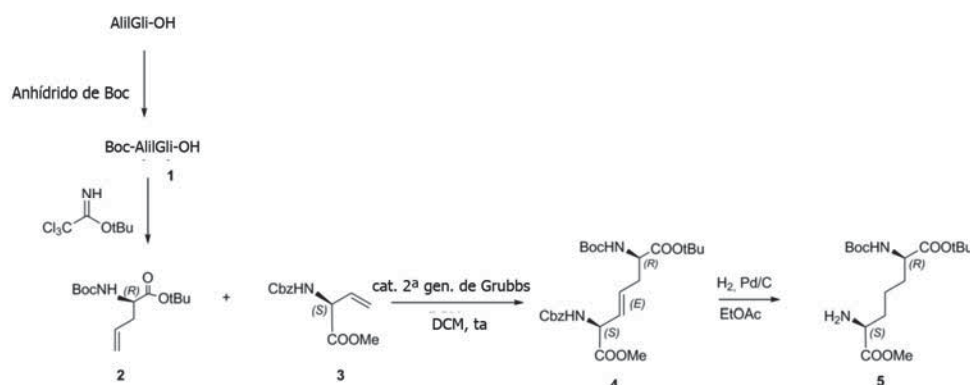
- 5 **PGN-3** mostró un comportamiento intermedio en comparación con **PGN-1** y **PGN-2** (Figura 1). De estos resultados se puede concluir que la introducción de un aminoalcohol en el péptido **PGN-2** podría inhibir la estimulación de NOD1 y, por tanto, impedir la translocación nuclear de NF- κ B.

- 10 Por lo tanto, estos resultados apoyan firmemente la idea de una modificación del peptidoglicano de *Salmonella* intracelular que podría afectar a NF- κ B, generando un efecto antiinflamatorio. Dicha estrategia podría facilitar al patógeno el establecimiento de un estado de infección persistente en la célula hospedadora. La nueva estructura química **PGN-2** es, por consiguiente, aplicable como un nuevo
15 agente antiinflamatorio.

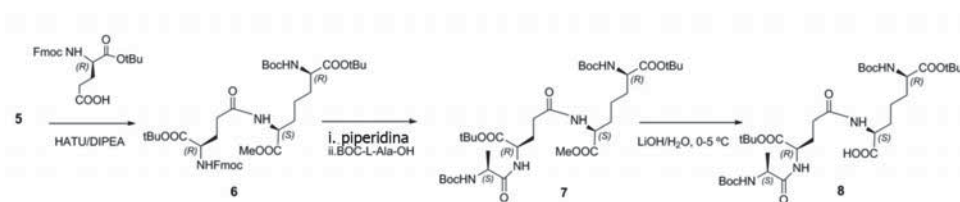
Esquemas

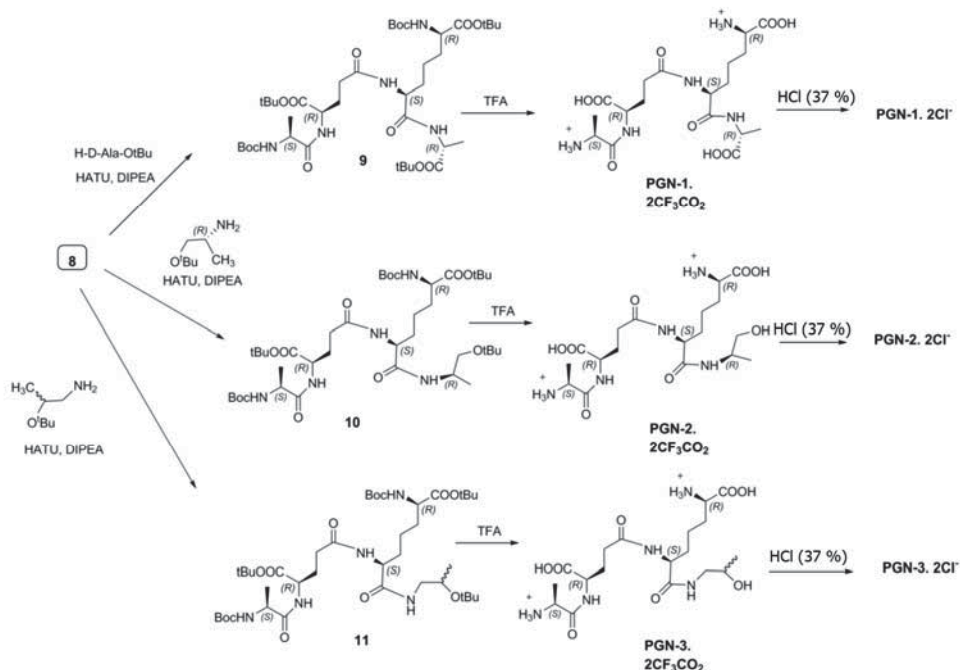
Esquema 1. Síntesis del intermedio 5

20



Esquema 2. Síntesis del intermedio 8



Esquema 3. Síntesis de PGN-1, PGN-2 y PGN-3**5 Referencias**

- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N. y Nunez, G. (2014). "NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease". *Immunity* 41, 898-908.
- 10 • Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan". *Science* 300, 1584-1587.
- 15 • Keestra-Gounder, A. M., Byndloss, M. X., Seyffert, N., Young, B. M., Chavez-Arroyo, A., Tsai, A. Y., Cevallos, S. A., Winter, M. G., Pham, O. H., Tiffany, C. R., *et al.* (2016). "NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation". *Nature* 532, 394-397.
- 20 • Keestra-Gounder, A. M. y Tsois, R. M. (2017). "NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing". *Trends Immunol* 38, 758-767.

- Monack, D. M. (2012). "Salmonella persistence and transmission strategies". *Curr Opin Microbiol* 15, 100-107.

- 5 • Ramos-Marques, E., Zambrano, S., Tierrez, A., Bianchi, M. E., Agresti, A. y Garcia-Del Portillo, F. (2017). "Single-cell analyses reveal an attenuated NF-kappaB response in the Salmonella-infected fibroblast". *Virulence* 8, 719-740.

- Rivera-Chavez, F. y Bau mler, A. J. (2015). "The Piromaniac Inside You: Salmonella Metabolism in the Host Gut". *Annu Rev Microbiol* 69, 31-48.

- 10 • Tiennimitr, P., Winter, S. E. y Bau mler, A. J. (2012). "Salmonella, the host and its microbiota". *Curr Opin Microbiol* 15, 108-114.

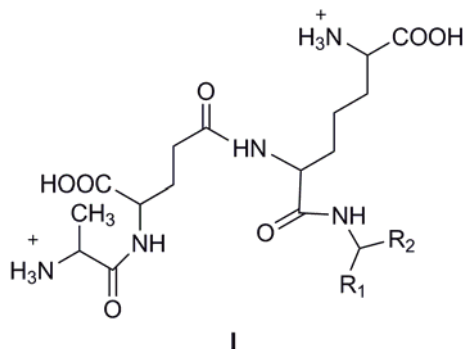
- Kilian K. K., Thomas E., Stefanie D., Max Keller, G. B., Oliver R., Armin B. (2016).
 15 "High affinity agonists of neuropeptide Y (NPY) Y4 receptor derived from the C-terminal pentapeptide of human pancreatic polipeptide (hPP): synthesis, stereochemical discrimination and radiolabeling", *J. Med. Chem.* 59, 6045-6058.

- Rothman D. M., Vazquez, M. E., Vogel, E. M., Imperiali, B. (2003). "Caged
 20 phospho-amino acid building blocks for solid-phase peptide synthesis", *J. Org.Chem.*, 68, 6795-6798.

- Jakopin, Ž., Gobec, M., Kodela, J., Hazdovac, T., Mlinarič-Raščan, I., Dolenc, M. S.(2013) "Synthesis of conformationally constrained γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid derivatives as ligands of nucleotide-binding oligomerization
 25 domain protein 1 (Nod1)", *European J. Med. Chem.* 69, 232-243.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I:



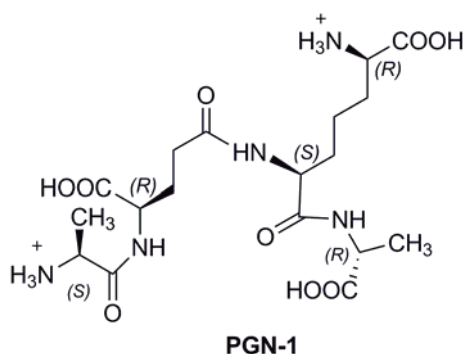
- 5 donde:

R_1 es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;

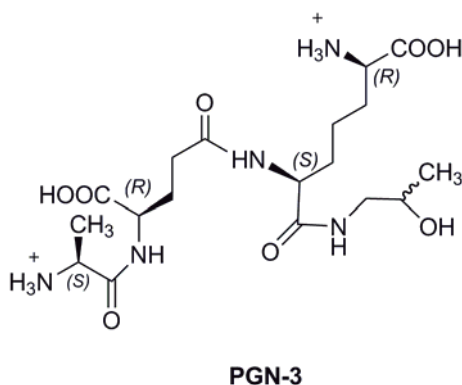
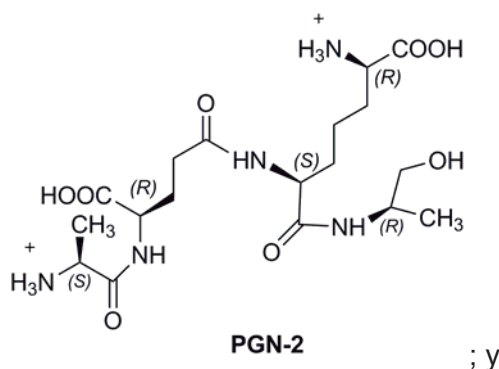
R_2 es C_{1-4} alquilo, $-OR_3$ o $-COOR_3$, donde C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible; y

- 10 cada R_3 es independientemente hidrógeno o C_{1-4} alquilo,

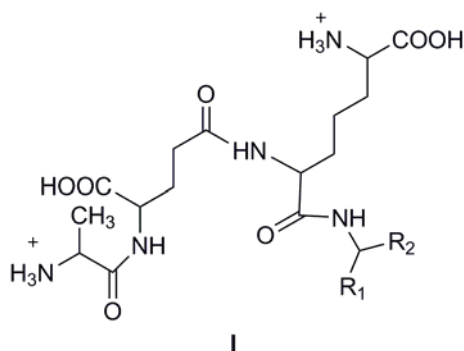
con la condición de que el compuesto **PGN-1** se excluye de la definición de fórmula general I:



- 15 2. El compuesto de fórmula general I, donde R_1 es metilo.
3. El compuesto de fórmula general I, donde R_3 es hidrógeno.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre:

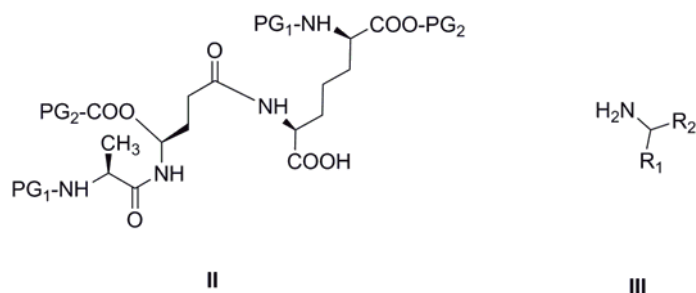


5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula
5 general I según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un proceso de obtención de un compuesto de fórmula general I:



donde:

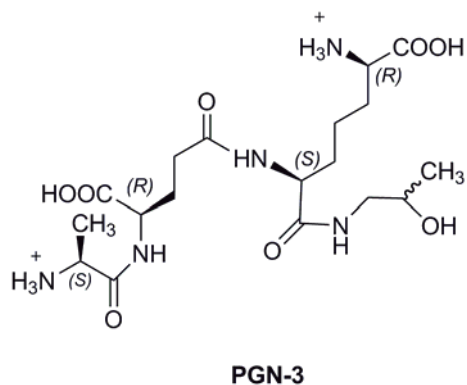
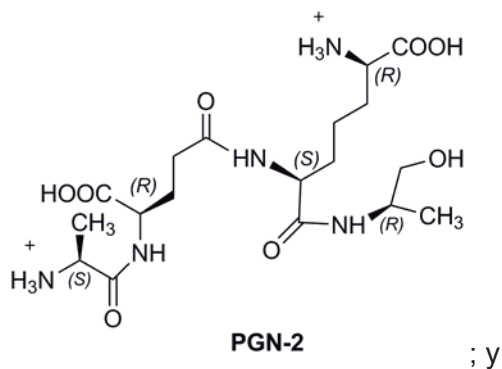
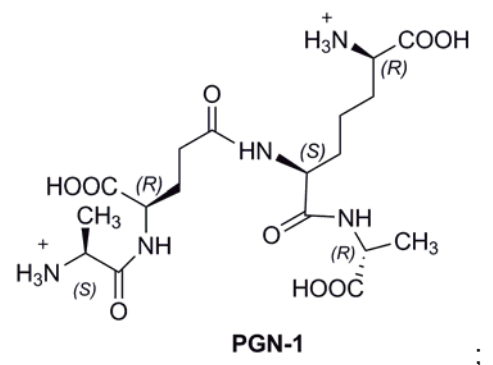
- 10 R_1 es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;
- R_2 es C_{1-4} alquilo, $-OR_3$ o $-COOR_3$, donde C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible; y
- cada R_3 es independientemente hidrógeno o C_{1-4} alquilo,
- 15 que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula II y un compuesto de fórmula III en presencia de una base y un reactivo de acoplamiento:



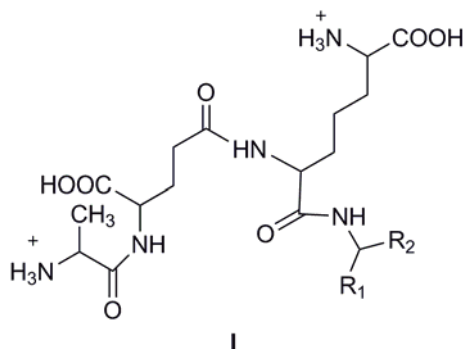
donde R_1 y R_2 tienen el significado descrito anteriormente para un compuesto de fórmula I, y PG_1 y PG_2 representan respectivamente grupos protectores de amina y ácido carboxílico, seguida de la eliminación de los grupos protectores PG_1 y PG_2 .

5

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el compuesto de fórmula general I se selecciona entre:



8. Un compuesto de fórmula general I o una composición farmacéutica del mismo:



donde:

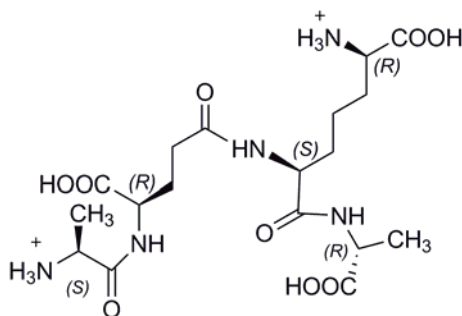
- R_1 es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, fenilmetileno, hidroxifenilmetileno o fenilindolilmetileno;

R_2 es C_{1-4} alquilo, $-OR_3$ o $-COOR_3$, donde C_{1-4} alquilo está opcionalmente sustituido por un grupo $-OR_3$ en cualquier posición disponible; y

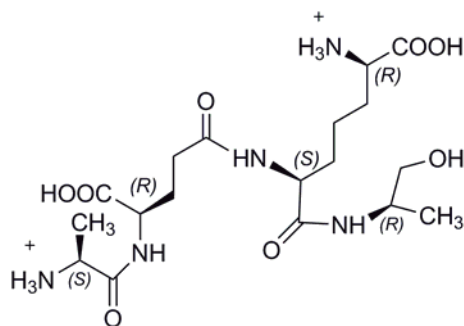
cada R_3 es independientemente hidrógeno o C_{1-4} alquilo,

- para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que cursa con inflamación.

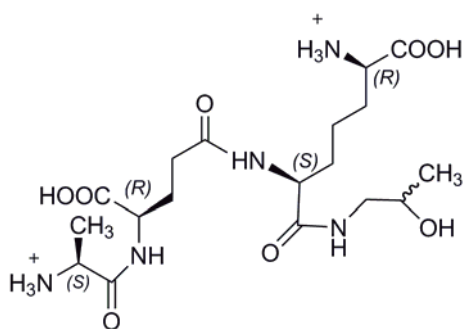
9. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el compuesto de fórmula general I se selecciona entre:



;



; y



PGN-3

10. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde la inflamación se selecciona entre infecciones microbianas y reacciones alérgicas a
5 formulaciones derivadas de la pared celular microbiana que contienen peptidoglicano, y trastornos inmunitarios y autoinmunitarios.

11. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde las infecciones microbianas son infecciones microbianas con patología inflamatoria
10 asociada donde el agente etiológico se selecciona entre bacterias, virus, hongos y protozoos.

12. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde las infecciones bacterianas se seleccionan entre salmonelosis, listeriosis y enfermedades
15 causadas por patógenos bacterianos intracelulares que producen un peptidoglicano que contiene *meso*-DAP reconocido por NOD1.

13. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde los trastornos inmunitarios y autoinmunitarios se seleccionan entre enfermedades
20 inflamatorias del intestino y artropatías.

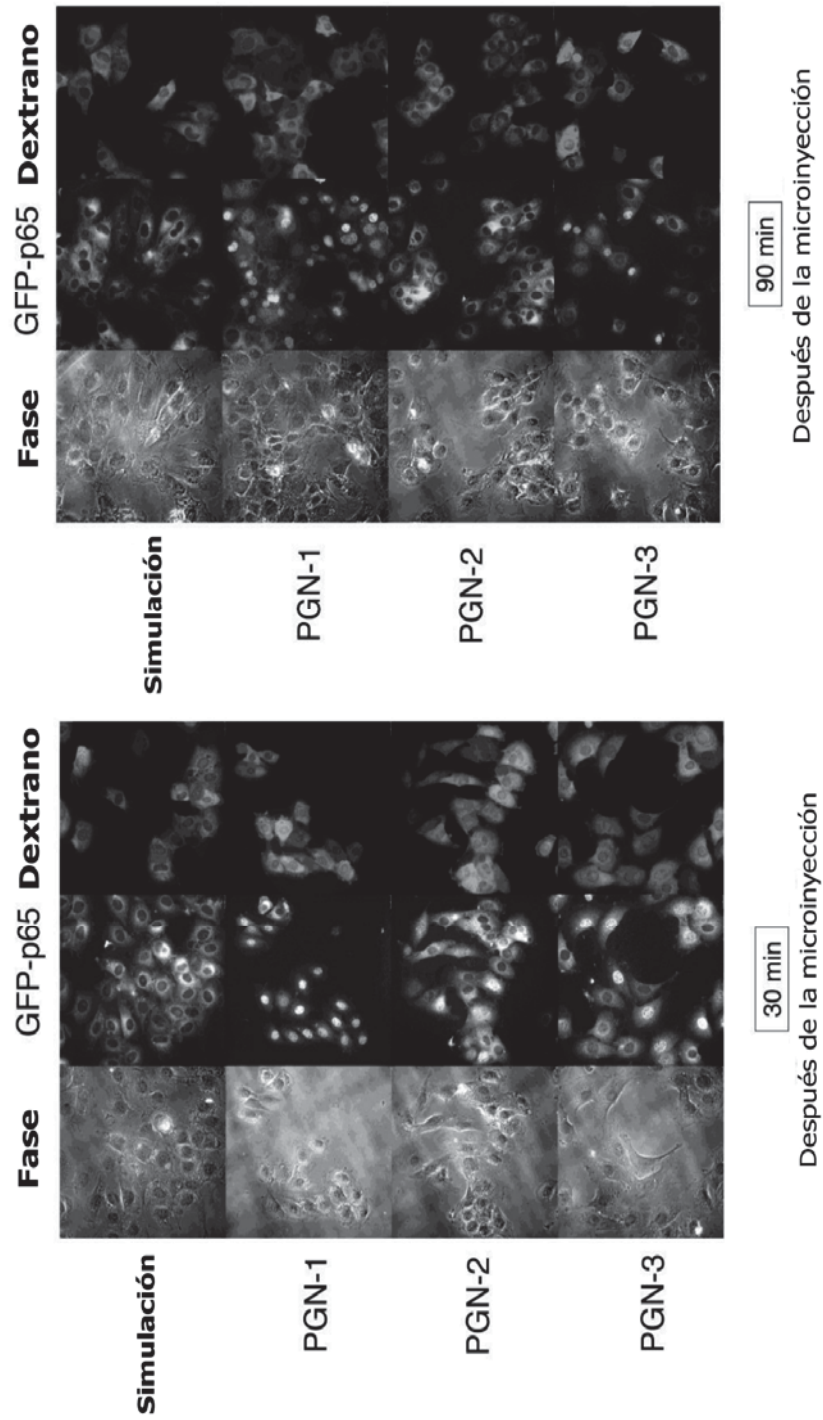


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201931007
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Z. JAPOKIN et al. Synthesis of conformationally constrained gama-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid derivatives as ligands of nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (NOD1). European Journal Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 69, Páginas 232-243. resumen, esquema 4	1-13
A	Y. DAGIL et al. PLOS ONE, 11/08/2016, Páginas 0160784 resumen, figura 1	1-13
A	CN 106589055 (UNIV TSINGHUA) 26/04/2017, resumen en inglés en la base de datos ESPACENET (European Patent Office), acceso por número de publicación	1-13
A	M. WOLFERT et al. Modification of the structure of peptidoglycan is a strategy to avoid detection by nucleotide-binding oligomerization domain protein 1. Infection and Immunity, 2007, Vol. 75, Páginas 706-713. resumen	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.04.2020

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K5/103 (2006.01)

A61K38/07 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, PUBCHEM, PUBMED, BIOSIS, ESPACENET