

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
16 de Agosto de 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 01/58860 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>:

C07C 279/14, C11D 1/50 // A61K 31/155

[ES/ES]; Insto. Investigaciones Químicas y Ambientales "Josep Pascual Vila", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00039

(22) Fecha de presentación internacional:

8 de Febrero de 2001 (08.02.2001)

(74) Mandatario: **OJEDA GARCIA, Pedro**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Serrano, 113, E-28006 MADRID (ES).

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200000319 11 de Febrero de 2000 (11.02.2000) ES

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 MADRID (ES).

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **INFANTE MARTINEZ-PARDO, M<sup>a</sup>, Rosa** [ES/ES]; Insto. Investigaciones Químicas y Ambientales "Josep Pascual Vila", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **PEREZ MUÑOZ, M<sup>a</sup>, Lourdes** [ES/ES]; Centro Investigaciones y Desarrollo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **MORAN BADENAS, Carmen** [ES/ES]; Centro Investigaciones y Desarrollo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **CLAPES SABORIT, Pere**

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: 1-O-L-ARGINYL ESTER 3-O-MONOACYL GLYCERIDES AND 1-O-L-ARGINYL ESTER 2,3-O-DIACYL GLYCERIDES TYPE SURFACE ACTIVE AGENTS

(54) Título: TENSIOACTIVOS DEL TIPO 1-O-L-ARGINIL ÉSTER 3-O-MONOACIL GLICÉRIDOS Y 1-O-L-ARGINIL ÉSTER 2,3-O-DIACIL GLICÉRIDOS

(57) Abstract: The invention concerns novel arginine-derived surface active compounds consisting of monoacyl glycerides and diacyl glycerides of general formula (I) and designed to act as surface active agents with antimicrobial activity. The activity will vary depending on the number of fatty chains and their length. Purification of the intermediate and final products is carried out by means of liquid/liquid, liquid/solid extractions, crystallizations and ion exchange and reverse phase chromatography (HPLC).

(57) Resumen: La presente invención se refiere a unos nuevos compuestos tensioactivos derivados de arginina del tipo mono y diaciglicéridos según fórmula general (I) diseñados para que actúen como agentes de superficie con actividad antimicrobiana. Las variaciones de actividad serán función del n° de cadenas grasas y de su longitud. La purificación de los productos intermedios y finales se lleva a cabo mediante extracciones líquido/líquido, líquido/sólido, cristalizaciones, cromatografía de intercambio iónico y fase reversa (HPLC).



WO 01/58860 A1

**TITULO:****TENSIOACTIVOS DEL TIPO 1-O-L-ARGINIL ÉSTER 3-O-MONOACIL GLICÉRIDOS Y 1-O-L-ARGINIL ÉSTER 2,3-O-DIACIL GLICÉRIDOS.****5    Introducción**

Los tensioactivos son moléculas orgánicas de amplia y versátil utilización que contienen dos grupos funcionales con características opuestas: un grupo hidrófilo (soluble en agua) y un grupo hidrófobo insoluble. Las actuales exigencias europeas, tanto de rentabilidad de procesos como ecológicas, hace imprescindible la investigación de nuevos productos que protejan el medio ambiente y la calidad de vida así como de alternativas que mejoren los procesos de producción.

Una de las estrategias que existe actualmente para conseguir tensioactivos ecológicamente aceptables es la preparación de moléculas cuya estructura molecular mimetiza la de los tensioactivos naturales: lipoaminoácidos, fosfolípidos y glicerolípidos (J.H. Fendler, 1989 “ *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Son). Desde el año 84, el equipo que dirige la Dra. Infante, pionero en España de estas investigaciones, se ha interesado en la síntesis, estudio y desarrollo de lipoaminoácidos (amidas, ésteres y acilos) de muy diversas estructuras y características iónicas, caracterizados por contener en su parte hidrófila o polar un aminoácido o péptido y en la parte hidrófoba o apolar una o más cadenas grasas condensadas al aminoácido por sus funciones  $\alpha$ -amino o carboxilo terminal.

Por otra parte, los glicerolípidos entre los que destacan los mono y diacilglicéridos (conocidos como monodiacilglicéridos) constituyen actualmente, debido a sus excelentes propiedades emulsificantes y vehiculizantes (Zhu, Y., Masuyama, A., Kirito, Y., Okahara, M., Rosen, M.J., 1992, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69:6269), el 75% de los emulsionantes empleados en la industria alimenticia, siendo los monoacilglicéridos los más importantes debido a su mayor funcionalidad y su carácter más competitivo. Dentro de este grupo, los compuestos más ampliamente estudiados y empleados son los ésteres alquílicos de glicerol ya que se obtienen fácilmente mediante una glicerolisis de los triacilglicéridos o una esterificación del glicerol mediante ácidos grasos (*Lipid Technologies and Applications*, 1997, Ed. Gunstone, F.D., Padley, F.B., New York.). Los monoacilglicéridos son compuestos con muy baja solubilidad en agua, por lo que

generalmente se añaden a las formulaciones junto con otros emulsionantes de carácter más polar.

La presente invención pretende llevar a cabo la síntesis de una nueva familia de monoacilglicéridos y diacilglicéridos derivados de arginina análogos a los clásicos monodiacilglicéridos pero de características más hidrófilas. Estos tensioactivos están constituidos por un esqueleto central de glicerol que une la parte hidrófoba formada por una o dos cadenas de ácido graso de longitud variable y la parte hidrófila formada por el aminoácido arginina o acetil-arginina unido al glicerol por su hidroxilo terminal a través de un enlace éster. Estas nuevas estructuras presentarán ciertas ventajas sobre los monodiacilglicéridos convencionales: a) la introducción de la arginina como parte polar de la molécula anfifila aumentará la solubilidad de éstos en medio acuoso, y mejorará sus propiedades tensioactivas en agua, b) la presencia de arginina aportará características catiónicas al tensioactivo y por tanto se obtendrán compuestos con actividad antimicrobiana y c) en función de la naturaleza y número de las cadenas hidrófobas es de esperar que en agua las nuevas moléculas se agreguen espontáneamente formando cubosomas y/o liposomas útiles para el transporte y liberación de biomoléculas.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

Los tensioactivos derivados de aminoácido son compuestos muy interesantes debido a su multifuncionalidad e inocuidad (Takehara, M. 1989, *Colloids and Surfaces*, **38**:149; Selve, C., Mansuy, L., Allouch, M., 1992, *J. Chem. Res.* **22**:401). Estas características han sido las responsables de que en los últimos años se haya llevado a cabo la síntesis y estudio de propiedades de una gran variedad de tensioactivos derivados de aminoácido, de carácter iónico, catiónico, no iónico y anfótero (Takehara, M. 1989, *Colloids and Surfaces*, **38**:149; Sagawa, K., Yokota, H., Ueno, I., Miyosi, T., Takehara, 1986, M., *XIV Congreso IFSCC*). En esta línea nuestro equipo ha sintetizado mediante metodologías químicas y enzimáticas lipoaminoácidos monocatenarios, dicatenarios y compuestos geminales de muy variada estructura en los cuales la cadena grasa estaba unida al aminoácido por enlaces acilo, éster o amida. Este estudio ha dado lugar a un gran número de patentes y publicaciones (ES9500061(1995); PI 9500027(1995); PCT/ES96/00026(1996); ES 9700520 (1997); ES 9900739 (1999); M.R. Infante, J.Molinero, P.Erra, (1992), *JAACS*, vol. **69**, nº7; J.Molinero, M.R.Juliá, P.Erra, M.Robert,

M.R.Infante, 1988, *JAACS*, Vol.65, nº6; C.Solans, M.A.Pés, N.Azemar,M.R.Infante, 1990, *Prog. Colloid Polym Sci*, **81** pp 144-150; L.Pérez, J.L.Torres, A.Manresa,C.Solans,M.R.Infante, 1996, *Langmuir*, **12**(22), pp 5296-5301, Clapés, P., Morán, C., Infante, M.R. ,1999, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 3 pp333-343).

- 5 Con respecto a los monodiacilglicéridos, la bibliografía describe con gran detalle sus propiedades y aplicaciones (K.Larsson,1994,"*Lipids: Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*" The Oily Press LTD). Estas propiedades se ven sensiblemente modificadas cuando el extremo hidroxilo libre de la molécula se funcionaliza con ácidos orgánicos del tipo ácido láctico, cítrico y acético ("Food  
10 *Emulsions*", 1997, Ed. by Stig E.Friberg and K.Larsson).

La síntesis de mono y diacilglicéridos derivados de arginina, objeto de la presente invención, requiere la obtención previa de los derivados del tipo 1-O-L-arginil ésteres de glicerol. La bibliografía describe la síntesis de estos intermedios utilizando catalizadores químicos. Valivety et al. (Valivety, R., Gill, I.S., Vulfson, E.N., 1998, *J. Surf. Deterg.* **1**  
15 177-185), prepararon diversos compuestos del tipo 1-O-L-aminoacil ésteres de glicerol a partir de la N<sup>α</sup>-Z-aminoácidos y glicerol en presencia de BF<sub>3</sub>-eterato. Sin embargo en ningún caso se trata de derivados de arginina.

Si bien la obtención de gliceril ésteres con aminoácidos N-protectados, como productos de partida, está muy poco desarrollada, son numerosas las publicaciones basadas en la  
20 síntesis enzimática de enlaces ésteres (Cantacuzene, D., Guerreiro, C., 1987, *Tetrahedron Letters* **28**, 5153-5156; Kawashiro,K., Inhizaki, H., Sugiyama, S., Hayashi, H.,1993, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 309-314; Kise, H., Hayakawa, A., Noritomi, H.,1987, *Biotechnol. Lett.* **9** 543-548).

Mitin et al. (Mitin, Y.V., Braun, K., Kuhl, P.,1997, *Biotech. and Bioeng* **54**, 287)  
25 describen la obtención de gliceril ésteres de aminoácidos N-protectados para su utilización en la síntesis de péptidos aunque no se encuentran en la literatura ejemplos de derivados de arginina.

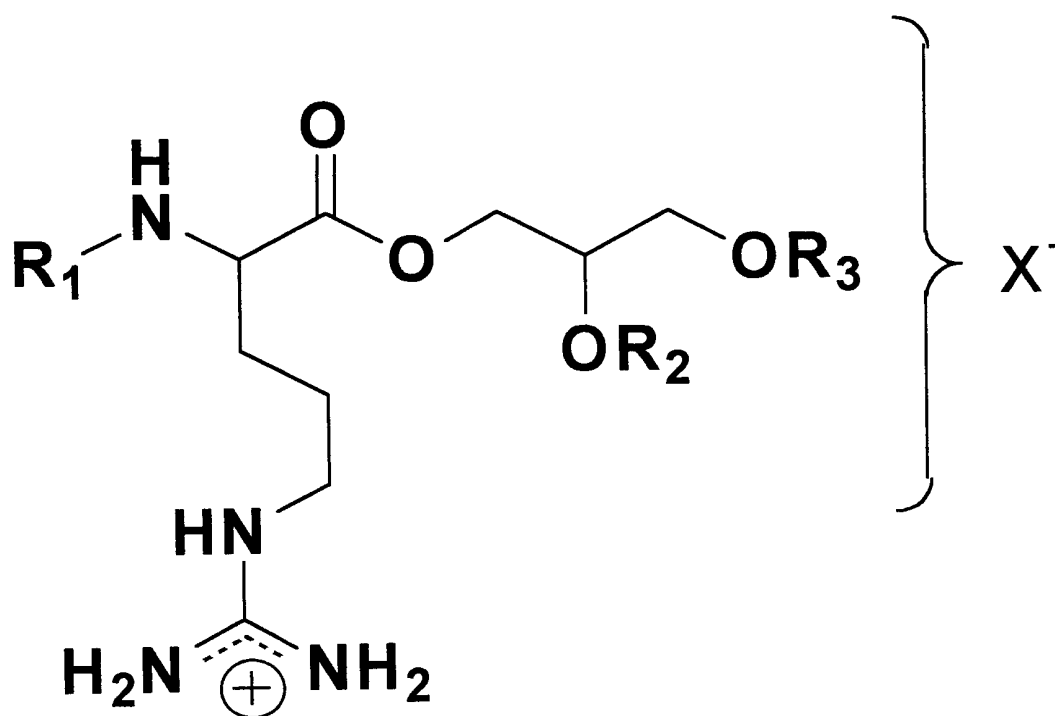
En relación con la acilación de los grupos hidroxilo del glicerol se ha encontrado descrito la utilización de enzimas tipo lipasas (Valivety, R., Gill, I.S., Vulfson, E.N.,1998, *J. Surf.*  
30 *Deterg.* **1** 177-185).

Las principales novedades que aporta la presente invención es la combinación en una misma molécula de tensioactivos tipo mono y diacilglicéridos y tensioactivos derivados

de arginina así como la utilización de enzimas como sustitutos de los catalizadores químicos convencionales.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a una nueva familia de tensioactivos derivados de arginina con una parte hidrófoba del tipo monodiacilglicerol así como a los procedimientos de síntesis de estos compuestos. La fórmula estructural de estos compuestos se indica (I).



(I)

10

Donde:

$\text{R}_1$  puede ser un hidrógeno o un grupo acetil (Ac).

- 15  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  pueden ser un hidrógeno o una cadena lineal preferentemente larga saturada o no saturada.  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  pueden ser seleccionados de un grupo de cadenas lineales de 8, 9, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono saturadas o no saturadas puras o sus mezclas.

Los materiales de partida pueden ser:

- Derivados N- $\alpha$  protegidos de arginina, de calidad técnica o concretamente N-acetil-arginina.
- Glicerol
- 5     - Ácidos, ésteres o cloruros grasos lineales saturados o no saturados de distinta longitud
- Catalizadores químicos de calidad técnica.
- Proteasas y lipasas de calidad técnica

- 10    Se variará en las moléculas el nº de cadenas alquílicas (1 ó 2), el grado de insaturación, la longitud de las mismas lo cual dará lugar a compuestos con un diferente comportamiento en las propiedades de adsorción, autoagregación y biológicas. Debido a la procedencia de materias primas renovables e inocuas es de esperar que estos compuestos no sean peligrosos tanto desde el punto de vista biológico como medioambiental. La utilización
- 15    del grupo acetil como grupo protector de la función amino de la arginina permite evitar posibles reacciones secundarias del tipo Maillard sin alterar el carácter biocompatible de los productos finales obtenidos.

La obtención de estos compuestos se ha llevado a cabo por metodologías químicas y enzimáticas. A continuación se describen las etapas involucradas en cada uno de los

20    procedimientos:

A) Procedimiento químico: la síntesis de estos compuestos por vía química ha tenido lugar en 3 etapas:

- 1) Formación de los derivados de arginina N $^{\alpha}$  -protegidos, 1-O-N-(prot)-arginil-sn- glicerol éster (a los cuales se designará como **00R(prot)**). Como materias
- 25    primas se utilizan glicerol, L-arginina protegida por el grupo  $\alpha$ -amino y BF<sub>3</sub>-eterato como catalizador de la reacción de esterificación.
- 2) Formación de los derivados N $^{\alpha}$  -protegidos 1-O-arginil éster 3-O-monoacilglicéridos o 1-O-arginil éster 2,3-O-diacilglicéridos (designados como **nnR(prot)**). La reacción tiene lugar a partir de 00R(prot) utilizando cloruros de
- 30    ácidos grasos lineales de 8 a 18 átomos de carbono como agentes acilantes en un medio de piridina.

3) Si procede, formación de 1-O-arginil éster 3-O-monoacilglicéridos o 1-O-arginil éster 2,3-O-diacilglicéridos (a los cuales se designará como **nnR**) mediante una hidrogenación catalítica en Pd/C o una acidolisis.

5 B) Procedimiento enzimático: la síntesis vía enzimática se ha llevado a cabo análogamente en 3 etapas:

10 1) Obtención del **00R (prot)**. Reacción de condensación del glicerol con el grupo carboxilo/éster de la arginina N<sup>α</sup>-protegida, empleando como catalizador un enzima hidrolítico, proteasas y lipasas preferentemente, en un medio en ausencia de disolvente y con un determinado porcentaje de agua.

2) Obtención del **nnR (prot)**. Reacción de acilación de el/los grupos hidroxilos libres del 00R (prot) con ácidos grasos libres o ésteres de estos ácidos, empleando como catalizador una lipasa. La reacción tiene lugar en medios sin disolvente en presencia de un pequeño porcentaje de agua para activar el enzima. En el caso de  
15 que se utilice la acetil-arginina como grupo protector el producto final, **nnR(acetil)**, no se someterá a la siguiente etapa.

3) Obtención del **nnR**. Si procede, eliminación del grupo protector N-α del derivado aminoácido mono o diacil glicérido, empleando técnicas convencionales rutinarias en síntesis peptídica (hidrogenación, tratamiento ácido o β-eliminación  
20 catalizada por bases).

La presente invención se refiere a unos nuevos compuestos tensioactivos derivados de arginina del tipo mono y diacilglicéridos diseñados para que actúen como agentes de superficie con actividad antimicrobiana. Las variaciones de actividad serán función del nº  
25 de cadenas grasas y de su longitud.

La purificación de los productos intermedios y finales se lleva a cabo mediante extracciones líquido/líquido, líquido/sólido, cristalizaciones, cromatografía de intercambio iónico y fase reversa (HPLC).

### Síntesis

A modo de ejemplo y sin que ello limite el procedimiento, a continuación se detalla un ejemplo de la obtención de un tensioactivo del tipo diacil glicerol éster con cadenas grasas de 8 átomos de carbono por vía química (88R) y uno del tipo monoacil glicerol éster de cadena grasa de 12 átomos de carbono por vía enzimática (120R). En ambos casos el aminoácido utilizado es arginina y el compuesto se obtiene en forma de sal clorhidratada.

#### A) Procedimiento químico:

El compuesto se prepara en 3 etapas tal como se ha mencionado anteriormente:

1) Preparación del 00R(Z). Se prepara una disolución 0.8-1.2 Molar de Z-Arg-OH en glicerol. Se añade un 10% en volumen de DMF y se calienta hasta una temperatura entre 45-60°C. A continuación se añade lentamente un 5% en volumen de BF<sub>3</sub>-eterato y se deja la reacción durante 5 horas. La solución se lleva a pH 6-6.5 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub>. El producto se aísla mediante una columna de intercambio iónico o bien mediante cromatografía líquida preparativa en fase reversa (HPLC).

2) Preparación de 88R(Z). Se prepara una disolución en el rango 0.8-1.1 Molar de 00R(Z) a la cual se añade cantidades catalíticas de una base orgánica terciaria (dimetil amino piridina, DMAP). A esta mezcla se le añade lentamente cloruro de octilo en una concentración 2.5-3 Molar. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 4-6 horas a una temperatura entre 15-25°C. Posteriormente se elimina el disolvente al vacío y la mezcla se purifica mediante la técnica de MPLC o de HPLC preparativo.

3) Preparación de 88R. La tercera etapa consiste en la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino de la arginina mediante una hidrogenación catalítica en un medio metanólico utilizando Pd/C y a presión atmosférica durante 4-6 horas. El producto así obtenido se disuelve en agua/HCl y se liofiliza con el fin de obtener los compuestos en forma de sales diclorhidratadas.



## B) Procedimiento enzimático

Como se ha mencionado en la memoria, el proceso consta de tres etapas:

1) Preparación del clorhidrato de 00R(Boc). En un reactor con cierre hermético se disuelve la tert-butiloxycarbonil arginina (1 eq) en glicerol (5 eq) conteniendo un 10 %  
5 de solución Bórico/NaOH 0.1 M pH 8.2. La homogeneización del medio tiene lugar mediante la introducción de agitación magnética. A la disolución se añade la proteasa papaina (1.7U/g de sólido; 1 unidad (U) de actividad corresponde, en este caso, a la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de benzoil arginina metil éster por minuto a pH 6.2 y 25°C. La mezcla de reacción se mantiene bajo atmósfera inerte, en agitación de tipo  
10 vaivén (200 rpm) o equivalente y termostatizada a 50 °C en un baño de agua. La reacción se sigue por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (HPLC) hasta que todo el tert-butiloxycarbonil arginina metil éster se ha consumido; aproximadamente unas 48 horas. El rendimiento en este punto y por HPLC es del 72%. A continuación se añade al medio de reacción un volumen igual de una mezcla metanol/ ácido acético 4:1 y se filtra  
15 a través de un lecho de celita para separar el enzima del medio de reacción con el producto. El filtrado previamente evaporado se disuelve en agua y se adsorbe en un lecho combinado de celita/ carbón activo 1:1. En una primera etapa tiene lugar la elución selectiva del glicerol presente en el medio por tratamiento con agua. Seguidamente se procede a la elución de 1- tert-butiloxycarbonil arginina-sn-glicerol por tratamiento con  
20 una mezcla metanol/agua 1:1.2. Tras evaporación y liofilización se obtiene un sólido blanco que se identifica por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protón y carbono. El rendimiento final es del 55 %.

2ª) Preparación del clorhidrato de 120R(Boc). En un reactor abierto conteniendo  
25 00R(Boc) (1 eq) y ácido láurico (2 eq) a 55°C conteniendo un 4 % (w/w) de agua, se añade la preparación comercial Novozym 435 manteniendo el medio en agitación y termostatizado a 55°C. La reacción se sigue por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (HPLC) hasta que todo el 1-tert-butiloxycarbonil arginina-sn-glicerol se haya consumido; aproximadamente unas 72 horas. El rendimiento en este punto y por HPLC es  
30 de un 65 %. A continuación se añade al medio de reacción un volumen igual de una mezcla acetonitrilo/agua/ácido acético 80:19:1 y se filtra para separar el soporte que

contiene el enzima del medio de reacción con el producto. La obtención del producto final se consigue mediante técnicas convencionales de cristalización y/o de cromatografía.

- 3ª) Obtención de diclorhidrato de 120R. Una vez purificado el clorhidrato de 120R(Boc), se procede a la desprotección de la función amina. El grupo tert-butiloxycarbonil se elimina mediante tratamiento ácido con ácido trifluoroacético (M.Bodansky, A. Bodansky, The Practice of Peptide Synthesis. Springer-Verlag (Heidelberg) 1984).
- Se ha evaluado por técnicas convencionales la concentración micelar crítica de los compuestos, parámetro que indica la actividad superficial de los tensioactivos en disolución acuosa. Asimismo la actividad antimicrobiana se ha determinado sobre la base de los valores de concentración mínima inhibitoria(MIC) expresada en µg/mL. En la tabla 1 se indican a modo de ejemplo estos parámetros para uno de los compuestos reivindicados en esta patente.

**Tabla 1. CMC y actividad antimicrobiana del tensioactivo 88R**

Compuesto	<u>CMC</u> M (25°C)	MIC (µg/mL)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
88R	6.3 x 10 <sup>-3</sup>	64	16	32	4	4	32	16	32	16	

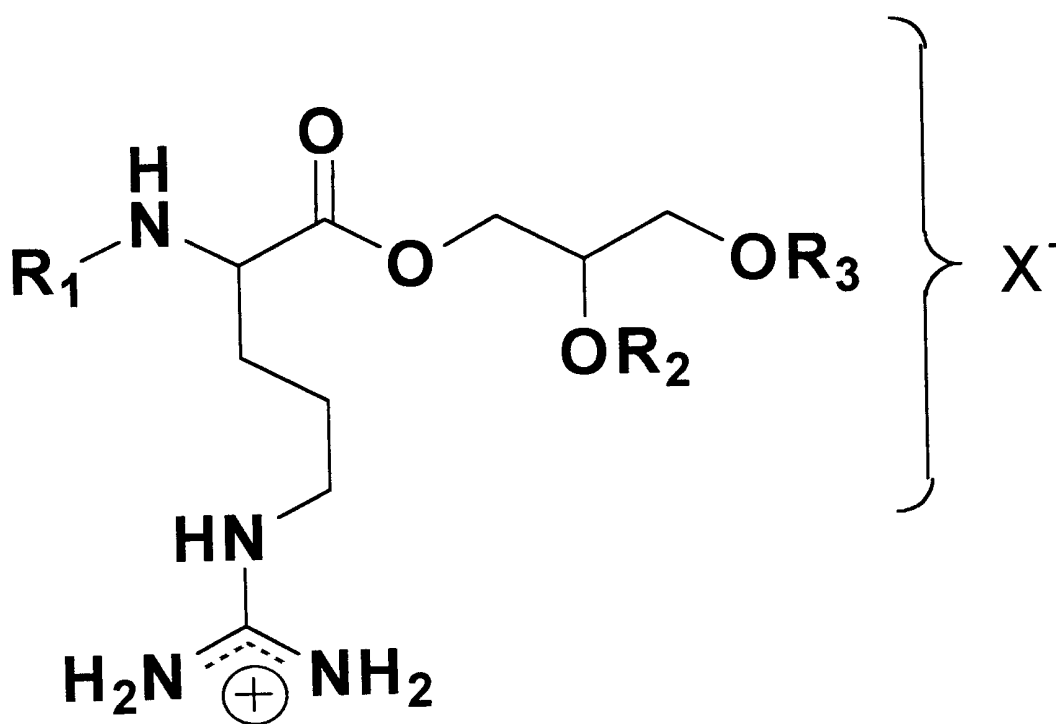
20

- 1- *Pseudomonas aeruginosa* 47T2  
 2.- *Streptococcus faecalis*  
 3.- *Proteus mirabilis*  
 4.- *Escherichia coli*  
 5.- *Candida tropicalis*  
 6.- *Candida lipolitica*  
 7.- *Staphylococcus aureus*  
 8.- *Bacillus cereus*  
 9.- *Bacillus pumillus*

30

## REIVINDICACIONES

1. Tensioactivos catiónicos del tipo 1-O-L-arginil éster 3-O- monoacil glicéridos y 1-O-L-arginil éster 2,3-O- diacil glicéridos como agentes antimicrobianos de elevada actividad superficial caracterizados por la fórmula general:



(I)

Donde:

10  $R_1$  puede ser un hidrógeno o un grupo acetil.

**R<sub>2</sub>** y **R<sub>3</sub>** pueden ser un hidrógeno o una cadena lineal preferentemente larga saturada o no saturada. **R<sub>2</sub>** y **R<sub>3</sub>** pueden ser seleccionados de un grupo de cadenas lineales de 8, 9, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono saturadas o no saturadas puras o sus mezclas.

2- Procedimiento de obtención químico o enzimático de tensioactivos de fórmula general según reivindicación 1 caracterizado por las siguientes etapas:

- Formación de 1-O-N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster, **00R(prot)**.
- Formación de 1-O-N-(prot)-arginil-3-O- monoacil-sn-glicerol éster, **n0R(prot)** o
- 5 1-O- N-(prot)-arginil-2,3-O- diacil-sn-glicerol éster, **nnR(prot)**.
- Si procede, eliminación del grupo protector N- $\alpha$  de la arginina mono o diacil glicérido para obtener 1-O-arginil-3-O- monoacil-sn-glicerol éster, **n0R** o 1-O-arginil-2,3-O- diacil-sn-glicerol éster, **nnR**.

10 3- Un procedimiento según la reivindicación 1 y 2 caracterizado por utilizar como compuestos de partida L-arginina pura o sus mezclas racémicas.

4- Un procedimiento según la reivindicación 1 y 2 caracterizado por utilizar como grupos protectores de la función  $\alpha$ -amino de la arginina los grupos acetil (Ac), benziloxycarbonil

15 (Z) y tert-butiloxycarbonil (Boc).

5- Un procedimiento de obtención según reivindicación 1 y 2 en el que la primera etapa del procedimiento químico se caracteriza por la obtención de los compuestos 1-O-N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster a partir de L-arginina N-protegida y glicerol utilizando

20  $\text{BF}_3$  como catalizador químico de la reacción.

6- Un procedimiento de obtención según reivindicación 1 y 2 en el que la primera etapa del procedimiento enzimático se caracteriza por la obtención de los compuestos 1-O-N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster, a partir de arginina N- $\alpha$  protegida, y glicerol mediante la

25 catálisis de un enzima hidrolítico, proteasas y lipasas preferentemente, en medios libres de disolvente.

7-Un procedimiento según reivindicación 1,2,5 y 6 caracterizado por emplear glicerol puro para la obtención de 1-O-N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster.

- 8- Un procedimiento según reivindicación 1,2,5 y 6 caracterizado por que la condensación del glicerol con la arginina N- $\alpha$  protegida tiene lugar de forma regioselectiva en la posición  $\alpha$  del N- $\alpha$  protegido.
- 5 9- Un procedimiento según reivindicación 1,2,5 y 6 caracterizado por que la condensación del glicerol con la arginina N- $\alpha$  protegida tiene lugar de forma regioselectiva en la posición 1(3) del glicerol.
- 10 10- Un procedimiento según reivindicación 1 y 2 en el que la segunda etapa del procedimiento químico se caracteriza por la acilación de los grupos hidroxilo libres de 1-O- N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster en un medio de piridina.
- 15 11- Un procedimiento según reivindicación 1, 2 y 11 caracterizado por el empleo de cloruros de ácido graso de cadena lineal de 8, 9, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono saturadas o no saturadas en la reacción de acilación de los grupos hidroxilo libres de 1-O- N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster.
- 20 12- Un procedimiento según reivindicación 1 y 2 en el que la segunda etapa del procedimiento enzimático, correspondiente a la reacción de acilación del ácido o éster de ácido graso con los grupos hidroxilo libres del derivado 1-O- N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster, tiene lugar mediante la mezcla de ambos compuestos sin la necesidad de ningún solvente.
- 25 13- Un procedimiento según reivindicación 1, 2 y 12 caracterizado por el empleo de ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos de cadena lineal de 8, 9, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono saturadas o no saturadas en la reacción de acilación de los grupos hidroxilo libres de 1-O- N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster.
- 30 14- Un procedimiento según reivindicación 1, 2 y 12 caracterizado por el empleo de enzimas hidrolíticos del tipo lipasas, como ahora las preparaciones comerciales Novozym y/o Lipozyme, como biocatalizadores de la reacción de acilación de los grupos hidroxilo libres de 1-O- N-(prot)-arginil-sn-glicerol éster.

- 15- Un procedimiento según reivindicación 1 y 2 en el cual opcionalmente y si es necesario la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino de la arginina se lleva a cabo bien por una hidrogenación catalítica con Pd/C o bien mediante una acidólisis.
- 5 16- Un procedimiento según reivindicación 1 y 2 caracterizado por que el progreso de la reacción se realiza mediante análisis por cromatografía líquida de alta eficacia, con una columna de tipo propilciano y C<sub>18</sub>, utilizando como eluyentes agua y acetonitrilo.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 01/00039

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C 279/14, C11D 1/50 //A61K 31/155

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)

IPC 7: C07C, C11D

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 practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 9621642 A (LABORATORIOS MIRET, S.A.) 18 July 1996 (18.07.96) The claims	1-16
Y	ES 8303312 A (CSIC, ASOCIACION DE INVESTIGACION DE DETERGENTES), 1 May 1983 (01.05.83) Claims 1, 6, 7	1-16
Y	EP 320976 A (AJINOMOTO), 21 June 1989 (21.06.89) Claim 1	1
Y	ES 2130980 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS), 1 July 1999 (01.07.99) The claims	2, 6
A	Database CAPLUS in STN, AN 1976: 510386 (CAS 85 : 110386). R Yoshida et al. "Surfactants derived from aminoacids. Some surface-active properties and antimicrobial activity of the salts of long-chain N- $\alpha$ -acyl-L-arginine esters" & Yukagaku, volume 25, 1976, pages 404-408.	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 April 2001 (23.04.01)

Date of mailing of the international search report  
4 June 2001 (04.06.01)

Name and mailing address of the ISA/  
S.P.T.O

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 01/00039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9621642 A	18.07.1996	CA 2185165	27.02.2001
		EP 749960	27.12.1996
		ES 2092958	01.12.1996
		BR 9603336	05.05.1998
		US 5780658	14.07.1998
		MX 9602787	01.01.1998
<u>ES 8303312 A</u>	<u>01.05.1983</u>	<u>NONE</u>	
<u>EP 320976</u>	<u>21.06.1989</u>	<u>US 5100655</u>	<u>31.03.1992</u>
		<u>JP 2000764</u>	<u>05.01.1990</u>
		<u>JP 2080667</u>	<u>20.03.1990</u>
		<u>JP 2131130</u>	<u>18.05.1990</u>
<u>ES 2130980</u>	<u>01.07.1999</u>	<u>NONE</u>	



**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**Solicitud internacional n°  
PCT/ES 01/00039**A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**CIP<sup>7</sup> C07C 279/14, C11D 1/50 //A61K 31/155

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

**B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA**

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C07C, C11D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	WO 9621642 A (LABORATORIOS MIRET, S.A.) 18.07.1996 Reivindicaciones.	1-16
Y	ES 8303312 A (CSIC, ASOCIACIÓN DE INVESTIGACIÓN DE DETERGENTES), 01.05.1983. Reivindicaciones 1,6,7.	1-16
Y	EP 320976 A (AJINOMOTO), 21.06.1989. Reivindicación 1.	1
Y	ES 2130980 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS), 01.07.1999. Reivindicaciones.	2,6
A	Base de datos CAPLUS en STN, AN 1976: 510386 (CAS 85:110386). R Yoshida et al. "Surfactants derived from aminoacids. Some surface-active properties and antimicrobial activity of the salts of long-chain N- $\alpha$ -acyl-L-arginine esters" & Yukagaku, volumen 25, 1976, páginas 404-408.	1,2

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 23 abril 2001 (23.04.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

4 JUN 2001 - 4. 06. 01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado  
Pilar FernándezC/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 349 53 52

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 01/00039

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9621642 A	18.07.1996	CA 2185165	27.02.2001
		EP 749960	27.12.1996
		ES 2092958	01.12.1996
		BR 9603336	05.05.1998
		US 5780658	14.07.1998
		MX 9602787	01.01.1998
ES 8303312 A	01.05.1983	NINGUNO	
EP 320976	21.06.1989	US 5100655	31.03.1992
		JP 2000764	05.01.1990
		JP 2080667	20.03.1990
		JP 2131130	18.05.1990
ES 2130980	01.07.1999	NINGUNO	