

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 076**

51 Int. Cl.:

C07K 5/083 (2006.01)
C07K 5/062 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A23K 20/147 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2021** **PCT/US2021/024142**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2021** **WO21195372**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2021** **E 21774898 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 4126040**

54 Título: **Enantiómeros lipófilos del dipéptido de muramilo de desacetilglucosamina con actividad antiinflamatoria y promotora del crecimiento**

30 Prioridad:

26.03.2020 US 202063000364 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2025

73 Titular/es:

NUTRIVERT INC. (100.00%)
3650 Dumbarton Road NW
Atlanta, Georgia 30327, US

72 Inventor/es:

NALLE, HORACE DISSTON, JR. y
KALTENBOECK, BERNHARD

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 3 014 076 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enantiómeros lipófilos del dipéptido de muramilo de desacetilglucosamina con actividad antiinflamatoria y promotora del crecimiento

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD PRIORITARIA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de Serie 63/000.364, presentada el 26 de marzo de 2020, titulada "Enantiómeros lipófilos del dipéptido de muramilo de desacetilglucosamina con actividad antiinflamatoria y promotora del crecimiento".

10

Campo de la invención

El campo de la presente invención se refiere a composiciones de enantiómeros de dipéptidos de muramilo lipófilos y a métodos para reducir la inflamación, promover el crecimiento y mejorar la conversión alimenticia en animales incluyendo seres humanos.

15

Estado de la técnica

El dipéptido de muramilo (MDP, por sus siglas en inglés) es la estructura mínima que se conserva en todos los peptidoglucanos bacterianos (PGN, por sus siglas en inglés). Está formado por ácido N-acetilmurámico (éter de N-acetilglucosamina y ácido D-láctico) unido mediante enlaces peptídicos a L-alanina y D-γ-glutamato o D-isoglutamina (MacDonald 2005).

20

Se sabe desde hace mucho tiempo que el PGN promueve una respuesta inflamatoria. Se descubrió que el subcomponente MDP de PGN era la estructura química mínima necesaria para provocar inflamación. El MDP también es necesario para la actividad adyuvante del adyuvante completo de Freund, una emulsión de un extracto micobacteriano (MacDonald 2005). Como un adyuvante, el MDP promueve una fuerte reacción inmunitaria que se usa para aumentar la eficacia de las vacunas cuando se inyecta junto con los antígenos de la vacuna.

25

Mientras estimula la inflamación extraintestinal, el MDP tiene efectos antiinflamatorios en el tracto intestinal y protege a los ratones de la colitis inducida experimentalmente (Watanabe 2008; Watanabe 2014).

30

Las propiedades antiinflamatorias intestinales del MDP brindan oportunidades para aplicaciones terapéuticas (Strober 2013). Sin embargo, el MDP es hidrófilo y se elimina rápidamente de la circulación a través de la excreción renal, por lo tanto, se requiere una administración repetida y de dosis altas para mediar la resistencia no específica a la infección o la actividad adyuvante (Fogler 1985).

35

Esta farmacocinética desfavorable y estos efectos secundarios graves motivaron muchas modificaciones químicas del MDP para corregir estas deficiencias. Las más exitosas entre ellas fueron las modificaciones lipídicas del MDP que aumentaron tanto la potencia como la semivida del MDP (Parant 1980; Matsumoto 1983; Fogler 1985).

40

Por tanto, los conjugados covalentes de lípidos y MDP han demostrado varias ventajas incluyendo biodisponibilidad oral mejorada, focalización tumoral mejorada y potencia terapéutica, toxicidad reducida y mayor carga del fármaco en portadores de administración tales como los liposomas (Fidler 1987; Irby 2017).

45

Sorprendentemente, la molécula completa de dipéptido de muramilo no es necesaria para la actividad biológica con MDP conjugado lipófilo. Incluso la fracción dipéptido L-alanina-D-isoglutamina MDP sin ácido N-acetilmurámico conserva la actividad inmunomoduladora del MDP, cuando se conjuga covalentemente con fracciones lipófilas. Por ejemplo, Gobec (2016) reemplaza con éxito el N-acetil muramilo con fracciones acilo en análogos de MDP de acilglicina-L-alanina-D-glutamato. Penney (1999) elimina por completo la fracción muramilo en octadecil L-alanina-D-isoglutamina que aún conserva una fuerte actividad inmunomoduladora.

50

Adicionalmente, tanto Penney (1999) como Gobec (2016) demuestran que la D-isoglutamina puede reemplazarse en los dipéptidos de desmuramilo lipófilos con D-glutamina o D-glutamato sin pérdida de función.

55

El crecimiento mejorado en los animales se mide ya sea por el crecimiento en masa por unidad de tiempo o por el crecimiento en masa por unidad de nutrición; a esto último a veces se lo denomina conversión alimenticia. La promoción del crecimiento mediante cualquiera de las medidas es económicamente útil en la producción de proteína animal para el consumo humano y otros animales porque reduce la cantidad de tiempo o alimento necesario para obtener ganancias iguales en masa corporal.

60

Los antibióticos administrados en dosis subinhibitorias se han usado durante mucho tiempo como promotores del crecimiento para mejorar el crecimiento de los animales de producción agrícola. Se supone que funcionan liberando componentes de las bacterias intestinales (postbióticos), incluyendo MDP, que suprimen la inflamación dentro del

tracto intestinal. Es muy probable que este mecanismo haya evolucionado para proteger a los animales de las respuestas dañinas a los billones de bacterias que habitan en su intestino.

- Debido a la inducción generalizada de resistencia a los antibióticos en bacterias mediante el uso de antibióticos como promotores del crecimiento, la sustitución de los antibióticos como promotores del crecimiento es muy deseable. Nalle y Kaltenboeck enseñan que la administración oral de dosis bajas de potentes análogos lipófilos de MDP mejora las tasas de crecimiento y la conversión alimenticia en animales (Nalle 2017), presumiblemente debido a la reducción de la inflamación intestinal asintomática y, por lo tanto, del estado inflamatorio sistémico de todo el cuerpo.
- 10 La producción del intermedio de ácido N-acetilmurámico MDP mediante síntesis química multietapa es difícil, lo que hace que los análogos lipófilos de MDP sean demasiado caros para su uso como promotores del crecimiento en el ganado. Esto hace que los dipéptidos de desmuramilo lipófilos inmunomoduladores sean los principales candidatos para la promoción del crecimiento sin antibióticos en animales.
- 15 Sidwell (1995) y Penney (1999) muestran que la octadecil D-alanina-L-glutamina, una molécula de imagen especular estereoquímica (enantiómero) del dipéptido de desmuramilo lipófilo de octadecil L-alanina-D-glutamina, es un inmunomodulador aún más fuerte que la octadecil L-alanina-D-glutamina.

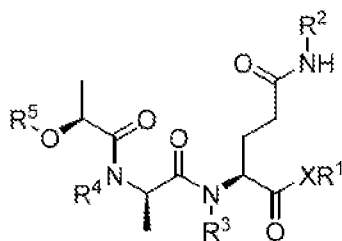
- Aunque parezca contraintuitivo, Zhou (2002) muestra que los péptidos D enantioméricos, que reflejan imágenes de los péptidos L que se unen a receptores naturales, se unen a su receptor afín tan fuertemente, o incluso más fuertemente, que los péptidos naturales. Adicionalmente, estos enantiómeros D del péptido son biológicamente muy activos porque son mucho más estables que sus homólogos L, siendo resistentes a la degradación debido a la ausencia de enzimas degradantes naturales.
- 25 La unión de péptidos enantioméricos al receptor afín, así como la mayor estabilidad de dichos péptidos que no se producen de forma natural, explica el fuerte efecto biológico del dipéptido de desmuramilo de octadecil D-alanina-L-glutamina (BCH-527). Este dipéptido también evita la síntesis complicada de la fracción de carbohidrato cíclico anisotrópico del ácido N-acetilmurámico y, por lo tanto, es un candidato análogo de MDP rentable para su uso como promotor del crecimiento en animales.

- 30 Como un enantiómero lipófilo de desmuramilo MDP, el dipéptido de desmuramilo de octadecil D-alanina-L-glutamina tiene dos inconvenientes: i) carece de la fracción de ácido láctico del ácido N-acetilmurámico que une la fracción N-acetilglucosamina del ácido murámico al dipéptido (Jeanloz 1970), por lo que puede perder cierta fuerza de unión a su receptor afín; ii) contiene el lípido alifático octadecílico de alto punto de fusión que no es óptimo para la inserción en la membrana celular (orientación celular), transporte intramembrana y liberación intracelular (Spector 1985; van Meer 2008) y, por lo tanto, desfavorece la escisión intracelular de la esterasa del enlace éster (Hatfield 2016) entre el dipéptido y el lípido que libera intracelularmente el componente dipeptídico activo de octadecil D-alanina-L-glutamina.

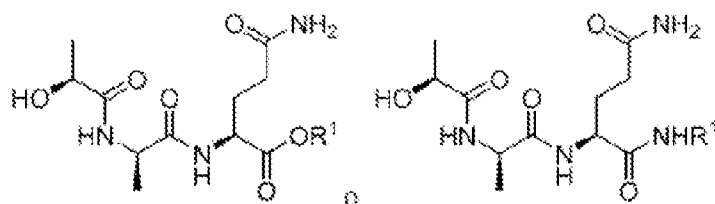
- En consecuencia, existe una necesidad de compuestos que maximicen la actividad inmunomoduladora de los enantiómeros lipófilos de desmuramilo MDP.

Explicación de la invención

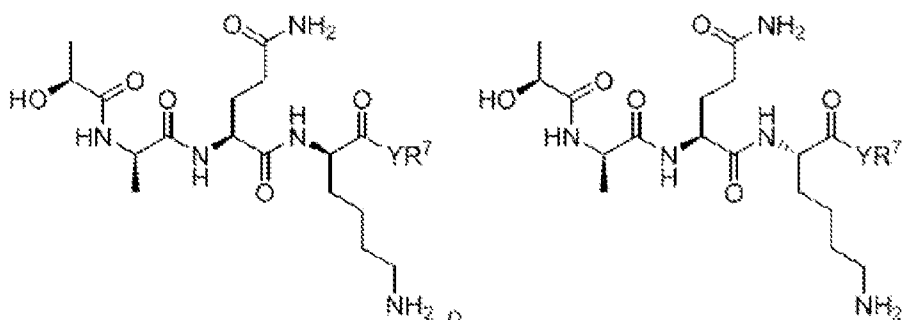
- Se describe en el presente documento un análogo oligopeptídico de MDP (también denominado en el presente documento oligopéptido o compuesto) que comprende una fracción L-lactato-D-alanina-L-glutamina. En algunos casos, el análogo no contiene la fracción N-acetilglucosamina de MDP. Los oligopéptidos descritos en el presente documento pueden tener la siguiente fórmula:



- 50 o un ácido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R¹ es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido; R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido; y X es O o NR⁶, donde R⁶ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido. Opcionalmente, X es O. Opcionalmente, R¹ es alquilo C₁-C₁₈ lineal o un aminoácido. En algunos casos, el oligopéptido tiene una de las siguientes estructuras:



En algunos casos, el oligopéptido tiene una de las siguientes estructuras:



donde R^7 es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido; e Y es O o NR^8 , donde R^8 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido. Opcionalmente, el oligopéptido es éster de L-lactato-D-alanina-L-glutamina-hexadecilo.

- En el presente documento también se describen composiciones que comprenden un compuesto como se describe en el presente documento. Opcionalmente, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un oligopéptido descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición comprende al menos un oligopéptido como se describe en el presente documento y pienso animal. El al menos un oligopéptido puede estar presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg/kg a 5 mg/kg. Opcionalmente, la composición comprende además un aditivo usado en la dieta de un animal (por ejemplo, una enzima, un probiótico, un prebiótico, un antioxidante, un antibiótico promotor del crecimiento, un agente colorante o una combinación de los mismos).
- En el presente documento se describen además métodos para reducir la inflamación intestinal en un ser humano, que comprende administrar una composición farmacéutica como se describe en el presente documento a un ser humano que tiene inflamación intestinal, donde la administración reduce la inflamación intestinal. Los métodos pueden comprender además la selección de un ser humano que tenga una enfermedad o afección asociada a la inflamación intestinal (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o una infección bacteriana). También se proporcionan en el presente documento métodos para promover el crecimiento en animales, donde los métodos comprenden administrar los compuestos o composiciones como se describen en el presente documento, donde la administración mejora el crecimiento del animal. También se proporcionan en el presente documento métodos para mejorar la conversión alimenticia en un animal, donde los métodos comprenden administrar los compuestos o composiciones como se describen en el presente documento, donde la administración mejora la conversión alimenticia en el animal.

Los detalles de una o más realizaciones se presentan en los dibujos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y de las reivindicaciones.

35 Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que representa la síntesis de éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (éster palmítico de lactato-dipéptido, LDPP).

- La Figura 2 contiene gráficos de barras que muestran la evaluación del efecto de promoción del crecimiento del éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) en pollos de engorde. (A) Las dietas experimentales se administraron desde el inicio el día 21 hasta la finalización el día 44 (tiempo constante de 24 días). (B) Ganancia de peso corporal por pollo en tiempo constante. Los datos mostrados son medias \pm intervalo de confianza del 95 % (IC

del 95 %). (C) Pienso total consumido por pollo en tiempo constante, media \pm IC 95 %. (D) Tasa de conversión alimenticia determinada dividiendo el alimento total consumido por las ganancias de peso totales de todos los pollos en un tiempo constante de cada grupo. Las barras de error indican los percentiles 25-75 de las conversiones alimenticias calculadas de corrales individuales. (E) Modelado del tiempo de alimentación necesario para una ganancia de peso idéntica a la de los controles no tratados (1.653 g de ganancia de peso constante). (F) Aumento de peso corporal por pollo con aumento de peso constante, media \pm IC 95 %. (G) Pienso total consumido por pollo con aumento de peso constante, media \pm IC 95 %. (H) Tasa de conversión alimenticia para ganancia de peso constante de cada grupo de tratamiento. Las tasas de morbilidad y mortalidad no difirieron significativamente entre los grupos. Las diferencias relevantes entre los grupos de tratamiento se indican mediante corchetes discontinuos y el p -valor correspondiente.

La Figura 3 contiene gráficos de barras que muestran la evaluación del efecto de promoción del crecimiento del éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) en cerdos de crianza. (A) Las dietas experimentales se administraron desde el inicio el día 0 hasta la finalización el día 42 (tiempo constante de 42 días). (B) Ganancia de peso corporal por cerdo en tiempo constante. Los datos mostrados son medias \pm intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %). (C) Pienso total consumido por cerdo en tiempo constante, media \pm IC 95 %. (D) Tasa de conversión alimenticia determinada dividiendo el alimento total consumido por las ganancias de peso totales de todos los cerdos en un tiempo constante de cada grupo. Las barras de error indican los percentiles 25-75 de las conversiones alimenticias calculadas de corrales individuales. (E) Modelado del tiempo de alimentación necesario para una ganancia de peso idéntica a la de los controles no tratados (22,076 kg de ganancia de peso constante). (F) Aumento de peso corporal por cerdo con aumento de peso constante, media \pm IC 95 %. (G) Pienso total consumido por cerdo con aumento de peso constante, media \pm IC 95 %. (H) Tasa de conversión alimenticia para ganancia de peso constante de cada grupo de tratamiento. Las tasas de morbilidad y mortalidad no difirieron significativamente entre los grupos. Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento se indican por p -valores en negrita.

Descripción detallada de la invención

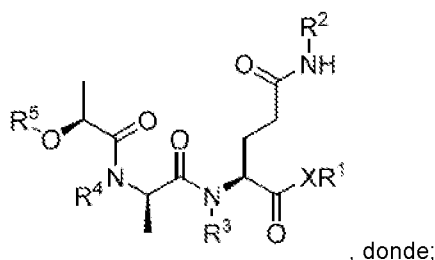
Se proporcionan en el presente documento composiciones que contienen un enantiómero lipófilo de dipéptido de muramilo de desacetilglucosamina (MDP) (por ejemplo, éster hexadecílico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina). Este compuesto mejora i) la fuerza de unión al receptor o receptores intracelulares afines al agrandar el dipéptido a través de la fracción L-lactato espejo adicional; y ii) maximiza la focalización intracelular y la liberación activa de dipéptidos a través de la mayor fluidez de la membrana proporcionada por el lípido alifático hexadecilo (palmitilo) de menor punto de fusión.

Cuando se administran a seres humanos o animales, las composiciones que contienen el enantiómero lipófilo de MDP reducen la inflamación, promueven el crecimiento y mejoran la conversión alimenticia. Por lo tanto, se proporcionan métodos para reducir la inflamación en seres humanos y animales y métodos para promover el crecimiento y mejorar la conversión alimenticia en animales. De acuerdo con los métodos, el enantiómero lipófilo de MDP se combina con un ácido farmacéuticamente aceptable o una sal de adición del mismo, un portador farmacéutico o pienso animal, que a continuación se administra al animal o al ser humano en una cantidad suficiente para lograr la reducción deseada de la inflamación, la promoción del crecimiento o la mejora de la conversión alimenticia.

I. Compuestos

Se describen en el presente documento análogos oligopeptídicos del dipéptido de muramilo de desacetilglucosamina (MDP). Los análogos pueden incluir una fracción de L-lactato-D-alanina-L-glutamina unida a una molécula lipídica orgánica y cualquier ácido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el análogo no contiene la fracción N-acetilglucosamina de MDP.

En algunos casos, los compuestos descritos en el presente documento incluyen la **Fórmula I**:

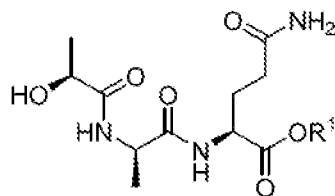


En la **Fórmula I**, R^1 es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido. Opcionalmente, R^1 es un alquilo C_1 - C_{18} lineal. Opcionalmente, R^1 es un aminoácido, tal como un grupo lisina (D-lisina o L-lisina).

También en la **Fórmula I**, R^2 , R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido.

Adicionalmente en la **Fórmula I**, X es O o NR^6 , donde R^6 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido.

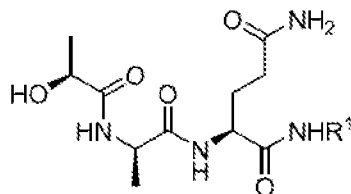
Opcionalmente, los compuestos de **Fórmula I** pueden incluir compuestos de acuerdo con la **Estructura I-A**:



Estructura I-A

En la **Estructura I-A**, R^1 se define como anteriormente para la **Fórmula I**.

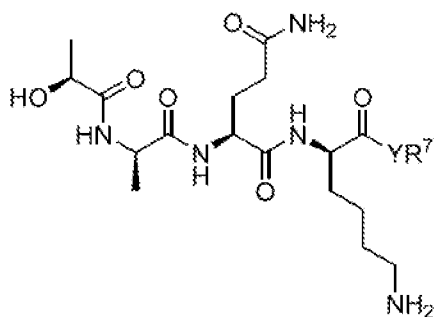
Opcionalmente, los compuestos de **Fórmula I** pueden incluir compuestos de acuerdo con la **Estructura I-B**:



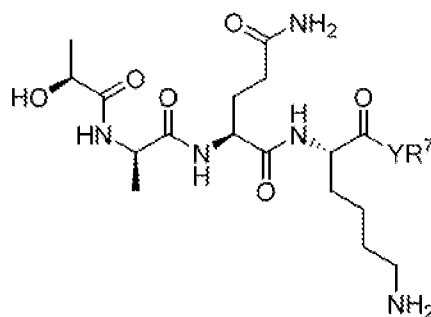
Estructura I-B

En la **Estructura I-B**, R^1 se define como anteriormente para la **Fórmula I**.

Opcionalmente, los compuestos de **Fórmula I** pueden incluir compuestos de acuerdo con la **Estructura I-C** o la **Estructura I-D**:



Estructura I-C



Estructura I-D

En la **Estructura I-C** y la **Estructura I-D**, R^7 es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido. También en la **Estructura I-C** y la **Estructura I-D**, Y es O o NR^8 , donde R^8 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido.

El alquilo puede ser un alquilo de cadena lineal o un alquilo de cadena ramificada. En algunos casos, el alquilo de cadena lineal puede ser un alquilo C_1 - C_{18} (por ejemplo, un alquilo C_2 - C_{17} o un alquilo C_3 - C_{16}). Algunos ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo u octadecilo. En algunos casos, el oligopéptido es éster de L-lactato-D-alanina-L-glutamina-hexadecilo, también denominado en el presente documento éster palmitílico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (éster palmitílico de lactato-dipéptido, LDPP) o (2S)-5-amino-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-hidroxiopropanoil]amino]propanoil]amino]-5-oxo-pentanoato de hexadecilo.

Opcionalmente, el grupo arilo incluye un grupo fenilo. Opcionalmente, el grupo arilo puede incluir anillos fusionados adicionales, por ejemplo, naftaleno, antraceno y pireno. Los grupos arilo y heteroarilo pueden unirse en cualquier posición en el anillo, salvo que se indique lo contrario.

- 5 Los grupos alquilo y arilo usados en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Como se usan en el presente documento, el término sustituido incluye la adición de un grupo funcional a una posición unida a la cadena principal del grupo alquilo o arilo, por ejemplo, el reemplazo de un hidrógeno por una de estas moléculas. Los ejemplos de grupos de sustitución incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, halógeno (por ejemplo, F, Br, Cl o I) y grupos carboxilo. Por el contrario, como se usa en el presente documento, la expresión no sustituido indica que el grupo
- 10 alquilo o arilo tiene un complemento completo de hidrógenos, es decir, proporcional a su nivel de saturación, sin sustituciones, por ejemplo, hexadecilo lineal $-(CH_2)_{15}-CH_3$.

II. Métodos para preparar los compuestos

- 15 Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse de una diversidad de maneras. Los compuestos pueden sintetizarse usando diversos métodos sintéticos. Al menos algunos de estos métodos son conocidos en la técnica de la química orgánica sintética. Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes particulares usados, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la
- 20 materia.

Las variaciones de la **Fórmula I** y los compuestos descritos en el presente documento incluyen la adición, la sustracción o el movimiento de los diversos constituyentes como se describe para cada compuesto. De manera similar, cuando uno o más centros quirales están presentes en una molécula, se incluyen todas las variantes quirales posibles.

- 25 Adicionalmente, la síntesis de compuestos puede implicar la protección y la desprotección de diversos grupos químicos. El uso de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados pueden determinarse por un experto en la materia. La química de grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en Wuts, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 5^a. Ed., Wiley & Sons, 2014.

- 30 Las reacciones para producir los compuestos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en disolventes, que pueden seleccionarse por un experto en la materia de la síntesis orgánica. Los disolventes pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos en las condiciones a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperatura y presión. Las reacciones pueden llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. El producto o la formación de intermedios pueden
- 35 controlarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto puede controlarse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopía por resonancia magnética nuclear (por ejemplo, RMN 1H o RMN ^{13}C), espectroscopía infrarroja (IR), espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible) o espectrometría de masas (EM) o por cromatografías tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC).

- 40 Los métodos ilustrativos para sintetizar compuestos como se describe en el presente documento se proporcionan en el Ejemplo 1 a continuación, representando la síntesis de LDPP a modo de ejemplo.

III. Formulaciones

- 45 También se describen en el presente documento composiciones que incluyen un compuesto de **Fórmula I** como se describe en el presente documento (por ejemplo, al menos un oligopéptido análogo de MDP) y un portador. Opcionalmente, la composición incluye éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) y un portador.

- 50 En algunos casos, la composición incluye un compuesto de **Fórmula I** como se describe en el presente documento, tal como, por ejemplo, LDPP y piensos para animales. Puede usarse cualquier pienso animal adecuado, incluyendo piensos para animales que incluyan uno o más de maíz, sorgo, trigo, cebada, avena, harina de soja, harina de pescado y/o suero de leche. Opcionalmente, el compuesto de **Fórmula I** puede incluirse en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg/kg a 5 mg/kg (por ejemplo, de 0,05 mg/kg a 4,5 mg/kg, de 0,1 mg/kg a 4 mg/kg, de
- 55 0,15 mg/kg a 3,5 mg/kg o de 0,2 mg/kg a 3 mg/kg). En algunos ejemplos, el compuesto de **Fórmula I**, tal como LDPP, puede incluirse en una composición que incluye pienso para animales en una cantidad de 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,9 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg o 5,0 mg/kg. La composición del pienso para
- 60 animales puede incluir además aditivos usados en las dietas de los animales, incluyendo enzimas, probióticos, prebióticos, antioxidantes, promotores de crecimiento antibióticos y agentes colorantes.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser adecuadas para administración oral, parenteral, pulverizador de inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o depósito implantado. El término parenteral como se

usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Opcionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía intranasal, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía intramucosa, por vía intramuscular, por pulverización por inhalación, por vía rectal, por vía nasal, por vía sublingual, por vía bucal, por vía vaginal o a través de un depósito implantado.

Los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica. En algunos casos, las composiciones son composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de **Fórmula I** y un portador farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del modo de administración previsto, la composición farmacéutica puede estar en forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, pastillas, cápsulas, polvos, líquidos o suspensiones, preferentemente en una forma farmacéutica unitaria adecuada para la administración única de una dosis exacta. Las composiciones incluirán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto descrito en el presente documento o derivados del mismo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores o diluyentes. Por farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otra manera, que puede administrarse a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin provocar efectos biológicos inaceptables ni interactuar de manera perjudicial con los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Las composiciones pueden incluir uno o más de los compuestos descritos en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usan en el presente documento, el término portador abarca cualquier excipiente, diluyente, material de relleno, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, lípido, estabilizante u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. La elección de un portador para su uso en una composición dependerá de la vía de administración prevista para la composición. La preparación de portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Adeboye Adejare ed., 23ª Ed., Academic Press (2021). Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como tampones fosfato, tampón citrato y tampones con otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN® (ICI, Inc.; Bridgewater, New Jersey), polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™ (BASF; Florham Park, NJ).

Las composiciones que contienen el compuesto descrito en el presente documento o derivados del mismo adecuados para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de microorganismos puede promoverse mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares también pueden incluirse. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral de los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos se mezclan con al menos un excipiente (o portador) habitual inerte, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, o (a) materiales de relleno o extensores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardadores de solución, como por ejemplo, parafina, (f) acelerantes de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita e (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles

sólidos, laurilsulfato sódico y/o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y pastillas, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como materiales de relleno en cápsulas de gelatina
5 blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y granulados pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros conocidos en la técnica.
10 Pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de tal composición que liberen el compuesto o compuestos activos en una parte determinada del tracto intestinal de manera retardada. Como ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. El compuesto activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

15 Las formas de dosificación líquidas para administración oral o intravenosa de los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes
20 solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias y similares.

25 Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir agentes adicionales, tales como agentes humectantes, emulsionantes, de suspensión, edulcorantes, saborizantes o perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, puede contener agentes adicionales, como por ejemplo,
30 alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias y similares.

Como se ha descrito anteriormente, el uno o más compuestos descritos en el presente documento pueden proporcionarse con un nebulizador, que es un instrumento que genera partículas líquidas muy finas de tamaño
35 sustancialmente uniforme en un gas. El líquido que contiene uno o más compuestos descritos en el presente documento se puede dispersar en forma de gotitas de aproximadamente 5 mm o menos de diámetro en forma de niebla. Las pequeñas gotitas pueden transportarse por una corriente de aire a través de un tubo de salida del nebulizador. La bruma resultante puede penetrar en el tracto respiratorio del paciente.

40 Los inhalantes adicionales útiles para la administración de los compuestos descritos en el presente documento incluyen pulverizaciones intraorales, brumas, inhaladores de dosis medidas y generadores de polvo seco (véase Gonda, *J. Pharm. Sci.* 89:940-945, 2000).

Por ejemplo, una composición en polvo que contiene el uno o más compuestos como se describe en el presente
45 documento, con o sin un lubricante, portador o propulsor, pueden administrarse a un paciente. La administración de uno o más compuestos en forma de polvo puede llevarse a cabo con un dispositivo convencional para administrar una composición farmacéutica en polvo por inhalación.

Las composiciones de los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos para
50 administraciones rectales son opcionalmente supositorios, que pueden prepararse mezclando los compuestos con excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperaturas habituales pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el componente activo.

55 Las formas de dosificación para administración tópica de los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos incluyen pomadas, polvos, pulverizadores e inhalantes. Los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos se mezclan en condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse. Las formulaciones oftálmicas, pomadas, polvos y soluciones también se contemplan estando dentro del alcance de las composiciones.

60 Como se ha indicado anteriormente, las composiciones pueden incluir uno o más de los compuestos descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión sal farmacéuticamente aceptable se refiere a aquellas sales del compuesto descrito en el presente documento o derivados del mismo que son, dentro del ámbito del buen criterio médico, adecuados para su uso en

contacto con los tejidos de los sujetos sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, en consonancia con una relación razonable entre beneficio/riesgo y que son eficaces para su uso previsto, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos descritos en el presente documento. El término sales se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos relativamente no tóxicas de los compuestos descritos en el presente documento. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma de base libre por separado con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar las sales formadas de esta manera. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, sulfonato de metano, laurilsulfonato y similares. Estas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes no tóxicos amonio, amonio cuaternario y amina incluyendo, pero no limitado a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. (Véase S.M. Barge *et al.*, J. Pharm. Sci. (1977) 66, 1).

La administración de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede llevarse a cabo usando cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento durante períodos de tiempo efectivos para tratar un trastorno. La cantidad efectiva de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento puede determinarse por un experto en la materia e incluye administraciones ilustrativas para un animal o un ser humano en una dosis que suministra el compuesto activo al sujeto en una cantidad entre aproximadamente $0,01 \times (PC/20)^{3/4} \mu\text{g}$ y $10.000 \times PC/20)^{3/4} \mu\text{g}$ por día, donde PC es el peso corporal del sujeto en gramos. Esta cantidad puede administrarse en una sola dosis o en forma de dosis individuales divididas, tales como de 1 a 4 veces por día.

Aquellos expertos en la materia entenderán que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular pueden variarse y dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la especie, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto, el modo y la frecuencia de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular.

La dosis exacta que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá según el criterio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a la obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o con modelos animales. Además, dependiendo de la vía de administración, un experto en la materia sabría cómo determinar las dosis que dan como resultado una concentración plasmática para un nivel deseado de respuesta en las células, los tejidos y/o los órganos de un sujeto.

40 IV. Métodos de uso

En el presente documento se proporcionan métodos que incluyen administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La expresión "cantidad eficaz", cuando se usa para describir una cantidad de compuesto en un método, se refiere a la cantidad de un compuesto que logra el efecto farmacológico deseado u otro efecto, por ejemplo, una cantidad que resulta en un crecimiento o conversión alimenticia mejorados.

En el presente documento se proporcionan métodos para promover el crecimiento de un animal, junto con métodos para mejorar la conversión alimenticia en un animal. Los métodos comprenden administrar un compuesto o una composición como se describe en el presente documento al animal. La administración puede mejorar el crecimiento del animal y/o mejorar la conversión alimenticia del animal en comparación con un control (un animal al que no se le administra un compuesto o composición como se describe en el presente documento).

Los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección asociada con la inflamación intestinal. Como tal, en el presente documento se proporcionan métodos para reducir la inflamación intestinal en un ser humano que comprenden administrar una composición como se describe en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento) a un ser humano que tiene inflamación intestinal, donde la administración reduce la inflamación intestinal. Opcionalmente, el ser humano tiene o está en riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o una infección bacteriana (tal como infección por *Clostridium difficile*). Los métodos pueden incluir además la selección de un ser humano que tenga una enfermedad o afección asociada a la inflamación intestinal (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o una infección bacteriana).

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar las enfermedades y las afecciones descritas en el presente documento en seres humanos, incluyendo, sin limitación, poblaciones pediátricas y geriátricas, y en animales, por ejemplo, aplicación veterinaria.

5

V. Kits

También se proporcionan en el presente documento kits para promover el crecimiento en un animal, junto con métodos para mejorar la conversión alimenticia en un animal. Un kit puede incluir cualquiera de los compuestos o las composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede incluir un compuesto de **Fórmula I**. Un kit puede incluir además uno o más agentes adicionales, tales como alimentos para animales y/o suplementos alimenticios para animales. Un kit puede incluir una formulación oral de cualquiera de los compuestos o las composiciones descritos en el presente documento. Un kit puede incluir además instrucciones de uso del kit (por ejemplo, instrucciones para tratar a un sujeto), un recipiente, un medio para administrar los compuestos o las composiciones y/o un portador.

También se proporcionan en el presente documento kits para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a la inflamación intestinal en un sujeto. Un kit puede incluir cualquiera de los compuestos o las composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede incluir un compuesto de **Fórmula I**. Un kit puede incluir además uno o más agentes adicionales, tales como agentes antiinflamatorios. Un kit puede incluir una formulación oral de cualquiera de los compuestos o las composiciones descritos en el presente documento. Un kit puede incluir además instrucciones de uso del kit (por ejemplo, instrucciones para tratar a un sujeto), un recipiente, un medio para administrar los compuestos o las composiciones y/o un portador.

Como se usan en el presente documento los términos tratamiento, tratar o tratando se refieren a un método para reducir uno o más síntomas de una enfermedad o una afección. Por lo tanto, en el método desvelado, tratamiento puede referirse al 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % de reducción en la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o la afección. Por ejemplo, un método para tratar una enfermedad se considera un tratamiento si hay un 10 % de reducción en uno o más síntomas o signos de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Como se usa en el presente documento, control se refiere a la afección no tratada. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 % o cualquier reducción porcentual entre el 10 % y el 100 % en comparación con los niveles naturales o de control. Se entiende que el tratamiento no significa necesariamente una cura o eliminación completa de la enfermedad, la afección o los síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, los términos prevenir, previniendo y prevención de una enfermedad o un trastorno se refieren a una acción, por ejemplo, administración de una composición o un agente terapéutico, que se produce antes o aproximadamente al mismo tiempo en que un sujeto comienza a mostrar uno o más síntomas de la enfermedad o el trastorno, que inhibe o retrasa la aparición o la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o el trastorno.

Como se usa en el presente documento, las referencias a disminuir, reducir o inhibir incluyen un cambio del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más en comparación con un nivel de control. Estos términos pueden incluir, pero no necesariamente incluyen, eliminación completa.

Como se usa a lo largo de todo el documento, por sujeto se entiende un individuo. Preferentemente, el sujeto es un mamífero tal como un primate y, más preferentemente, un ser humano. Los primates no humanos son sujetos igualmente. El término sujeto incluye animales domesticados, tales como gatos, perros, etc., ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), aves de granja (pollos, pavos, palomas, gansos, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, hurón, chinchilla, ratón, conejo, rata, jerbo, cobaya, etc.). Por lo tanto, los usos veterinarios y las formulaciones médicas se contemplan en el presente documento. En esta divulgación los sujetos no humanos también se denominan animales.

Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar más la presente invención sin, al mismo tiempo, sin embargo, constituir cualquier limitación de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP)

60

El éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) se sintetizó de acuerdo con el método que se detalla a continuación y se representa en la Figura 1.

El éster hexadecílico de *terc-butiloxicarbonil* (BOC) L-glutamina se preparó en la **etapa a** mediante reacción de esterificación de BOC-glutamina (1) con 1-hexadecanol (2) en tetrahidrofurano, en presencia de carbodiimida de dicitclohexilo, para producir hexadecil BOC-L-glutamina (3). El grupo protector BOC se eliminó en la **etapa b** mediante tratamiento del intermedio (3) disuelto en cloruro de metileno con gas cloruro de hidrógeno para obtener la sal de clorhidrato de hexadecil L-glutamina (4). El Intermedio (4) se disolvió en N,N-dimetilformamida, se añadió N,N-diisopropiletilamina seguida de BOC D-alanina (5) y el agente de acoplamiento hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP), para obtener en la **etapa c** el dipéptido de hexadecilo protegido con BOC 6. El intermedio 6 se purificó mediante cromatografía en columna y el grupo BOC se eliminó en la **etapa d** mediante tratamiento del producto con cloruro de hidrógeno gaseoso para obtener dipéptido de hexadecilo 7. Al intermedio (7) disuelto en N,N-dimetilformamida en presencia de N,N-diisopropiletilamina y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (Hexafluorofosfato Benzotriazol Tetrametil Uronio, HBTU), se añadió L-lactato de litio (8) y la **etapa e** rindió el producto final éster hexadecílico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (9). El éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina blanco con un PM de 513,72 g/mol tenía una pureza mayor del 98 %, según lo determinado por análisis por resonancia magnética nuclear ¹H.

Ejemplo 2: Impacto del LDPP en la tasa de crecimiento y la conversión alimenticia en pollos

El objetivo de este experimento fue evaluar si la suplementación del alimento con éster palmítico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) a 0,2 mg/kg de pienso aumenta la tasa de crecimiento y/o mejora la conversión alimenticia en pollos de engorde, es decir, si promueve el crecimiento haciendo que los pollos de engorde crezcan más rápido y/o requieran menos alimento para la misma cantidad de ganancia de peso corporal. Un objetivo secundario fue comparar el efecto del LDPP con el de la bacitracina, un antibiótico promotor del crecimiento convencional de la industria.

25 Diseño experimental

Los pollos de engorde hembras Ross 708 recién nacidos se alojaron como una sola parvada durante 21 días en un corral de suelo con lecho usado. Durante este tiempo todos los pollos recibieron piensos de inicio y crecimiento convencional Aviagen 708 desmenuzados y sin tratar, con 80 % de proteína bruta recomendada y sin suplemento anticoccidial. Después de 3 semanas, los pollos se agruparon en 38 corrales de suelo replicados de 25 pollos con lecho nuevo. Los pollos se alimentaron durante 24 días desde el día 21 hasta la terminación el día 44 con pienso de finalización desmenuzado convencional Aviagen 708 con 100 % de proteína y 0,0125 % de inclusión anticoccidial de amprolio. El pienso y el agua estuvieron disponibles a libre demanda durante todo el ensayo. Se asignaron trece corrales a controles no tratados (alimento sin suplemento) y tratamiento con LDPP (0,2 mg de LDPP/kg de pienso), y 12 corrales se asignaron al tratamiento con bacitracina (50 mg de bacitracina/kg de pienso). La unidad experimental fue el corral en lugar de pollos individuales. Los pesos de los pollos en el corral se determinaron los días 21 y 44. Se registró la captación de pienso finalizador y el día 44 se determinó el pienso residual y se dio por terminado el experimento.

40 Análisis estadísticos

Para análisis de tiempo constante de la duración completa de 24 días del experimento de alimentación, la conversión alimenticia general (real) para cada grupo de tratamiento se determinó dividiendo el alimento total consumido por las ganancias de peso totales de todos los corrales de cada grupo de tratamiento.

Para análisis de aumento de peso corporal constante, el tiempo de alimentación de los grupos tratados con bacitracina y LDPP se modeló para que coincidiera con la ganancia de peso del grupo de control no tratado. Basándose en los pesos corporales y las ganancias de peso estrechamente coincidentes de las hembras convencionales de pollos de engorde Ross 708, las ganancias de peso corporal por pollo en el último día 44 del experimento se calcularon como la fracción de 0,04781 de la ganancia de peso corporal del corral los días 21-44/pollos supervivientes por corral. La ganancia de peso corporal media de cada grupo de tratamiento se ajustó a la media de control restando iterativamente las mismas fracciones de la ganancia de peso corporal calculada el día 44 de todos los corrales de un tratamiento hasta que se encontró un solo día fraccional que produjo una ganancia de peso coincidente con el grupo de control. De manera similar, el consumo de pienso por pollo el día 44 se calculó como la fracción de 0,05867 del consumo de pienso del corral los días 21-44/pollos supervivientes por corral. A continuación se calculó el consumo medio de pienso por grupo de tratamiento restando el consumo diario fraccional de pienso encontrado previamente de cada corral.

Los datos de aumento de peso corporal y consumo de alimento se analizaron mediante ANOVA unidireccional y corrección de Diferencia Honestamente Verdadera de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias entre grupos en las tasas de conversión alimenticia se evaluaron a partir de los datos de FCR del corral mediante la prueba U de Mann Whitney no paramétrica.

Resultados y conclusiones

LDPP, suplementado a 0,2 mg/kg de pienso, mejora significativamente la tasa de crecimiento de los pollos de engorde al aumentar la ganancia de peso de los pollos tratados con LDPP en un 4,4 % a 1.725 g en comparación con la ganancia de peso de 1.653 g de los pollos de control no tratados. Esto dio como resultado un crecimiento altamente significativo, casi un día más rápido en los pollos tratados con LDPP en comparación con los controles (23,13 frente a 24 días). La tasa de conversión alimenticia de los pollos tratados con LDPP frente a los no tratados mejora a tiempo constante de 1,818 a 1,805, y más marcadamente en un 1,7 % a 1,787 con un aumento de peso corporal constante. El efecto promotor del crecimiento del LDPP es significativamente más fuerte que el de la bacitracina, un antibiótico promotor del crecimiento convencional de la industria, que mostró una tasa de conversión alimenticia significativamente mayor de 1,827 a ganancia de peso corporal constante. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3: Impacto del LDPP en la tasa de crecimiento y conversión alimenticia en cerdos

El objetivo de este experimento fue evaluar si la suplementación del alimento con éster palmitílico de L-lactato-D-alanina-L-glutamina (LDPP) a 0,2 mg/kg de pienso aumenta la tasa de crecimiento y/o mejora la conversión alimenticia en lechones recientemente destetados.

Diseño experimental

En este estudio se usaron cerdos machos (cerdos castrados). Los cerdos se destetaron aproximadamente a las 3 semanas de edad, se transfirieron a la guardería y se asignaron aleatoriamente a 24 corrales de guardería con 4 cerdos por corral. Uno de los 2 tratamientos dietéticos, controles no tratados (pienso sin suplemento) o tratamiento con LDPP (0,2 mg de LDPP/kg de pienso), se asignó a cada corral, de tal manera que se usaron 12 corrales de 4 cerdos para evaluar el efecto de cada dieta. Se añadieron premezclas de los compuestos de tratamiento al 0,1 % a las dietas mixtas, que a continuación se granularon. La dieta de la Fase 1 se administró a razón de 2,72 kg (6 lb) por cerdo desde el día 0 hasta aproximadamente el día 8 después del destete. El día 8 después del destete, los cerdos se cambiaron a una dieta de Fase 2 de 5,44 kg (12 lb)/cerdo que expiró aproximadamente el día 18. Una vez consumida la dieta de la Fase 2, los cerdos se cambiaron a la dieta de la Fase 3 y se mantuvieron hasta la finalización del estudio el día 42. No se añadieron antibióticos a ninguna dieta. Las dietas se formularon para cumplir o superar todos los requisitos de nutrientes según las especificaciones de NRC de 2012. Los cerdos recibieron dietas y agua a libre demanda. Los cerdos se pesaron individualmente los días 0 y 42 del experimento. Se controló el consumo de alimento por corral durante el período de pesaje. Aunque se obtuvieron pesos individuales de los cerdos, el corral fue la unidad experimental. El día 42, el estudio se dio por terminado y los cerdos no tratados se mantuvieron en la cadena alimenticia mientras que los cerdos tratados fueron sacrificados.

Análisis estadísticos

Los datos del corral se convirtieron en datos de cerdos individuales dividiéndolos por el número de cerdos. Para tres corrales en los que se sacrificaron cerdos, se usó un número de cerdos fraccional en el tiempo. Los datos de aumento de peso corporal y consumo de alimento calculado se analizaron mediante una prueba T por pares. La conversión alimenticia general (real) para cada tratamiento se determinó dividiendo el alimento total consumido por las ganancias de peso totales de todos los corrales de cada tratamiento. Las diferencias de tratamiento en la conversión alimenticia se evaluaron estadísticamente mediante la prueba U de Mann Whitney no paramétrica de datos de conversión alimenticia del corral.

Para análisis de aumento de peso corporal constante, el tiempo de alimentación del grupo tratado con LDPP se modeló para que coincidiera con la ganancia de peso del grupo de control no tratado. Los pesos corporales diarios y las ganancias de peso se modelaron mediante interpolación lineal entre los pesos de los días 0 y 42. La ganancia de peso corporal media del grupo de tratamiento LDPP se ajustó a la media de control restando las ganancias de peso corporal calculadas de los días 42 y 41, y a continuación restando iterativamente las mismas fracciones de la ganancia de peso corporal calculada del día 40 de todos los corrales del tratamiento LDPP hasta que se encontró un solo día fraccional que produjo una ganancia de peso coincidente con el grupo de control. A partir de datos de peso corporal diario interpolados, el consumo diario de pienso se calculó inicialmente como el 5 % del peso corporal. La suma de estos consumos diarios de pienso se dividió a continuación entre el consumo de pienso pesado real de cada corral, y los consumos de pienso diarios se multiplicaron por esta fracción para llegar al consumo de pienso pesado preciso por corral. Estos consumos diarios de pienso calculados se usaron para calcular el consumo de pienso según los horarios modificados de alimentación para el grupo de tratamiento LDPP. A continuación se calculó el consumo medio de pienso del grupo de tratamiento LDPP restando para cada corral el consumo de alimento de los días 42 y 41 encontrado previamente y el consumo de pienso fraccional del día 40.

Los datos de ganancia de peso corporal y consumo de pienso se analizaron mediante ANOVA unidireccional y prueba de la T de Student. Las diferencias en las tasas de conversión alimenticia se evaluaron a partir de los datos de FCR del corral mediante la prueba U de Mann Whitney no paramétrica.

Resultados y conclusiones

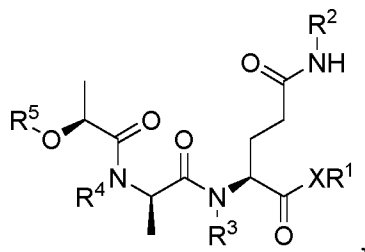
LDPP, suplementado a 0,2 mg/kg de pienso, mejora significativamente la tasa de crecimiento de los lechones al aumentar la ganancia de peso de los cerdos tratados con LDPP en un 7,9 % a 23,826 kg en comparación con la ganancia de peso de 22,076 kg de los lechones no tratados. Esto dio como resultado un crecimiento altamente significativo, casi 2,1 días más rápido en los cerdos tratados con LDPP en comparación con los controles (39,921 frente a 42 días). La tasa de conversión alimenticia de los cerdos tratados con LDPP frente a los no tratados mejora el 3,8 % a tiempo constante de 1,479 a 1,423, y más marcadamente en un 5,5 % a 1,396 con una ganancia de peso corporal constante. Los resultados se muestran en la Figura 3.

10 REFERENCIAS

1. MacDonald, C., N. Inohara, G. Nuñez. 2005. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 20177-20180.
2. Watanabe, T., N. Asano, P. J. Murray, K. Ozato, P. Tailor, I. J. Fuss, A. Kitani, W. Strober. 2008. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 545-559.
3. Watanabe, T., N. Asano, G. Meng, K. Yamashita, Y. Arai, T. Sakurai, I. J. Fuss, A. Kitani, T. Shomosegawa, T. Chiba, W. Strober. 2014. *Mucosal Immunology* 7: 1312-1325.
4. Strober, W. 2013. Use of muramyl dipeptide (MDP) for treating inflammation. Patente de EE.UU. 8.603.978 B2.
5. Parant, M. A., F. M. Audibert, L. A. Chedid, M. R. Level, P. L. Lefrancier, J. P. Choay, E. Lederer. 1980. *Infection and Immunity* 27: 826-831.
6. Matsumoto, K., T. Otani, T. Une, Y. Osada, H. Ogawa, I. Azuma. 1983. Stimulation of nonspecific resistance to infection induced by muramyl dipeptide analogs substituted in the γ -carboxyl group and evaluation of N^6 -muramyl dipeptide- N^6 -stearyllysine. *Infection and Immunity* 39: 1029-1040.
7. Fogler, W. E., R. Wade, D. E. Brudnish, I. J. Fidler. 1985. Distribution and fate of free and liposome-encapsulated [3H]nor-muramyl dipeptide and [3H]muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in mice. *Journal of Immunology* 135: 1372-1377.
8. Fidler, I. J., W. E. Fogler, A. F. Brownbill, G. Schumann. 1987. Systemic activation of tumoricidal properties in mouse macrophages and inhibition of melanoma metastases by then oral administration of MTP-PE, a lipophilic muramyl dipeptide. *Journal of Immunology* 138: 4509-4514.
9. Irby, D., C. Du, F. Li. 2017. Lipid-drug conjugate for enhancing drug delivery. *Molecular Pharmaceutics* 14: 1325-1338.
10. Gobec, M., I. Mlinarič-Raščan, M. Sollner Dolenc, Ž. Jakopin. 2016. Structural requirements of acylated Gly-L-Ala-D-Glu analogs for activation of the innate immune receptor NOD2. *European Journal of Medicinal Chemistry* 116: 1-12.
11. Penney, C., Z. Boulos. 1999. Novel lipophilic oligopeptides with immunomodulating activity. Patente europea EP 0 635 026 B1.
12. Nalle, H. D., B. Kaltenboeck. 2017. Methods to promote growth and improve feed conversion in animals. Solicitud de Patente PCT/US2017/038790.
13. Sidwell, R. W., D. F. Smee, J. H. Huffman, K. W. Bailey, R. P. Warren, R. A. Burger, C. L. Penney. 1995. Antiviral activity of an immunomodulatory lipophilic desmuramyl dipeptide analog. *Antiviral Research* 26: 145-159.
14. Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, X. Fan, M. Cayabyab, M. Hiraoka, D. Liu, X. Han, J. Pesavento, C.-Z. Dong, Y. Wang, J. An, H. Kaji, J. G. Sodroski, Z. Huang. 2002. Exploring the stereochemistry of CXCR4-peptide recognition and inhibiting HIV-1 entry with D-peptides derived from chemokines. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 17476-17485.
15. Jeanloz, R. W., A. Veyrieres. 1970. Amino sugars. LV. Absolute configuration of the carboxyethyl (lactyl) side chain of muramic acid[2-amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose]. *Biochemistry* 9: 4153-4159.
16. van Meer, G., D. R. Voelker, G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 112-124.
17. Spector, A.A., M. A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research* 26: 1015-1035.
18. Hatfield, J. M., R. A. Umans, J. L. Hyatt, C. E. Edwards, M. Wierdl, L. Tsurkan, M. R. Taylor, P. M. Potter. 2016. Carboxylesterases: general detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions* 259: 327-331.

REIVINDICACIONES

1. Un oligopéptido de la siguiente fórmula:



5

o un ácido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

R¹ es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido;

10 R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido; y

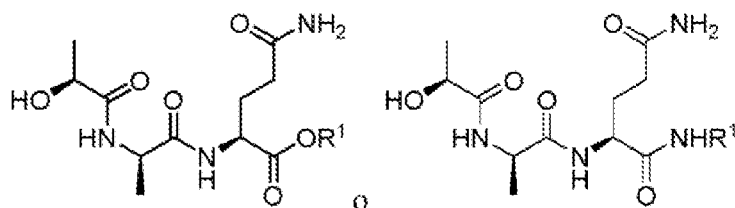
X es O o NR⁶, donde R⁶ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido.

2. El oligopéptido de la reivindicación 1, donde X es O.

15

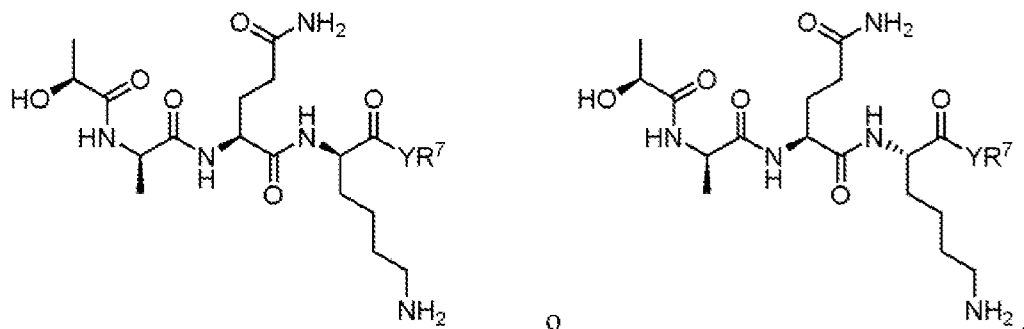
3. El oligopéptido de la reivindicación 1 o 2, donde R¹ es alquilo C₁-C₁₈ lineal o un aminoácido.

4. El oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el oligopéptido tiene la siguiente estructura:



20

5. El oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el oligopéptido tiene la siguiente estructura:



25

donde

R⁷ es alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido; y

Y es O o NR⁸, donde R⁸ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido.

30

6. El oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el oligopéptido es éster de L-lactato-D-alanina-L-glutamina-hexadecilo.

7. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6

35

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición que comprende al menos un oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y pienso para animales.
9. La composición de la reivindicación 8, donde el al menos un oligopéptido está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg/kg a 5 mg/kg.
10. La composición de la reivindicación 8 o 9, donde la composición comprende además un aditivo usado en la dieta de un animal.
- 10 11. La composición de la reivindicación 10, donde el aditivo comprende una enzima, un probiótico, un prebiótico, un antioxidante, un antibiótico promotor del crecimiento, un agente colorante o una combinación de los mismos.
12. Una composición farmacéutica para su uso en la reducción de la inflamación intestinal en un ser humano, comprendiendo la composición farmacéutica al menos un oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un
- 15 vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 12, donde una enfermedad o afección asociada a inflamación intestinal comprende enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o una infección bacteriana.
- 20 14. Un oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso para promover el crecimiento en un animal o para mejorar la conversión alimenticia en un animal.
15. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-11 para su uso para promover el crecimiento en un animal
- 25 o para mejorar la conversión alimenticia en un animal.

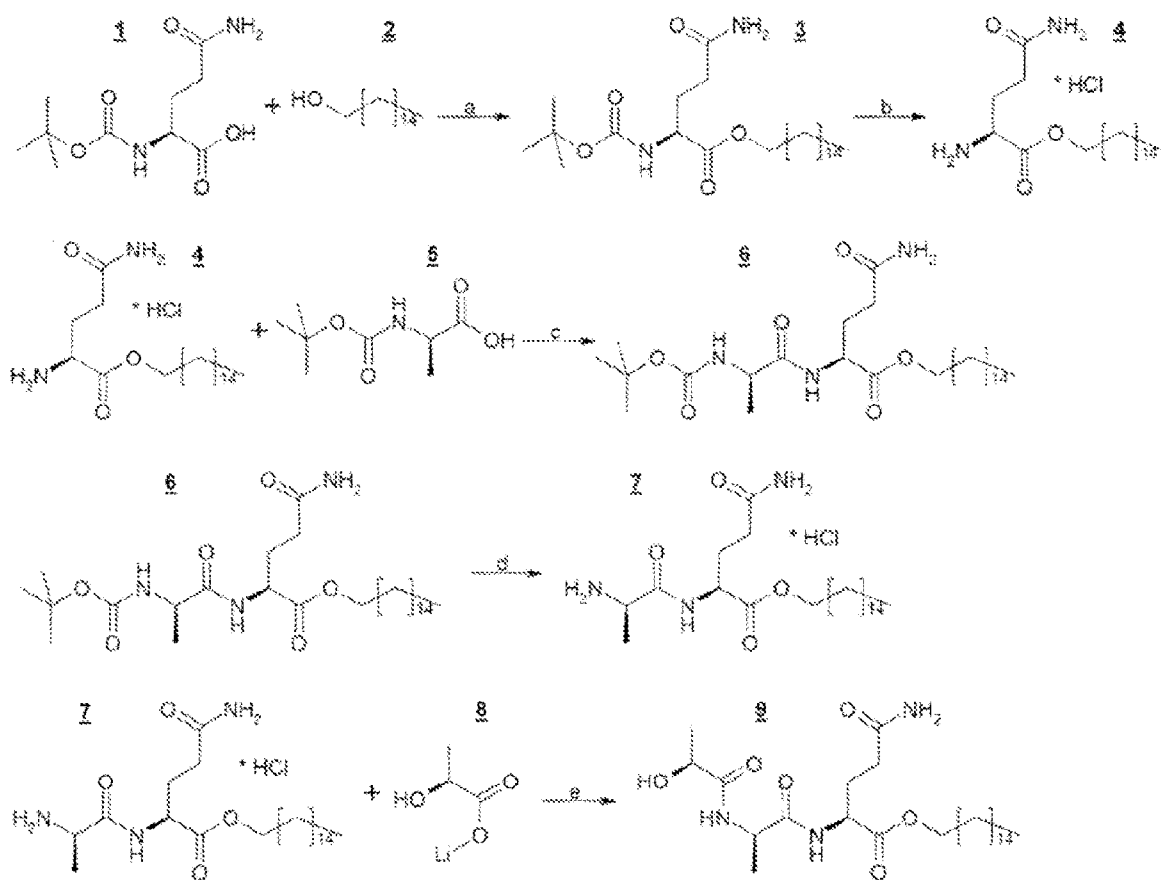


FIGURA 1

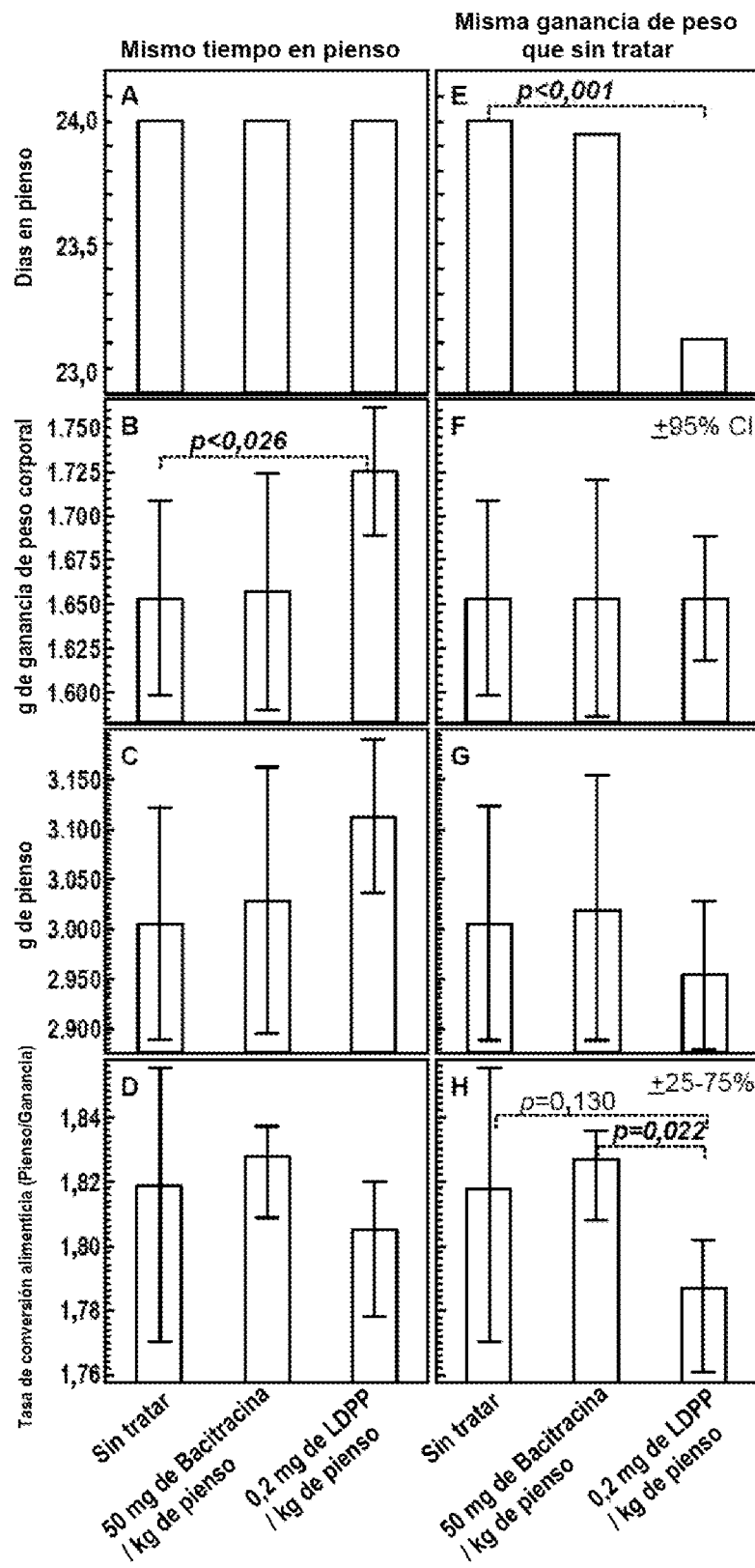


FIGURA 2

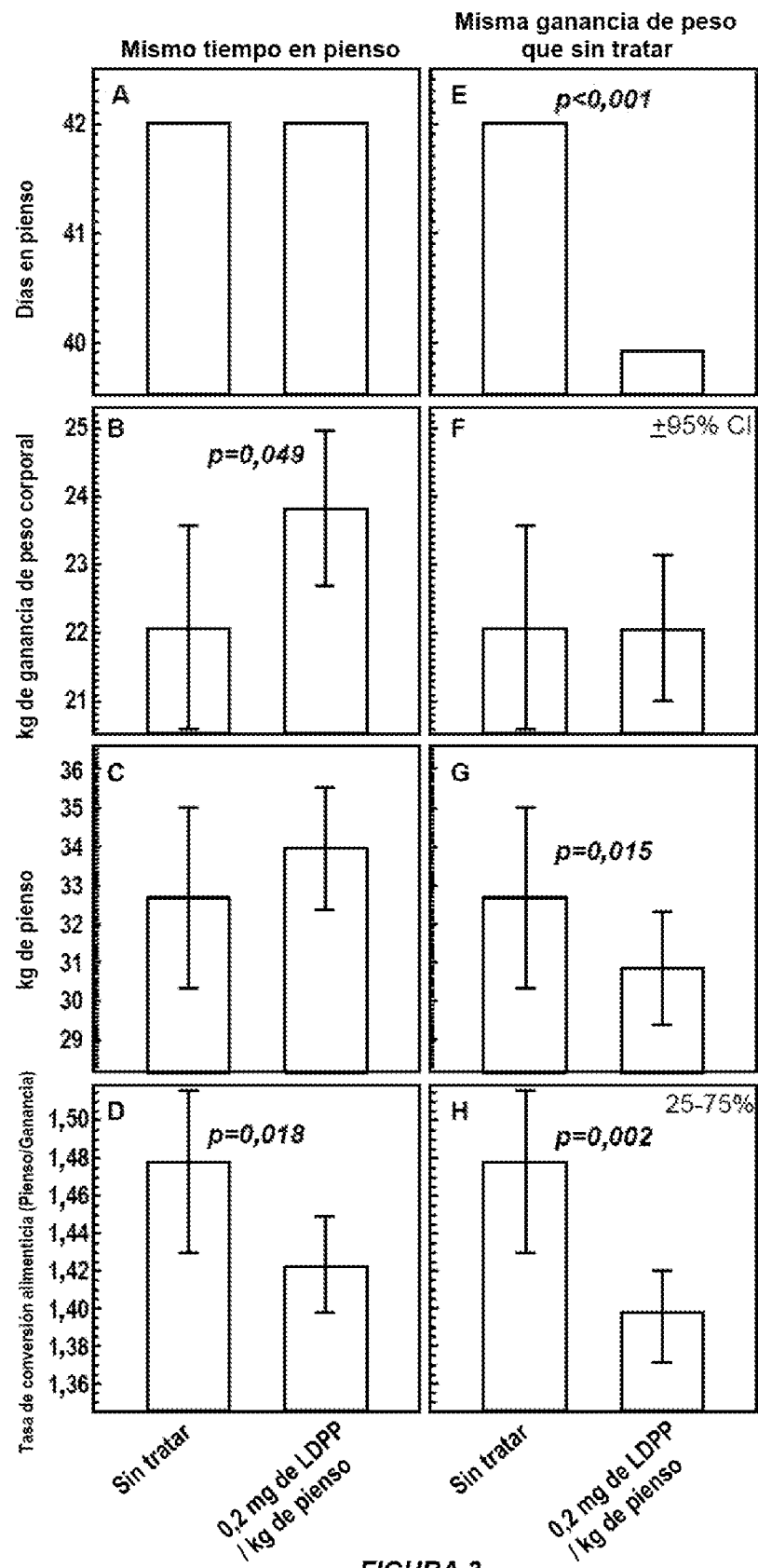


FIGURA 3