

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 106**

51 Int. Cl.:

C07C 231/02 (2006.01)

C07C 233/51 (2006.01)

C07C 235/34 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 8/44 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61Q 90/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09772647 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2303830**

54 Título: **Procedimiento microbiológico de síntesis de derivados de cinamoil-amidas de aminoácidos**

30 Prioridad:

09.06.2008 FR 0803188

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

11.06.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (100.0%)**

**Le Sextant, 44 bd de Dunkerque, CS 90009
13572 Marseille Cedex 02, FR**

72 Inventor/es:

LORQUIN, JEAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 467 106 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

Procedimiento microbiológico de síntesis de derivados de cinamoil-amidas de aminoácidos

- 5 La invención tiene por objeto un procedimiento de producción microbiológico de derivados de cinamoil-amidas de aminoácidos, determinados productos que resultan y su uso, en particular como antioxidantes.

Se han aislado moléculas de esta familia esencialmente del reino vegetal, principalmente de los órganos reproductores de plantas, mientras que parecen estar ausentes de las partes verdes de estas (Martin-Tanguy y col., 10 *Phytochemistry*, 17: 1927-1928, 1978; *FEBS Lett.*, 108: 176-178, 1979). En 2003, Alemanno y col. (*Annals of Botany*, 92: 613-623) identificaron la N-cafeoil-tirosina y la N-cafeoil-DOPA en células de embriogénesis somática de *Theobroma cacao*. Más tarde, se pusieron de manifiesto en los granos de café verde (robusta) la *p*-cumaroil-N-tirosina, feruloil-N-tirosina, feruloil-N-triptófano y cafeoil-N-fenilalanina (Clifford and Knight, *Food chemistry*, 87: 457-453, 2003), si bien previamente se había constatado ya su poder antioxidante (Sanbongi y col., *J. Agric. Food Chem.* 15 46: 454-457, 1998). Además, Stark et Hoffman (*J. Agric. Food Chem.*, 53: 5419-5428, 2005) y además Stark y col. (*J. Agric. Food Chem.*, 54: 2859-2867, 2006) después identificaron y completaron la lista mediante otros análogos presentes en las mismas fuentes vegetales.

Las amidas de ácidos cinámico e hidroxycinámico se han identificado y evaluado sobre todo por sus actividades 20 antioxidantes importantes (Spasova y col., *J. Peptide Sci.*, 12: 369-375, 2006), propiedad que parece inherente a todas las estructuras de este tipo.

Se han citado otras moléculas como la amida 4-hidroxycinamoil-(éster de metilo de L-fenilalanina) o también la amida 3,4-dihidroxycinamoil-(éster de dibencilo del ácido L-aspartico), por su actividad antioxidante contra la 25 oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) por el cobre, y estas moléculas inhiben al mismo tiempo la actividad de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa humana (Lee y col., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 14: 4677-4681, 2004); por lo tanto están implicadas en la hipercolesterolemia. Las N-cinamoil-amidas también se han descrito como que son agentes de antiagregación de plaquetas (Hung y col., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13: 1791-1797, 2005). Las clovamidas (N-cinamoil-tirosina) que son fitoalexinas se acumulan en las plantas después del ataque de 30 patógenos (Yamamoto y col., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40: 465-469, 1991) también forman parte, y como tales son conocidas por ser potentes antimicrobianos.

Por último, también se han descrito recientemente actividades vasorrelajantes de derivados de ácidos N-cafeoilamino-R (R = GABA o ácido hexanoico) (Iizuka y col., *Yakugaku Zasshi*, 123: 963-971, 2003).

35 Los derivados de cinamoilamida de aminoácidos constituyen, por lo tanto, una familia de moléculas con un potencial importante tanto en el campo terapéutico como en el cosmético, o también como agente conservante. Sin embargo, su aislamiento a partir de plantas es difícil, los rendimientos y las cantidades son pequeñas y las estructuras poco diversificadas.

40 Se han descrito procedimientos para la síntesis de algunas de estas moléculas por vía química; pero requieren varias etapas, usan compuestos tóxicos y por consiguiente son difíciles de industrializar:

En la síntesis descrita por Iizuka y col. (*Yakugaku Zasshi*, 123: 963-971, 2003), son necesarias 4 etapas: (1) 45 protección de los grupos funcionales hidroxilo del ciclo mediante cloroacetato de etilo en medio básico, (2) después acoplamiento mediante la dicitlohexilcarbodiimida (DCCDI); (3) después el aminoácido se acopla en presencia de trietilamina, y finalmente (4) una hidrólisis libera los grupos funcionales hidroxilo del núcleo aromático (desprotección). Por este procedimiento se han sintetizado la N-cafeoilglicina, N-cinamoilglicina, N-cafeoil- β -alanina, N-cinamoil- β -alanina.

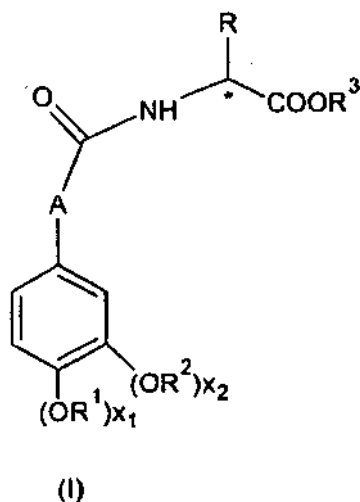
50 Otra síntesis más rápida se basa en la fijación del aminoácido (ácido L-aspartico o L-triptófano en este caso) en el cloruro de acilo correspondiente después de la protección previa de los grupos hidroxilo del ciclo aromático por la dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción de amidación se lleva a cabo por reflujo en presencia de tetrahidrofurano (THF), seguido finalmente de una desprotección para liberar los hidroxilos (Stark et Hofmann, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5419-5428, 2005; Stark y col., *J. Agric. Food Chem.*, 54: 2859-2867, 2006).

Se citan también los trabajos de Tada y col. (*J. Oleo Sci.*, 51: 19-27, 2002) que describen la síntesis de diferentes derivados, de los cuales el éster metílico de la N-cafeoil-O-acetilserina tiene una fuerte actividad antioxidante e inhibidora de la tirosinasa. Por otra parte, Lee y col. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 4677-4681, 2004) han llevado a

cabo la síntesis de ésteres de p-cumaroilamida del ácido aspártico (éster metílico) y de la fenilalanina (éster dibencílico) respectivamente, por un procedimiento equivalente al de Iizuka y col. (*Yakugaku Zasshi*, 123: 963-971, 2003) (ver más arriba).

5 También se ha descrito una síntesis que usa una arilasa de *Streptomyces mobaraensis* en la solicitud JP 2006-067870 A.

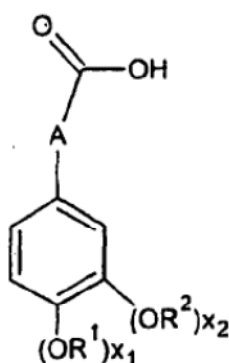
Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento sencillo, fácil de aplicar, industrializable, y que permita la preparación de derivados de cinamoil-amida de aminoácidos. La invención tiene como primer objeto un
10 procedimiento de preparación de moléculas que responden a la siguiente fórmula (I):



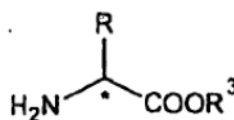
en la que:

- 15 A representa un grupo seleccionado de -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,
 x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, alquilo C_1-C_6 , fenilo, bencilo, grupos
 20 -CO- R^4 , R^4 representa un grupo seleccionado de: alquilo C_1-C_6 , fenilo, bencilo,
 R^3 representa un grupo seleccionado de: H, alquilo C_1-C_6 , fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que
 comprende de 1 a 30 aminoácidos,
 * representa la configuración óptica L o D del aminoácido -NH-CHR-COO-, * puede representar una u otra de las
 configuraciones según la elección de R,
 25 R representa una cadena lateral de aminoácido seleccionada de: -H (glicina), -CH₃ (L-alanina, D-alanina), -CH₂OH
 (L-serina), -CHOH-CH₃ (L-treonina), -CH₂OR⁵ (L-serina con su grupo funcional hidroxilo protegido), -CHOR⁵-CH₃ (L-
 treonina con su grupo funcional hidroxilo protegido), R^5 representa un grupo seleccionado de: H, alquilo C_1-C_6 ,
 fenilo, bencilo, grupos -CO- R^6 , R^6 representa un grupo seleccionado de: alquilo C_1-C_6 , fenilo, bencilo.
 30 Por alquilo C_1-C_6 se entiende un grupo alquilo, lineal, ramificado o cíclico, que comprende de 1 a 6 átomos de
 carbono, como por ejemplo un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, n-pentilo, n-hexilo.

De acuerdo con la invención, las moléculas de fórmula (I) se preparan por un procedimiento que consta de al menos
 una etapa de cultivo de al menos una bacteria seleccionada de las Bacillaceae, en presencia de al menos dos
 35 sustratos seleccionados de los de las siguientes fórmulas (II) y (III):



(II)



(III)

en las que A, x_1 , x_2 , R^3 , * y R tienen la misma definición que en la fórmula (I).

R^1 , R^2 , independientemente entre sí representan un grupo seleccionado de: alquilos C_1 - C_6 , fenilo, bencilo, grupos
5 $-CO-R^4$, R^4 representa un grupo seleccionado de: alquilos C_1 - C_6 , fenilo, bencilo.

Por alquilo C_1 - C_6 se entiende un grupo alquilo, lineal, ramificado o cíclico, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, como por ejemplo un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, n-pentilo, n-hexilo.

10 Preferiblemente, el procedimiento de la invención consta de una etapa de cultivo de al menos una bacteria seleccionada de las que pertenecen al género *Bacillus*, todavía más preferiblemente una bacteria seleccionada de: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus* (o *Geobacillus*) *stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*.

15 Y preferiblemente la bacteria se selecciona de:

- *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*: DSM 15029 (temperatura de crecimiento = 30°C)
- *Bacillus licheniformis*: DSM 13, ATCC 14580, NCIB - 9375 (temperatura de crecimiento = 30°C)
- *Bacillus thermoamylovorans* (cepa aislada por el laboratorio IRD-Marseille): DSM 13307 (temperatura de
20 crecimiento = 50°C)
- *Bacillus* (o *Geobacillus*) *stearothermophilus*: DSM 22, ATCC 12980, NCIB 8923 (temperatura de crecimiento = 55°C)
- *Bacillus caldotenax*: DSM 406 (temperatura de crecimiento = 70°C)

25 De forma sorprendente, el autor de la invención ha constatado que el cultivo de una bacteria descrita antes en presencia de al menos uno de cada uno de los sustratos (II) y (III) daba lugar a la formación de un enlace amida entre el grupo funcional ácido del sustrato (II) y el grupo funcional amina del sustrato (III) para proporcionar el producto de fórmula (I) correspondiente. El procedimiento de la invención permite así acceder a una familia de
30 productos variados pero que, no obstante, presentan características estructurales muy específicas ligadas a la especificidad de la bacteria para los sustratos (II) y (III).

Preferiblemente, en la fórmula (I), se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

A representa un grupo $-CH=CH-$,

35 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, CH_3 ,

R^3 representa H,

R representa una cadena lateral de aminoácido seleccionada de: -H (glicina), $-CH_3$ (L-alanina, D-alanina), $-CH_2OH$ (L-serina), $-CHOH-CH_3$ (L-treonina).

40 En función de la forma en la que posteriormente se va a usar el compuesto (I), se seleccionan los precursores (II) y (III) adecuados:

Si el compuesto de fórmula (I) se tiene que someter a etapas de síntesis posteriores, puede ser conveniente prepararlo en forma protegida, seleccionando los grupos protectores R^1 , R^2 , R^3 y opcionalmente R^5 adecuados.

En particular, cuando $x_1 = 1$ o $x_2 = 1$, entonces para llevar a cabo la etapa de cultivo, se selecciona $R^1 \neq H$, respectivamente $R^2 \neq H$. En efecto, la transformación en el producto (I) es más eficaz cuando el ciclo aromático del derivado de cinamoilo (II) no lleva sustituyentes o estos están protegidos. Después, se pueden liberar los grupos
 5 funcionales hidroxilo presentes en el ciclo de cinamoilo por un tratamiento enzimático con peroxidasa (Paice y col., *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59:260-265).

Un compuesto de fórmula (I) que lleva una cadena peptídica R^3 se puede obtener directamente seleccionando un sustrato (III) correspondiente en el que ya esté presente la cadena peptídica R^3 , o a partir de un compuesto de
 10 fórmula (I) con $R^3 = H$ mediante una etapa posterior de injerto en una cadena peptídica, o de forma secuencial por alargamiento de la cadena de aminoácidos (Bodansky, *Synthesis*, 453-463, 1972).

Los compuestos de fórmula (I) con $A = -CH_2-CH_2-$ se pueden obtener directamente a partir del precursor (II) correspondiente o a partir de un precursor (II) en el que A representa $-CH=CH-$ y trabajando con medios bien
 15 conocidos para el experto en la materia, por una reducción química o microbiológica del doble enlace (J March, *Advanced Organic Chemistry*, 1985, Wiley and sons, 691-700).

Cuando se desea obtener un solo compuesto de fórmula (I), se prepara a partir de los dos precursores (II) y (III) correspondientes. Se puede preparar una mezcla de moléculas de fórmula (I) por cultivo de una bacteria descrita
 20 antes en presencia de una mezcla de sustratos (II) y/o una mezcla de sustratos (III).

El cultivo de la bacteria se hace en un medio que, además de los compuestos (II) y (III), consta preferiblemente de sales minerales y un extracto de levadura. Preferiblemente, consta de las siguientes sales minerales: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, NH_4Cl . Preferiblemente, el medio de cultivo no consta de otros aminoácidos más que los de fórmula
 25 (III), lo que reduce las etapas de purificación al final del procedimiento.

De acuerdo con otra variante preferida de la invención, el medio de cultivo consta también, además del o de los aminoácidos de fórmula (III), de al menos otro aminoácido seleccionado de: lisina, prolina, cisteína. Preferiblemente, estos aminoácidos están en forma (L). Como han constatado los autores de la invención, estos aminoácidos no son
 30 usados por la bacteria para participar directamente en la formación de un producto de fórmula (I), sino que contribuyen a mejorar el rendimiento de la síntesis de los compuestos de fórmula (I) a partir de los aminoácidos de fórmula (III) como se ha definido antes, presentes en el medio. Preferiblemente, la concentración de uno o más de estos aminoácidos en el medio de cultivo está comprendida entre 1 y 4 mM.

35 De acuerdo con el procedimiento de la invención, la concentración del compuesto de fórmula (II) en el medio de cultivo preferiblemente está comprendida entre 0,5 y 10 mM, y preferiblemente entre 1 y 5 mM.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la concentración del compuesto de fórmula (III) en el medio de cultivo preferiblemente está comprendida entre 0,5 y 20 mM, y preferiblemente entre 2 y 8 mM.
 40

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la proporción de los compuestos de fórmula (II) y (III) en moles es $0,30 < (II)/(III) < 0,9$, preferiblemente $0,40 < (II)/(III) < 0,8$, y preferiblemente $0,50 < (II)/(III) < 0,65$.

De acuerdo con una variante del procedimiento de la invención, el precursor (II) se puede introducir en el medio de cultivo en forma de un extracto vegetal. En efecto, el ácido cinámico es un constituyente de determinados residuos agronómicos y de productos derivados de la industria de la madera. Puesto que (II) es al ácido cinámico o un derivado del ácido cinámico, en el procedimiento de la invención se puede introducir directamente en el medio de cultivo en forma de una composición de residuos agronómicos o de efluentes de la industria de la madera. Dichos productos normalmente se deben reciclar, y gracias al procedimiento de la invención, de esta forma son valorados.
 50

Preferiblemente, el medio de cultivo es un medio pobre en metales. En particular, el medio de cultivo no consta de hierro (en particular Fe^{2+} , en general proporcionado por $FeSO_4$ o $FeCl_2$). En efecto, se ha constatado que la presencia de hierro inhibía totalmente la reacción de formación del producto (I).

55 Al finalizar la formación del compuesto de fórmula (I) cuya presencia es controlada por HPLC y LC-MS, el producto se aísla del medio de cultivo por un procedimiento que consta preferiblemente de las siguiente etapas:

- centrifugación,
- recuperación del líquido sobrenadante,

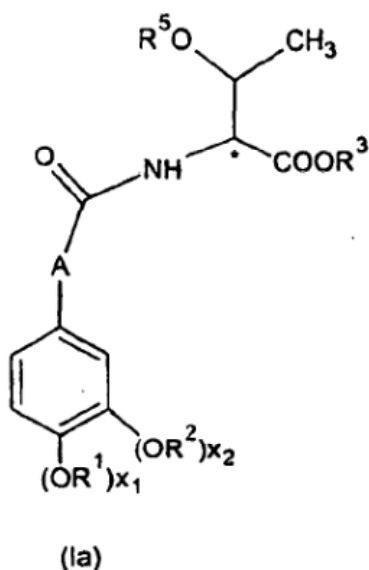
- purificación del producto (I).

La purificación se puede hacer por cualquier medio usado habitualmente por el experto en la materia, tales como: extracción líquido-líquido con disolvente, cromatografía, precipitación, cristalización. Estos medios se ilustran de forma más específica en la parte experimental. El procedimiento de la invención ha permitido sintetizar en particular las siguientes moléculas:

- N-cinamoil-glicina,
- N-cinamoil-L-alanina,
- 10 - N-cinamoil-D-alanina,
- N-cinamoil-L-serina,
- N-cinamoil-L-treonina,
- N-(4-metoxicinamoil)-glicina,
- N-(4-metoxicinamoil)-L-alanina,
- 15 - N-(4-metoxicinamoil)-D-alanina,
- N-(4-metoxicinamoil)-L-serina,
- N-(4-metoxicinamoil)-L-treonina
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-glicina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-alanina,
- 20 - N-(3,4-dimetoxicinamoil)-D-alanina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-serina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-treonina,
- N-cumaroil-L-treonina,
- N-cafeoil-L-treonina,
- 25 - N-cumaroil-L-serina
- N-cafeoil-L-serina
- N-cumaroil-L-alanina,
- N-cafeoil-L-alanina,
- N-cumaroil-D-alanina,
- 30 - N-cafeoil-D-alanina,
- N-cumaroil-glicina,
- N-cafeoil-glicina.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fabricación de un medicamento que consta de al menos una etapa de cultivo tal como la descrita antes, para formar el compuesto de fórmula (I).

La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de compuestos que responden a la siguiente fórmula (Ia):



en la que:

- 5 A representa un grupo seleccionado de -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,
 x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos
 -CO-R⁴ y R⁴ representa un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,
 10 R³ representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que
 comprende de 1 a 30 aminoácidos,
 * representa la configuración óptica L,
 R⁵ representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-R⁶ y R⁶ representa un grupo
 seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo.

- 15 De forma ventajosa, en la fórmula (Ia), se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

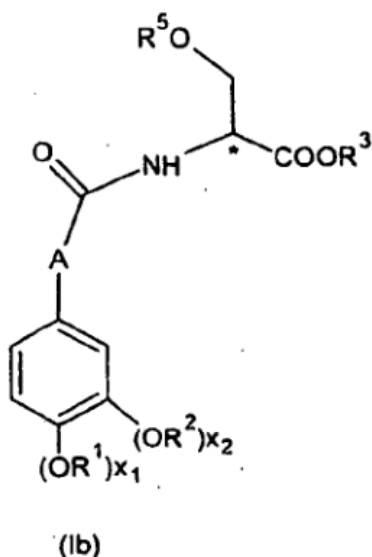
- A representa -CH=CH-,
 x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 20 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, CH₃,
 R³ representa H,
 * representa la configuración óptica L,
 R⁵ representa H.

- 25 De forma preferida, el compuesto de fórmula (Ia) se selecciona de la siguiente lista:

- N-cinamoil-L-treonina,
 - N-(4-metoxicinamoil)-L-treonina,
 30 - N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-treonina,
 - N-cafeoil-L-treonina.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de compuestos que responden a la siguiente
 fórmula (Ib):

35



en la que:

- 5 A representa un grupo seleccionado de -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,
 x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-R⁴ y R^4 representa un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,
- 10 R^3 representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,
 * representa la configuración óptica L,
 R^5 representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-R⁶ y R^6 representa un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,
- 15 excluyendo los siguientes compuestos:
- A representa CH=CH-, $x_1 = 1$, $x_2 = 1$, y
- 20 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{CH}_3\text{CO-}$, o
 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{H}$, $R^5 = \text{H}$, o
 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{tBu}$, $R^5 = \text{tBu}$.

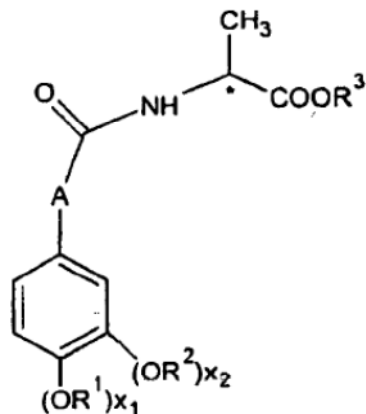
De forma ventajosa, en la fórmula (Ib), se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- 25 A representa -CH=CH-,
 x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, CH₃,
- 30 R^3 representa H,
 * representa la configuración óptica L,
 R^5 representa H.

De forma preferida, el compuesto de fórmula (Ib) se selecciona de la siguiente lista:

- 35 - N-cinamoil-L-serina,
 - N-(4-metoxicinamoil)-L-serina,
 - N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-serina.
- 40 La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de compuestos que responden a la siguiente

fórmula (Ic):



(Ic)

5 en la que:

A representa un grupo seleccionado de -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,

x₁ es un número entero seleccionado de 0 y 1,

x₂ es un número entero seleccionado de 0 y 1,

10 R¹, R², independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-R⁴, y R⁴ representa un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,

R³ representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,

* representa la configuración óptica L o D,

15

excluyendo los casos donde:

*representa la configuración óptica L y

A representa -CH=CH-, y

20 - x₁ = x₂ = 0, R³ = tBu,

De forma ventajosa, en la fórmula (Ic), se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

A representa -CH=CH-,

25

- x₁ es un número entero seleccionado de 0 y 1,

- x₂ es un número entero seleccionado de 0 y 1,

R¹, R², independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, CH₃,

30 R³ representa H,

De forma preferida, el compuesto de fórmula (Ic) se selecciona de la siguiente lista:

- N-cinamoil-L-alanina,

35 - N-(4-metoxicinamoil)-L-alanina,

- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-alanina,

- N-cafeoil-L-alanina,

- N-cinamoil-D-alanina,

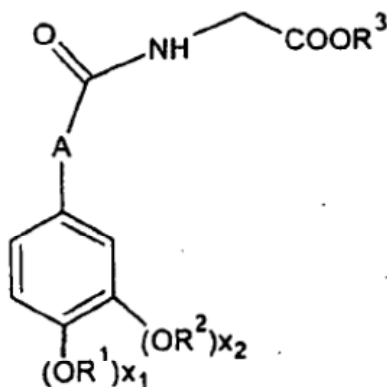
- N-(4-metoxicinamoil)-D-alanina,

40 - N-(3,4-dimetoxicinamoil)-D-alanina,

- N-cumaroil-D-alanina,

- N-cafeoil-D-alanina.

Finalmente, la invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de compuestos que responden a la siguiente fórmula (Id):



(Id)

5

en la que:

A representa un grupo seleccionado de $-\text{CH}=\text{CH}-$ y $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

10 x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, grupos $-\text{CO}-\text{R}^4$, R^4 representa un grupo seleccionado de: alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo,

R^3 representa un grupo seleccionado de: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,

15

excluyendo los casos donde:

A representa $-\text{CH}=\text{CH}-$ y:

20 - $x_1 = x_2 = 0$, $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$, o

- $x_1 = 1$, $x_2 = 0$, $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, o

- $x_1 = x_2 = 0$, $\text{R}^3 = \text{H}$.

De forma ventajosa, en la fórmula (Id), se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

25

A representa $-\text{CH}=\text{CH}-$,

x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

R^1 , R^2 , independientemente entre sí, representan un grupo seleccionado de: H, CH_3 ,

30

R^3 representa H.

De forma preferida, el compuesto de fórmula (Id) es la N-(3,4-dimetoxicinamoil)glicina.

Los compuestos obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la invención tienen una actividad antioxidante y antimicrobiana. Son capaces de actuar sobre la interacción de plaquetas-leucocitos y como antiinflamatorios. Se pueden usar en numerosas aplicaciones:

- En farmacia, asociados con un vehículo farmacéutico, para preparar composiciones terapéuticas destinadas a prevenir o tratar las siguientes patologías: cáncer; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, hipercolesterolemia; enfermedades infecciosas tales como por ejemplo las infecciones debidas a virus.

40

- En cosmética, asociados con un vehículo cosmético, como conservante, como agente activo antiedad, como agente de despigmentación para la piel y anejos cutáneos.

- En alimentación también se pueden usar los compuestos de la invención como conservantes en numerosas aplicaciones.

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. Condiciones de cultivo de la bacteria

1.1.1. Cepa bacteriana

- Cepa bacteriana usada: *Bacillus subtilis subsp. subtilis*.

- Morfología y fisiología de la bacteria: Bastones rectos (0,5-2,5 x 1,2-10 micrómetros) aislados o en cadenas más o menos largas, de espora única muy resistente. La coloración de Gram es positiva, sobre todo al principio del crecimiento; también puede ser negativa. Móviles por flagelos peritricos. Aerobio o anaerobios facultativos. Catalasa presente. Oxidasa positiva o negativa. Quimioorganotrofos, de protótrofos a auxótrofos que exigen varios factores de crecimiento. El peptidoglicano de la pared es de tipo ácido meso-diamino-pimérico. Los fosfolípidos dominantes son la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilglicerol. La formación de la espora es un proceso multifásico que comprende 7 etapas sucesivas. La salida de la latencia implica tres procesos secuenciales: activación, germinación y crecimiento. Se han realizado numerosos estudios genéticos de *B. subtilis* que es la especie tipo del género; se han localizado más de 355 genes en el mapa cromosómico. Gracias a la extrema resistencia de su espora, los *Bacillus* son ubicuos. Su hábitat principal es el suelo donde tienen una función importante en los ciclos del carbono y el nitrógeno. También pueden contaminar los alimentos.

- Números en colección: DSM N° 10, NCIB 3610, ATCC 6051 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Brunswick, Alemania; NCIB, National Center for Biotechnology Information. ATCC, The Global Bioresource center).

- Referencia bibliográfica: Nakamura y col., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49:1211-1215, 1999.

1.1.2. Medio de cultivo

La síntesis de las moléculas se realiza por cultivo de la bacteria. Se han hecho ensayos con un medio de cultivo desprovisto de hierro, por comparación con un cultivo realizado en las mismas condiciones pero en presencia de hierro. Los medios de cultivo usados son los siguientes:

Medio 1. Contiene por litro: KH_2PO_4 0,5 g, K_2HPO_4 0,5 g, NaCl 0,4 g, NH_4Cl 0,4 g, extracto de levadura (YE, de PANREAC (Francia), referencia 403687.1210) 2 g. El pH se ajusta a 7,0 con una disolución de KOH 10 M. Después el medio se trata en autoclave a 120°C durante 20 min. De forma rutinaria, se realizan cultivos de 25 ml en erlenmeyers de 50 ml.

Medio 2. Este es idéntico al medio 1 excepto el extracto de levadura que se sustituye por base nitrogenada de levadura (*Yeast Nitrogen Basal* YNB, de DIFCO (Francia), referencia 233520) que no contiene ni aminoácidos ni sulfato amónico.

1.1.3. Preparación de los precursores (II) y (III) y del extracto de levadura

Los compuestos (II) se prepararon en condiciones de anaerobiosis (Hungate, 1969. En *Methods in Microbiology*, pp. 117-132. Edited by Norris, J. R. & Ribbons, D. W. London: Academic Press), se esterilizaron por filtración (filtro Millipore, porosidad 0,22 μm), y se conservaron en frascos de penicilina bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente y protegidos de la luz (frascos cubiertos con papel de aluminio).

Las disoluciones madre de los compuestos (II) ácidos se prepararon en una concentración 250 mM, y se neutralizaron a pH 7 con sosa (0,4 g de pastillas por 25 ml de disolución madre). Se ensayaron los siguientes compuestos (II): ácido cinámico, ácido 4-metoxicinámico, ácido 3,4-dimetoxicinámico.

Las disoluciones madre de los compuestos (III) se prepararon en las mismas condiciones que los compuestos (II) pero con una concentración 50 mM. Se ensayaron los siguientes compuestos (III): glicina, L-alanina, D-alanina, L-

serina, D-serina, L-treonina, D-treonina, L-valina, D-valina, L-leucina, D-leucina, L-isoleucina, D-isoleucina, L-fenilalanina, D-fenilalanina, L-tirosina, D-tirosina, ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, L-asparagina, D-asparagina, L-glutamina, D-glutamina, L-cisteína, D-cisteína, L-histidina, D-histidina, L-lisina, D-lisina, L-metionina, D-metionina, L-prolina, D-prolina, L-triptófano, D-triptófano. Los compuestos de fórmula 5 (III) se ensayaron de forma aislada usando un medio de cultivo desprovisto de aminoácidos (es decir con YNB como extracto de levadura), o en mezcla.

Las disoluciones madre de extractos de levadura YE [25 % (p/v)] (extracto de levadura de FLUTA, Referencia 70161) y YNB (base nitrogenada de levadura (YNB) de DIFCO también, Referencia 233520) se preparan y se 10 esterilizan en autoclave durante 20 min a 121°C.

1.1.4. Condiciones de cultivo para la producción habitual de un solo metabolito

La cepa se descongela previamente, y después se siembra en el medio 2 que contiene sustrato (II) 1 mM 15 (precultivo). Después de 24 h a 30°C en incubadores INFORS, con una agitación de 150 rpm, los cultivos se inoculan con 10 % (v/v) del precultivo en el medio 2 que contiene sustrato aromático (II) 1 mM y aminoácido (III) 2 mM. Los cultivos finalmente se ponen con agitación en las mismas condiciones durante 48 h.

Volumen(volumenes) de cultivo: los experimentos se realizaron a partir de cultivos de 25 ml o de 1 litro, en 20 erlenmeyers de 50 ml o botellas de 2 litros con tapones de algodón, respectivamente.

1.2. Extracción, purificación e identificación de los compuestos

1.2.1. Extracción, purificación

25 Después de centrifugación del cultivo de 25 ml, el líquido sobrenadante se acidifica mediante unas gotas de ácido acético glacial o fórmico hasta un pH final de 2, después se extraen 3 veces con acetato de etilo en un embudo de decantación. Después de evaporación hasta sequedad de la fase orgánica, son posibles dos orientaciones:

30 - Primero, se puede guardar esta fracción seca que contiene aproximadamente 90-95% del compuesto deseado. En este caso, se lleva a cabo un control por HPLC recogiendo el extracto seco en metanol e inyectando 10 µl en un sistema de HPLC de fase inversa.

- Segundo, el extracto seco se recupera con agua acidificada (HCOOH al 1 %), y se deposita sobre un cartucho 35 SePack C18 (WATERS, Francia) que se lava mediante 10-15 ml de agua acidificada (HCOOH al 1 %). Después la molécula eluye con metanol puro, se evapora el eluyente con ayuda de un rotavapor con vacío BUCHI y el sólido obtenido se pone en un envase de comprimidos. Los compuestos se pueden conservar fácilmente a temperatura ambiente o a 4°C en forma de sólido, a -20°C en forma de líquido en metanol.

40 En el caso de los cultivos de 1 litro, el residuo seco obtenido después de la etapa de extracción con acetato de etilo se recoge mediante agua acidificada con ácido fórmico al 1% y después se deposita sobre una columna LICHROPREP RP18 (Merck, Ref. 1.09303.0100, volumen de la fase 7 ml). Después, esta se lava con 3 volúmenes de agua acidificada (HCOOH al 1%), y los componentes finalmente eluyen con metanol puro, después de evaporación, el sólido se recupera en un matraz y se pesa.

45

1.2.2. Control rutinario por HPLC

Después de retirar 1 ml de cultivo bacteriano y después de centrifugación (8000 g, 5 min), se acidifican 400 µl de líquido sobrenadante mediante 20 µl de ácido acético glacial y después se vuelven a centrifugar (precipitación de las 50 proteínas extracelulares). Finalmente, se inyectan de 10 a 20 µl de líquido sobrenadante obtenido en el sistema de HPLC. El análisis y el control se pueden realizar igualmente a partir de la molécula pura obtenida antes.

Los análisis por HPLC se realizan en una cadena WATERS equipada con un desgasificador de membrana, un inyector RHEODYNE 7725i (La Jolla, USA), una bomba binaria 1525, un horno con termostato y un detector de fila 55 de diodos 2996. El aparato es controlado por el programa informático Millennium 32 versión 4.0. La separación se asegura mediante una columna C18 SYMETRY (150 x 4,6 mm, porosidad 5 µm, WATERS). La fase móvil arrastrada con un caudal de 0,8 ml/min está compuesta de dos disolventes: acetonitrilo (A) y agua acidificada con ácido acético al 1 % (B). La duración total de la elución es de 55 min. El gradiente usado consta de 3 etapas:

Etapa 1: de 5 a 20 % de A en B durante 30 min;
 Etapa 2, de 20 a 100 % de A en B durante 20 min;
 Etapa 3, vuelta a 5 % de A en B en 5 min.

- 5 La identificación de los compuestos se realiza, por una parte por la determinación de los tiempos de retención y por otra parte gracias a los espectros de UV/VIS determinados para cada compuesto. Previamente se han preparado moléculas puras y sirven de referencia para el HPLC (tiempo de retención) y para la espectroscopía (UV/VIS, LC-MS, GC-MS).

10 1.2.3. Identificación por LC-MS (acoplamiento HPLC-espectrometría de masas)

El HPLC es un cromatógrafo HP 1100 (AGILENT TECHNOLOGIES, Francia). La separación se proporciona mediante una columna C18 SYMMETRY (Waters, Francia), de dimensiones 4,6 x 250 mm, y de porosidad 5 µm. El sistema está equipado con un inyector automático, un desgasificador de membrana, un horno con un detector de monolongitudes de onda variables. El espectrómetro de masas usado es un aparato de APPLIED BIOSYSTEMS (Francia), modelo SCIEX Api150EX que se usa en el modo de ionización por electropulverización. La elución, la adquisición y tratamiento de datos son proporcionados por los respectivos programas informáticos CHEMSTATION y MASSCHROM versión 1.1.

- 20 Condiciones de funcionamiento: Caudal 0,3 ml/min; temperatura del horno 30 °C; longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) fijada a 278 nm en el caso en el que el compuesto (II) no está ramificado en la posición 3 ó 4 del ciclo ($x_1 = x_2 = 0$); longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) fijada a 310 nm en los otros casos. La fase móvil está formada por un gradiente de dos disolventes: H₂O milli-Q acidificada con ácido fórmico al 1% (disolvente A) y acetonitrilo para (disolvente B). El gradiente usado se lleva a cabo como sigue: etapa 1, de 5 a 30% de B durante 60 min; etapa 2: de 30 a 100% de B durante 30 min (duración total 90 min).

Las condiciones de masa son las siguientes: valores de m/z de 30 a 300 uma (unidad de masa atómica), tiempo de adquisición 15 ms/barrido, voltaje del cono 20 ó 60 V, voltaje del capilar 45500 V, en modo positivo y negativo, presión del nebulizador 45 psi.

30

1.2.4. Identificación por GC-MS (acoplamiento de cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas)

Previamente, para los compuestos purificados sólidos o en extracto seco que contienen una mezcla de compuestos, se procede a una reacción de derivatización con BSTFA+TMCS o de esterificación metílica.

35

Derivatización

Las reacciones tienen lugar en un tubo CHROMACOL de 2 ml sellado con un tapón y un septum herméticos. Se han llevado a cabo dos tipos de derivatizaciones en este trabajo:

40

- Trimetilsililación con BSTFA que contiene un catalizador: Esta técnica se usa para los compuestos aromáticos cuando la reacción de derivatización es más difícil, siendo aquí el catalizador el TMCS (trimetilclorosilano). A 0,3-1 mg de muestra se añaden 100 µl de piridina y 100 µl de reactivo BSTFA que contiene 1 % de TMCS (trimetilclorosilano) (de SIGMA-ALDRICH, referencia T6381). La disolución se pone en la estufa durante 15 a 20 min a 60°C. Después se evapora bajo atmósfera de nitrógeno y el residuo seco se recoge en metanol o acetato de etilo (100 a 500 µl) para el análisis por GC-MS.

45

- Esterificación metílica: Este procedimiento se ha puesto a punto específicamente para los compuestos N-cinamoil-amidas de los aminoácidos. Se añaden 100 µl de PFPA (anhídrido pentafluoropropiónico, SIGMA-ALDRICH N° 394904) a aproximadamente 0,3-1 mg de muestra disueltos en 100 µl de metanol. La disolución obtenida después se pone en la estufa durante 30 min a 60°C. El PFPA se evapora en atmósfera de nitrógeno y el residuo seco se recoge en acetato de etilo (100 a 500 µl) para el análisis por GC-MS.

50

Análisis

55

Los análisis se llevaron a cabo con un aparato de GC-MS (AGILENT TECHNOLOGIES) compuesto de un sistema de cromatógrafo 6890N GC, un espectrómetro de masas 5973 Mass Selectiv Detector equipado con una fuente de iones de impacto electrónico y un analizador de tipo cuadrupolo, un programa informático de adquisición MSD-CHEMSTATION así como los bancos de datos (NIST, WILEY). Los compuestos se separan mediante una columna

capilar DB-1MS (30 m x 0,25 mm, de JW Scientific) y cuyos límites de temperatura están comprendidos entre -60 °C y 350 °C. La fase móvil es helio. La presión en la columna es de 10,5 psi y el caudal de 1 ml/min. La temperatura del inyector (Inlet) es de 280 °C. La programación del gradiente de temperaturas es la siguiente: 1 min a 100°C, después aumento de 100 a 260°C a 4°/min, y después 10 min a 260°C. La duración total de la elución es de 51 min.

5 Los compuestos aromáticos previamente se derivatizan para hacerlos más volátiles.

II. RESULTADOS

2.1. Figura

10 Figura 1. Cromatograma de HPLC de los compuestos N-cinamoil-amidas obtenidos a partir de un cultivo realizado con extracto de levadura. Cultivo de 25 ml realizado en el medio 1. 1, ácido 4-metoxi-N-cinamoil-L-serina; 2, ácido 4-metoxi-N-cinamoilglicina; 3, ácido 4-metoxi-N-cinamoil-L-treonina; 4, ácido 4-metoxi-N-cinamoil-(D, L)-alanina; 5, ácido 4-metoxicinámico, sustrato residual en el cultivo.

2.2. Moléculas sintetizadas a partir del medio 1

El medio 1 contiene extracto de levadura; no hay aporte complementario de aminoácidos en este medio, el extracto de levadura ya los contiene. Cuando la bacteria crece en este medio en presencia de ácido cinámico o de ácido 4-metoxicinámico, o también ácido 3,4-dimetoxicinámico, fabrica compuestos N-cinamoil-amidas de aminoácidos solamente cuando este medio está desprovisto de hierro, es decir en las condiciones descritas en la parte experimental. En efecto, no hay síntesis de moléculas de tipo N-cinamoil-amidas en presencia de hierro (0,3 mg/l añadido al medio), de acuerdo con el análisis por HPLC y el control de las estructuras químicas por LC-MS y GC-MS.

25 La extracción del líquido sobrenadante acidificado con acetato de etilo y el análisis de las moléculas por LC-MS han permitido a los autores de la invención poner de manifiesto claramente 5 moléculas (figura 1). Así pues, la L-serina, L-treonina, L- o D- alanina aportadas por el medio de cultivo condensan con el precursor (II) para formar los ácidos 4-metoxi-N-cinamoil-L-serina, 4-metoxi-N-cinamoil-L-treonina, 4-metoxi-N-cinamoil-L-alanina y 4-metoxi-N-cinamoil-D-alanina. La enzima no hace ninguna diferencia entre las dos formas L y D de la alanina. Se ha obtenido también en pequeña cantidad ácido 4-metoxi-N-cinamoil-glicina.

Tomando el ácido cinámico o el ácido 3,4-dimetoxicinámico para el compuesto (II), se obtiene de la misma forma para cada uno de los sustratos las moléculas correspondientes (derivados amidas de la L-serina, L-treonina, L-alanina y D-alanina, glicina).

Después de hidrólisis del enlace amida mediante reflujo en presencia de H₂SO₄ durante 6 h, extracción de la disolución de acetato de etilo y evaporación hasta sequedad de la fase acuosa, el análisis por GC-MS después de derivatización con BSTFA pone de manifiesto la presencia de glicina, serina, treonina y alanina, permitiendo así confirmar las estructuras de las moléculas.

Conclusiones: Se observa la formación de las moléculas 1, ácido 4-metoxi-N-cinamoilserina; 2, ácido 4-metoxi-N-cinamoilglicina; 3, ácido 4-metoxi-N-cinamoiltreonina; 4, ácido 4-metoxi-N-cinamoilalanina. La serina, treonina, alanina y probablemente la glicina están presentes en el extracto de levadura YE. Una o varias enzimas de la bacteria hacen reaccionar estos aminoácidos con el precursor (II) (aquí el ácido 4-metoxicinámico), siendo aportados los aminoácidos por el extracto de levadura.

2.3. Cultivos realizados con el medio 2 para la producción orientada a una sola molécula

50 Un medio de cultivo (medio 2) desprovisto de aminoácidos permite obtener una sola molécula a la vez, mediante la adición del aminoácido (compuesto (III)) en ese mismo medio). De esta forma, esto ha permitido conocer la estereoselectividad de la reacción frente al aminoácido (D o L). Se realizaron 4 cultivos en presencia de YNB (extracto de levadura que no contiene aminoácidos, ni sulfato amónico) añadiéndole un solo aminoácido por cultivo en una concentración 2 mM, y en presencia de ácido 4-metoxicinámico 1 mM. Después de 72 h de cultivo, el análisis por HPLC muestra que, en comparación con la figura 1, el sustrato aromático se ha transformado totalmente. Además, en estas condiciones, se produce un solo compuesto N-cinamoil-amida. Las características espectrales y químicas de las N-cinamoil-amidas obtenidas a partir del ácido 4-metoxicinámico se resumen como ejemplo en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Características y tasas de producción de compuestos N-cinamoil-amidas de aminoácidos obtenidos por cultivo de la bacteria en el medio 2. Compuesto (II), ácido 4-metoxicinámico 1 mM; compuesto (III), el aminoácido mencionado aquí 2 mM.

Compuesto	RT (min) ¹	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ²	Masa del éster metílico ³	Producción ⁴ (mg/l)
Ácido 4-metoxicinámico	38,35	307	220	0
4-metoxi-N-cinamoil-L-serina	31,96	307	279	198
4-metoxi-N-cinamoil-D-serina	-	-	279	0
4-metoxi-N-cinamoil-L-treonina	35,26	307	293	176
4-metoxi-N-cinamoil-D-treonina	-	-	293	0
4-metoxi-N-cinamoil-L-alanina	36,43	307	263	191
4-metoxi-N-cinamoil-D-alanina	36,44	307	263	173
4-metoxi-N-cinamoil-glicina	34,76	307	249	ND

1. RT, tiempo de retención en HPLC determinado en una cadena (véase la parte experimental). 2. Longitud de onda máxima de las moléculas determinada a partir del análisis por HPLC. 3. Masa del éster metílico calculada. Solo los derivados de la glicina y la alanina muestran un ion molecular equivalente a este valor en GC-MS; los derivados de serina y de treonina, forman en GS-MC un alqueno correspondiente a la reacción de deshidratación del grupo funcional alcohol primario y secundario, respectivamente. 4. Las cantidades se han determinado para 1 litro de cultivo después de 72 h, después de extracción del líquido sobrenadante con acetato de etilo y purificación en soporte cromatográfico C₁₈ (véase la parte experimental). ND, no determinado.

2.4. Estereoselectividad de la enzima frente al aminoácido (D o L)

- Los experimentos muestran que la enzima bacteriana une la L-serina y L-treonina (y no la forma D) con el sustrato aromático, mientras que no diferencia la L o la D-alanina. En cuanto a la glicina, no tiene carbono asimétrico (véase la tabla 1, a modo de ejemplo).

2.5. Relaciones estructura aromática/actividad

- La enzima solo actúa sobre los compuestos cinámicos no hidroxilados. Los autores de la invención también han ensayado varios sustratos aromáticos, siguiendo el mismo protocolo: los ácidos p-hidroxibenzoicos, protocatéquico, cinámico, p-cumárico, ferúlico, 4-metoxicinámico, 3,4-dimetoxicinámico, 3,4,5-trimetoxicinámico, y catecol. Solo los ácidos cinámico, 4-metoxicinámico y 3,4-dimetoxicinámico, se han transformado en derivados de N-cinamoil-amidas. Por lo tanto, hay que mencionar aquí dos observaciones:

- (1) La síntesis se realiza con compuestos de estructura equivalente a la fórmula (II).
- (2) Cuando solo hay un grupo -OH presente en el ciclo aromático (posición 3, 4 ó 5), no se produce la síntesis.

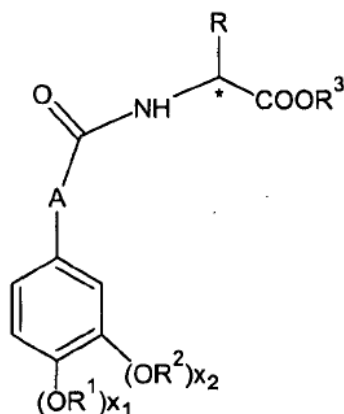
2.6. Tasa de producción a partir de 1 litro de cultivo (medio 2)

- Se pone a incubar 1 litro de cultivo (medio 2) que contiene un solo aminoácido 2 mM (seleccionado de: L-alanina, D-alanina, L-serina, L-treonina) y ácido 4-metoxicinámico 1 mM (compuesto (II)), a 30°C durante 72 h (agitación 150 rpm). Después de extracción con acetato de etilo, purificación en soporte C₁₈ como se ha descrito antes, y control de la estructura por HPLC, LC-MS y GC-MS, se obtienen las siguientes cantidades (véase la tabla 1):

- 4-metoxi N-cinamoil-L-serina: 198 mg para 1 litro
- 4-metoxi N-cinamoil-L-treonina: 176 mg para 1 litro
- 4-metoxi N-cinamoil-L-alanina: 191 mg para 1 litro
- 4-metoxi N-cinamoil-D-alanina: 173 mg para 1 litro

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de moléculas que tienen la siguiente fórmula (I):



(I)

en la que:

A es un grupo seleccionado de $-CH=CH-$ y $-CH_2-CH_2-$,

x_1 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

x_2 es un número entero seleccionado de 0 y 1,

R^1 , R^2 , independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, y grupos $-CO-R^4$ y R^4 representa un grupo seleccionado de: alquilos C_1-C_6 , fenilo y bencilo,

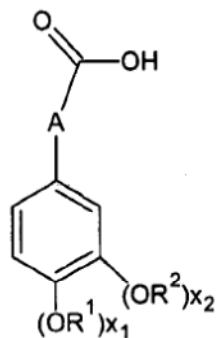
R^3 es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, y una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,

* es la configuración óptica L o D del aminoácido $-NH-CHR-COO-$, * puede representar una u otra de las configuraciones según la elección de R,

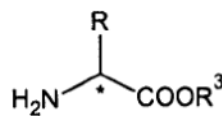
R es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre: $-H$ (glicina), $-CH_3$ (L-alanina, D-alanina), $-CH_2OH$ (L-serina), $-CHOH-CH_3$ (L-treonina), $-CH_2OR^5$ (L-serina con su grupo funcional hidroxilo protegido), $-CHOR^5-CH_3$ (L-treonina con su grupo funcional hidroxilo protegido), y R^5 es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, y grupos $-CO-R^6$, y R^6 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1-C_6 , fenilo y bencilo,

comprendiendo dicho procedimiento al menos una etapa de cultivo de al menos una bacteria seleccionada de las Bacillaceae, en presencia de al menos dos sustratos seleccionados de los que tienen las siguientes fórmulas (II) y

(III):



(II)



(III)

en las que A, x_1 , x_2 ; R^3 , * y R tienen la misma definición que en la fórmula (I),
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí son un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1 - C_6 , fenilo, bencilo y grupos
 $-CO-R^4$ y R^4 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1 - C_6 , fenilo, bencilo.

5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bacteria se elige de las que pertenecen al género *Bacillus* y preferiblemente de entre: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus* (o *Geobacillus*) *stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la bacteria se selecciona de entre:

10

- *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*: DSM 15029
- *Bacillus licheniformis*: DSM 13, ATCC 14580, NCIB - 9375
- *Bacillus thermoamylovorans* DSM 13307
- *Bacillus* (o *Geobacillus*) *stearothermophilus*: DSM 22, ATCC 12980, NCIB 8923

15 - *Bacillus caldotenax*: DSM 406

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la fórmula (I) se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

20 A es un grupo $-CH=CH-$,

R^1 , R^2 , independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de entre: H y un grupo metilo,
 R^3 es H,

R es una cadena lateral de aminoácido seleccionada de entre: -H (glicina), $-CH_3$ (L-alanina, D-alanina), $-CH_2OH$ (L-serina), $-CHOH-CH_3$ (L-treonina).

25

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cultivo de la bacteria se hace en un medio que comprende sales minerales y un extracto de levadura.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cultivo de la bacteria se hace en un medio que comprende, además del o de los aminoácidos de fórmula (III), al menos otro aminoácido seleccionado de entre: lisina, prolina, cisteína.

30

7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el precursor (II) se introduce en el medio de cultivo en forma de un extracto vegetal.

35

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende preferiblemente las siguientes etapas:

- centrifugación,

40

- recuperación del sobrenadante,
- purificación del producto (I).

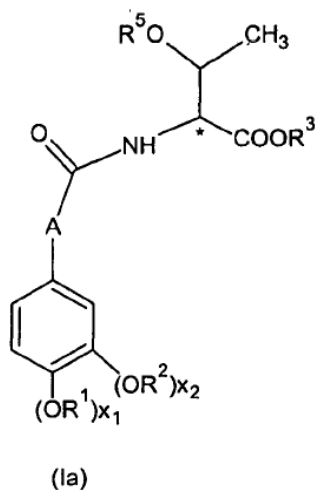
9. Uso del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para preparar una molécula seleccionada de entre:

45

- N-cinamoil-glicina,
- N-cinamoil-L-alanina,
- N-cinamoil-D-alanina,
- N-cinamoil-L-serina,
- 50 - N-cinamoil-L-treonina,
- N-(4-metoxicinamoil)-glicina,
- N-(4-metoxicinamoil)-L-alanina,
- N-(4-metoxicinamoil)-D-alanina,
- N-(4-metoxicinamoil)-L-serina,
- 55 - N-(4-metoxicinamoil)-L-treonina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-glicina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-alanina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-D-alanina,
- N-(3,4-dimetoxicinamoil)-L-serina,

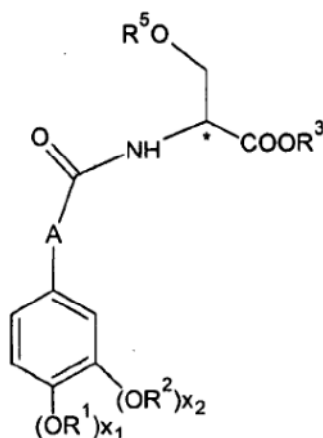
- N-(3,4-dimetoxycinamoil)-L-treonina,
- N-cumaroil-L-treonina,
- N-cafeoil-L-treonina,
- N-cumaroil-L-serina
- 5 - N-cafeoil-L-serina
- N-cumaroil-L-alanina,
- N-cafeoil-L-alanina,
- N-cumaroil-D-alanina,
- N-cafeoil-D-alanina,
- 10 - N-cumaroil-glicina,
- N-cafeoil-glicina.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar un compuesto que tiene la siguiente fórmula (Ia):



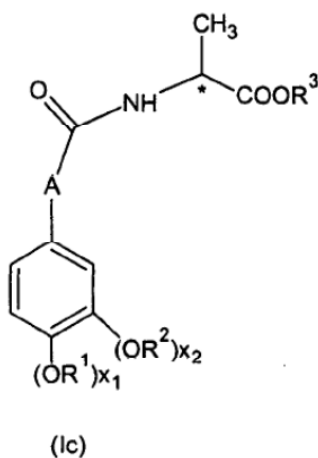
en la que:

- 20 A es un grupo seleccionado de entre $-CH=CH-$ y $-CH_2-CH_2-$,
- x_1 es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,
- x_2 es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,
- R^1 , R^2 , independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, grupos $-CO-$
- R^4 y R^4 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo,
- 25 R^3 es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,
- * es la configuración óptica L,
- R^5 es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo, grupos $-CO-R^6$ y R^6 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C_1-C_6 , fenilo, bencilo.
- 30
- 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar un compuesto que tiene la siguiente fórmula (Ib):



en la que:

- 5 A es un grupo seleccionado de entre -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,
 x_1 es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,
 x_2 es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,
 R^1 , R^2 , independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de entre: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-
 R^4 , y R^4 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,
 10 R^3 representa un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,
 * es la configuración óptica L,
 R^5 es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO- R^6 y R^6 es un grupo seleccionado de entre: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,
 15 excluyendo los siguientes compuestos donde:
 A es CH=CH-, $x_1 = 1$, $x_2 = 1$, y
 20 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^5 = \text{CH}_3\text{CO-}$, o
 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{H}$, $R^5 = \text{H}$, o
 - $R^1 = R^2 = \text{CH}_3\text{CO-}$, $R^3 = \text{tBu}$, $R^5 = \text{tBu}$.
 12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar un compuesto
 25 que tiene la siguiente fórmula (Ic):



en la que:

A es un grupo seleccionado de entre -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,

x₁ es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,

5 x₂ es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,

R¹, R², independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de entre: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-

R⁴, y R⁴ representa un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,

R³ es un grupo seleccionado de entre: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,

10 * es la configuración óptica L o D,

excluyendo los casos donde:

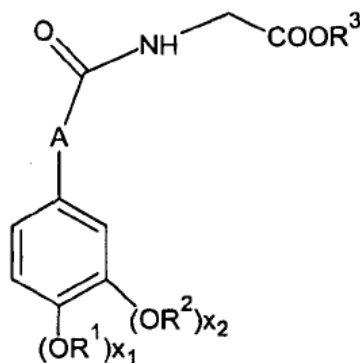
*es la configuración óptica L y

15 A es -CH=CH-, y

- x₁ = x₂ = 0, R³ = tBu.

13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar un compuesto

20 que tiene la siguiente fórmula (Id):



(Id)

en la que:

25

A es un grupo seleccionado de entre -CH=CH- y -CH₂-CH₂-,

x₁ es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,

x₂ es un número entero seleccionado de entre 0 y 1,

R¹, R², independientemente entre sí, son un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, grupos -CO-R⁴ y

30 R⁴ es un grupo seleccionado de: alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo,

R³ es un grupo seleccionado de: H, alquilos C₁-C₆, fenilo, bencilo, una cadena peptídica de aminoácidos que comprende de 1 a 30 aminoácidos,

excluyendo los casos donde:

35

A representa -CH=CH- y:

- x₁ = x₂ = 0, R¹ = CH₃, R³ = H

- x₁ = 1, x₂ = 0, R¹ = CH₃, R³ = C₂H₅

40 - x₁ = x₂ = 0, R³ = H.

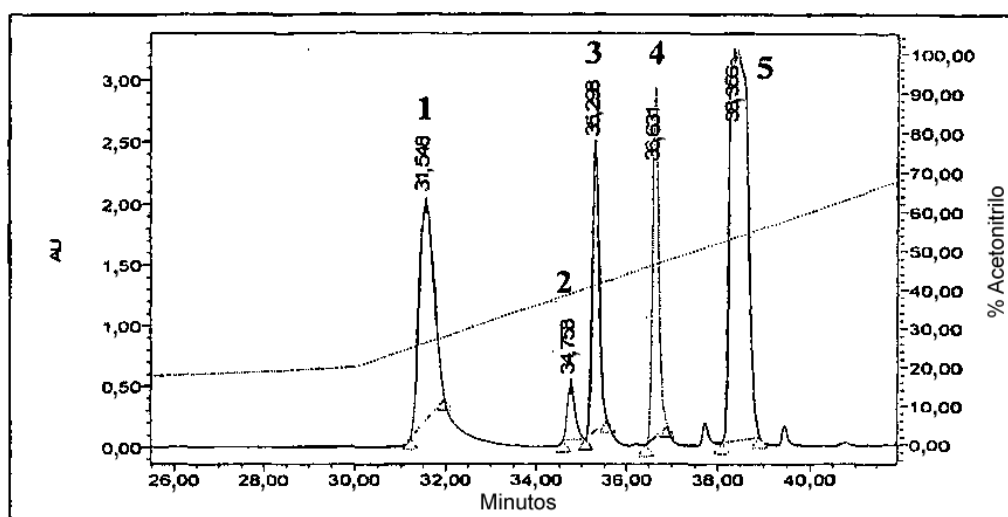


Figura 1