

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 364**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/221</b>	(2006.01)
<b>C07C 229/24</b>	(2006.01)
<b>C07C 227/18</b>	(2006.01)
<b>C07C 229/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/08</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013 PCT/EP2013/077320**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096155**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013 E 13811513 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2934506**

54 Título: **Derivados de glutamato para su utilización tópica como principio activo inmunomodulador**

30 Prioridad:

**19.12.2012 FR 1262329**

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

**25.04.2018**

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)  
45, place Abel-Gance  
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**REDOULES, DANIEL;  
DAUNES-MARION, SYLVIE;  
POIGNY, STÉPHANE y  
ARIES, MARIE-FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 665 364 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

Derivados de glutamato para su utilización tópica como principio activo inmunomodulador.

5 El campo de la presente invención se refiere a nuevos derivados de glutamato y a su utilización como principio activo inmunomodulador.

Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevas composiciones interesantes para su utilización tópica en el tratamiento y en la prevención de las dermatosis inflamatorias tales como la dermatitis atópica, el eczema de contacto, el acné, la dermatitis seborreica, la rosácea o la psoriasis.

Las aplicaciones descritas hasta ahora con respecto a los ésteres del ácido glutámico prevén, entre otros, unas composiciones cosméticas destinadas a favorecer el crecimiento capilar (EP 0 572 167). Otras técnicas anteriores describen algunos ésteres del ácido glutámico como intermedios de síntesis.

15 La dermatitis atópica (DA) es una patología crónica inflamatoria que afecta a cerca del 20% de los niños y cuya prevalencia está claramente en aumento en los países desarrollados. Es una afección plurifactorial, cuyo fenotipo está modulado por unos factores que dependen al mismo tiempo de factores genéticos e inmunológicos, pero también hormonales y medioambientales, que se combinan de maneras diversas y se expresan de manera muy polimorfa en los pacientes. Actualmente, se distingue la forma de la DA alérgica IgE-dependiente, que afecta aproximadamente al 80% de los pacientes, y la forma no alérgica que afecta a una minoría de pacientes en los que se encuentra una concentración sérica en IgE normal. Además, los estudios epidemiológicos parecen indicar que la DA empieza en el niño en forma no alérgica y evoluciona después hacia la forma alérgica (Novak N *et al.*, Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis, *J Invest Dermatol.* 2002 Oct; 119(4):870-5, 2002; Allam JP *et al.*, Recent highlights in the pathophysiology of atopic eczema, *Int Arch Allergy Immunol.* 2005 Feb; 136(2):191-7).

En el plano inmunológico, el desarrollo de la lesión inflamatoria interviene después de una fase de sensibilización con alérgenos presentes o bien en el entorno proteico (en el caso de la dermatitis atópica), o bien químico (eczema alérgico de contacto). Las lesiones de eczema aparecen, después de una nueva exposición al alérgeno y se deben a una infiltración de las células inflamatorias de la sangre hacia la piel. Las sub-poblaciones linfocitarias T CD4<sup>+</sup> activadas durante esta fase presentan un perfil particular de producción de citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y están implicadas en el reclutamiento de células efectoras de la reacción retrasada y conllevan unas disminuciones de síntesis de filagrina y de ceramidas, las cuales caracterizan las anomalías de la barrera cutánea observadas en los pacientes portadores de DA (Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression, Howell MD *et al.*, *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul; 120(1):150-5), (Imokawa *et al.*, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin, *J Invest Dermatol.* 1991 Abr; 96(4):523-6 1991). En este contexto, la alteración de la barrera cutánea favorece la penetración de los alérgenos y la activación de los linfocitos T específicos. Además, estas citoquinas son responsables de la síntesis de IgE por los plasmocitos descendientes de linfocitos B activados por antígeno. Existe así un círculo vicioso de mantenimiento de la respuesta alérgica. Las células presentadoras de antígenos cargadas en IgE presentan una mayor cantidad de epítomos a los linfocitos y favorecen una respuesta IgE.

45 La producción de IL-4 caracteriza la diferenciación TH2, la cual tiene un papel crucial en el desarrollo de la respuesta IgE.

Además, se ha demostrado que los linfocitos TH17 producen unas citoquinas proinflamatorias y juegan un papel importante en la patogenia de la DA. En efecto, en un estudio farmacoclínico, los autores encuentran un aumento del porcentaje de los linfocitos TH17 en la sangre y en la piel de sujetos portadores de DA, y que este aumento está positiva y significativamente correlacionado con la gravedad de la DA (Koga C, Kabashima K, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of TH17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2625-30). Finalmente, se puede señalar el predominio de la respuesta TH1 en las lesiones crónicas de la DA (von Bubnoff *et al.*, Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin, *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Ene; 125(1):60-8).

Los tratamientos clásicos de la dermatitis atópica utilizan en particular unos democorticoides o unos inmunosupresores, moléculas capaces de suprimir la respuesta inmune linfocitaria T.

60 Las eficacias clínicas de inmunosupresores como el tacrolimus o el pimecrolimus se han establecido mediante numerosos estudios:

- De Prost *et al.*, Double-blind randomized placebo-controlled trial of local cyclosporine in atopic dermatitis, *Arch Dermatol.* 1989 Abr; 125(4):570;
- Ho VC *et al.*, Safety and efficacy of nonsteroid pimecrolimus cream 1% in the treatment of atopic dermatitis in infants, *J Pediatr.* 2003 Feb; 142(2):155-62;

- Reitamo *et al.*, Topical noncorticosteroid immunomodulation in the treatment of atopic dermatitis, Am J Clin Dermatol. 2002; 3(6):381-8. Review.

5 Sin embargo, los dermocorticoides o los inmunosupresores no carecen de efectos indeseables, en particular en los niños.

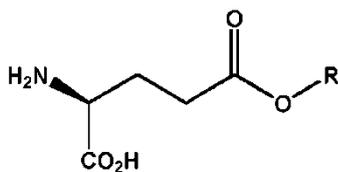
La DA se caracteriza por unas erupciones repetidas durante varios años. Evoluciona por brotes entrecortados de remisiones espontáneas.

10 La enfermedad se debe tratar a largo plazo. Existe así una necesidad y una alta demanda para poner en evidencia alternativas terapéuticas a estas dermatosis inflamatorias. La utilización de inmunomoduladores por vía local forma parte, hoy en día, del arsenal terapéutico para tratar la dermatitis atópica así como otras dermatosis, como la psoriasis o el eczema de contacto.

15 Realizando investigaciones activas sobre estas dermatosis inflamatorias, la solicitante ha constatado, de manera particularmente sorprendente, que unos derivados de L-glutamato de fórmula general I poseían unas propiedades al mismo tiempo de modulación de la respuesta inmune y de modulación de la respuesta inflamatoria.

20 En el marco de la presente invención, se ha considerado, por lo tanto, el desarrollo de moléculas derivadas de L-glutamato (monoéster en posición 5 del ácido L-glutámico), concebidas para aplicaciones tópicas, y capaces de modular la activación de las poblaciones linfocitarias y queratinocitarias.

25 En el sentido de la presente invención, se entiende por "derivados de L-glutamato" los compuestos que responden a la fórmula general I siguiente:



30 en la que R representa un grupo alquilo, lineal o ramificado, de C<sub>5</sub> a C<sub>25</sub> y preferentemente de C<sub>5</sub> a C<sub>14</sub>;

para su utilización tópica como principio activo dermatológico destinado al tratamiento y/o a la prevención de las enfermedades inflamatorias de la piel.

35 Por "radical alquilo" se entiende, en el sentido de la presente invención, una cadena hidrocarbonada alifática lineal o ramificada saturada y que comprende el número de átomos de carbono especificado.

40 Según otro aspecto de la invención, las utilizaciones y composiciones dermatológicas destinadas al tratamiento y/o a la prevención de las dermatosis inflamatorias, se refieren también a los derivados de glutamato no únicamente en forma de enantiómeros L-puro, sino también en forma de cualquier mezcla de los dos enantiómeros D y L con, sin embargo y preferentemente, una fracción preponderante de enantiómero L.

45 Los compuestos según la invención presentan unas eficacias inmunomoduladoras superiores a las obtenidas con el ácido glutámico solo frente a respuestas linfocitarias TH1, TH2 y TH17 (figuras 1a, 1b y 1c respectivamente obtenidas con el compuesto del ejemplo 3). Estos derivados presentan, por lo tanto, un interés potencial como inmunorregulador en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias cutáneas tales como la dermatitis atópica, el eczema de contacto, o la psoriasis.

50 En un modo de realización particular de la invención, la actividad de los derivados de fórmula general I se evaluó en función de su longitud de cadena. La actividad es óptima para los compuestos cuyas longitudes de cadenas están comprendidas entre C<sub>5</sub> y C<sub>14</sub> (figura 2a y 2b). Según otro modo de realización de la invención, la presencia de una cadena ramificada corta permite mantener la actividad inmunomoduladora en comparación con el compuesto según el ejemplo 3 (figura 2c).

55 En un modo de realización preferido de la invención, los compuestos de fórmula I son los nuevos compuestos:

- 5 (3,7-dimetiloctil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(3,7-dimetiloxiloxi)-5-oxopentanoico
- 5 (nonan-2-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-2-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5 (nonan-5-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-5-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5 (2-hexildecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-hexildeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5 (2-etilhexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-etilhexiloxi)-5-oxopentanoico

Por otro lado, los compuestos de fórmula I según la invención manifiestan también una actividad antiinflamatoria que no se encuentra con el ácido glutámico (figura 4 para el compuesto según el ejemplo 3). Esta actividad suplementaria de estos derivados amplía su campo de aplicaciones terapéuticas a otras dermatosis inflamatorias tales como el acné, la rosácea, así como la dermatitis seborreica.

5 Los derivados según la invención presentan por lo tanto un interés como agente antiinflamatorio e inmunorregulador en pacientes que padecen dermatosis inflamatoria tales como la dermatitis atópica, el eczema de contacto, el acné, la dermatitis seborreica, la rosácea o la psoriasis.

10 Según un modo de realización particular de la invención, los compuestos de fórmula general (I) se pueden seleccionar de entre la lista de los compuestos siguientes:

- 5-(n-pentil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5-(pentiloxi)pentanoico
- 5-(n-hexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexiloxi)-5-oxopentanoico
- 15 - 5-(n-nonil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(noniloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-dodecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(dodeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-tetradecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5-(tetradecil)pentanoico
- 5-(n-hexadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexadeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-octadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(octadeciloxi)-5-oxopentanoico
- 20 - 5-(3,7-dimetiloctil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(3,7-dimetiloctiloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(nonan-2-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-2-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(nonan-5-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-5-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(2-hexildecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-hexildeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(2-etilhexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-etilhexiloxi)-5-oxopentanoico

25 La presente invención se refiere también a la utilización tópica de las composiciones dermatológicas o cosméticas que comprenden un compuesto de fórmula general (I) en el tratamiento y/o la prevención de las dermatosis inflamatorias.

30 Según otra característica de la invención, el activo inmunomodulador se presenta en forma de una composición dermatológica o cosmética que contiene por lo menos un compuesto de fórmula I a razón del 0,01% al 20%, preferentemente del 0,1% al 10% en peso, y más particularmente del 1% al 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

35 La composición dermatológica o cosmética según la invención comprende, además, uno o varios excipientes usuales dermatológica o cosméticamente compatibles.

Los excipientes dermatológica o cosméticamente compatibles pueden ser cualquier excipiente entre los conocidos por el experto en la técnica para obtener una composición para la aplicación tópica en forma de leche, crema, bálsamo, aceite, loción, gel, gel espumante, pomada, spray, etc.

40 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula I, caracterizado por que se hace reaccionar el N-alfa-bencilcarbonil-L-ácido glutámico-alfa-bencil éster con un alcohol de fórmula R-OH en la que R tiene el significado dado anteriormente y el producto obtenido está desprotegido por hidrogenación catalítica.

La invención se entenderá mejor a la lectura de los resultados siguientes que la ilustran.

Leyenda de las figuras:

- 50 - figuras 1a, 1b y 1c: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora del compuesto según el ejemplo 3 frente a las secreciones de IL-2 (1a), de IL-4 (1b) y de IL-17 (1c) por los linfocitos humanos.
- figuras 2a, 2b y 2c: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora de los derivados alquilados de cadena corta lineal (2a), de cadena larga lineal (2b) y de cadena corta ramificada (2c) frente a la secreción de IL-2 por los linfocitos humanos.
- 55 - figura 3: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora del compuesto según el ejemplo 12 frente a las secreciones de citoquinas implicadas en las respuestas inmunitarias de tipo Th1, Th2 y Th17.
- 60 - figura 4: Puesta en evidencia de la actividad anti-inflamatoria del compuesto según el ejemplo 3 frente a la producción de IL-8 por los queratinocitos humanos.

A/Evaluación farmacológica

65 A.1 - Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora: estudio de la secreción de IL2, de IL4 y de IL17 para, respectivamente, las respuestas linfocitarias TH1, TH2 y TH17.

Las actividades farmacológicas de los ésteres según la invención se pusieron en evidencia de la siguiente manera:

- 5
- las células humanas mononucleadas sanguíneas (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) se aíslan en bolsas Buffy-Coat del "Etablissement Français du Sang" (EFS) Pyrénées Méditerranée, sobre gradiente de Ficoll (Medio de separación de los linfocitos, densidad 1,077 g/ml); los linfocitos CD4<sup>+</sup> se purifican a partir de esta población celular por inmunoselección magnética (CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, Ref. 130-091-155 Miltenyi Biotec), después se distribuyen en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo RPMI 5% SVF; se preincuban entonces con los principios activos a evaluar durante 1 hora y después se estimulan durante 24 horas con 300 ng/ml SEB (Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*). Los análisis de citoquinas linfocitarias se realizan a partir de una muestra de ensayo del sobrenadante según los métodos siguientes:
- 10
- IL2 (TH1), IL4 (TH2), se evalúan por citometría de flujo por CBA (Ref. 550749, BECTON Dickinson),
  - IL17 (TH17) se evalúa mediante ELISA, Human IL17 Quantikine (Ref. D1700, R&D Systems),
  - IL2 (TH1) se evalúa también mediante ELISA, Duoset IL2 (Ref. DY202, R&D Systems).
- 15
- 20

La modulación de la respuesta inmune observada se ilustra mediante los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora del compuesto según el ejemplo 3 frente al ácido glutámico frente a las producciones de IL-2 (1a), de IL-4 (1b) y de IL-17 (1c) por los linfocitos humanos; esta actividad es dosis-dependiente y alcanza un 63%, un 70% y un 54% de inhibición de las producciones de IL-2, IL-4 y IL-17. Respectivamente, a la concentración de 300 µM.

25

Figura 2: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora de los derivados alquilados de cadena corta lineal (2a), de cadena larga lineal (2b) y de cadena corta ramificada (2c) frente a la secreción de IL-2 por los linfocitos humanos; la actividad es óptima para los compuestos cuyas longitudes de cadenas están comprendidas entre C<sub>5</sub> y C<sub>14</sub> y la presencia de una cadena ramificada corta permite mantener esta actividad en comparación con el compuesto según el ejemplo 3.

30

Figura 3: Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora del compuesto según el ejemplo 12 frente a las producciones de citoquinas Th1, Th2, Th17 por los linfocitos humanos; esta actividad es dosis-dependiente y alcanza un 43%, un 44%, un 77%, un 80% y un 18% de inhibición de la producción de IL2, IL6, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , un 69%, un 77%, un 87%, y un 84% de inhibición de la producción de IL4, IL5, IL10, IL13, y un 86% de inhibición de la producción de IL17 a la concentración de 300 µM.

35

La presencia de un carácter lipófilo sobre la unidad glutamato permite modular la activación linfocitaria de TH2, de TH17 y de TH1 inducida por la enterotoxina B (SEB), super-antígeno del estafilococo dorado.

40

A.2 - Puesta en evidencia de la actividad anti-inflamatoria: Estudio de la secreción de IL8 para la respuesta queratinocitaria.

45

- los queratinocitos HaCaT distribuidos en placas de 24 pocillos se pre-incuban durante 2 horas con los principios activos a evaluar, después se estimulan durante 24 horas por 10 ng/ml TNF $\alpha$ . La determinación de interleucina 8 se realiza a partir de una muestra de ensayo del sobrenadante según el método siguiente:
- IL8 se evalúa por ELISA, Duoset IL8 (Ref. DY208E, R&D Systems).
- 50

La modulación de la respuesta inflamatoria observada se ilustra mediante el dibujo adjunto, en el que:

Figura 4: puesta en evidencia de la actividad antiinflamatoria del ejemplo 3 frente al ácido glutámico frente a la producción de IL-8.

55

### **Ejemplos de síntesis de los compuestos según la invención**

#### Procedimiento 1

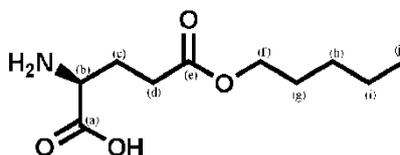
60

Este procedimiento está adaptado a los descritos en la patente FR 1 427 996, MERCK & CO, 1965.

**Ejemplo 1****5-(n-pentil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5-(pentiloxi)pentanoico**

5 Se pone en suspensión el ácido L-glutámico (3 g, 1 eq.) en una mezcla de terc-butanol (10,5 eq.) y pentanol al 99% (4 eq.). Después del calentamiento del medio de reacción a 40°C, se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95% (1,5 eq.) gota a gota. La temperatura de calentamiento se eleva entonces a 65°C hasta la obtención de una solución límpida. Finalmente, se mantiene la temperatura durante veinte horas a 65°C. Después de detener el calentamiento, se añade la trietilamina (0,57 eq.) gota a gota a la mezcla de reacción tan rápidamente como sea posible. Se añaden después 5 ml de agua y 66 ml de etanol. Finalmente, a temperatura ambiente, se añaden 2,1 eq. de trietilamina, lo cual inicia la precipitación. El medio de reacción se deja entonces bajo agitación durante 30 minutos. Después, el precipitado se filtra y se seca durante una hora al vacío a 50°C y se lava con 13 ml de etanol y después con 13 ml de éter dietílico. El producto obtenido se seca al vacío a 30°C durante una noche y después se recristaliza añadiendo 40 ml de una solución de isopropanol: agua/1:1 y calentando a 83°C hasta la disolución completa. Se deja volver después la mezcla a la temperatura ambiente y el producto cristaliza. Se lava entonces el precipitado con 4 ml de la mezcla isopropanol:agua/1:1 y después con 13 ml de etanol y finalmente 13 ml de éter dietílico. El producto obtenido se aísla en forma de cristales blancos.

Rendimiento: 10%



RMN (<sup>1</sup>H, D<sub>2</sub>O): δ (ppm): 0,9 (t, 3H, CH<sub>3(j)</sub>); 1,3 (m, 4H, CH<sub>2(i-h)</sub>); 1,7 (quint, 2H, CH<sub>2(g)</sub>); 2,1 (m, 2H, CH<sub>2(c)</sub>); 2,6 (m, 2H, CH<sub>2(d)</sub>); 3,7 (t, 1H, CH<sub>(b)</sub>); 4,1 (t, 2H, CH<sub>2(f)</sub>).

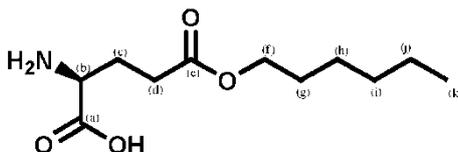
RMN (<sup>13</sup>C, D<sub>2</sub>O): δ (ppm): 16,1 (CH<sub>3(j)</sub>); 24,5 (CH<sub>2(i)</sub>); 28,4 (CH<sub>2(c)</sub>); 30,2 (CH<sub>2(h)</sub>); 30,3 (CH<sub>2(g)</sub>); 32,9 (CH<sub>2(d)</sub>); 56,9 (CH<sub>(b)</sub>); 68,9 (CH<sub>2(f)</sub>); 174,5 (C<sub>(e)</sub>); 177,9 (C<sub>(a)</sub>).

SM: ESI+: [M+H]<sup>+</sup>: 218,2 (100%)

**Ejemplo 2****5-(n-hexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexiloxi)-5-oxopentanoico**

35 Se pone en suspensión el ácido L-glutámico (3 g, 1 eq.) en una mezcla de terc-butanol (10,5 eq.) y hexanol al 99% (4 eq.). Después del calentamiento del medio de reacción a 40°C, se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95% (1,5 eq.) gota a gota. Se aumenta la temperatura de calentamiento entonces a 65°C hasta la obtención de una solución límpida. Finalmente, se mantiene la temperatura durante una hora a 65°C. Después de detener el calentamiento, se añade la trietilamina (0,57 eq.) gota a gota a la mezcla de reacción tan rápidamente como sea posible. Se añaden después 5 ml de agua y 66 ml de etanol. Finalmente, a temperatura ambiente, se añaden 2,1 eq. de trietilamina, lo que inicia la precipitación. El medio de reacción se deja entonces bajo agitación durante 30 minutos. Después, el precipitado se filtra y se seca durante una hora al vacío a 50°C y se lava con 13 ml de etanol y después con 13 ml de éter dietílico. El producto obtenido se seca al vacío a 30°C durante una noche y después se recristaliza añadiendo 40 ml de una solución isopropanol:agua/1:1 y calentando a 83°C hasta la disolución completa. Se deja volver después la mezcla a temperatura ambiente y el producto cristaliza. Se lava entonces el precipitado con 4 ml de la mezcla isopropanol:agua/1:1 después con 13 ml de etanol y finalmente 13 ml de éter dietílico. El producto obtenido se aísla en forma de cristales blancos.

Rendimiento: 17%



RMN (<sup>1</sup>H, D<sub>2</sub>O): δ (ppm): 0,88 (t, 3H, CH<sub>3(k)</sub>); 1,3 (m, 6H, CH<sub>2(j-h)</sub>); 1,7 (quint, 2H, CH<sub>2(g)</sub>); 2,1 (m, 2H, CH<sub>2(c)</sub>); 2,6 (m, 2H, CH<sub>2(d)</sub>); 3,7 (t, 1H, CH<sub>(b)</sub>); 4,1 (t, 2H, CH<sub>2(f)</sub>).

RMN (<sup>13</sup>C, D<sub>2</sub>O): δ (ppm): 16,2 (CH<sub>3(k)</sub>); 24,8 (CH<sub>2(j)</sub>); 27,7 (CH<sub>2(c)</sub>); 28,4 (CH<sub>2(h)</sub>); 30,6 (CH<sub>2(g)</sub>); 32,9 (CH<sub>2(d)</sub>); 33,6 (CH<sub>2(i)</sub>); 56,9 (CH<sub>(b)</sub>); 68,9 (CH<sub>2(f)</sub>); 174,5 (C<sub>(e)</sub>); 177,9 (C<sub>(a)</sub>).

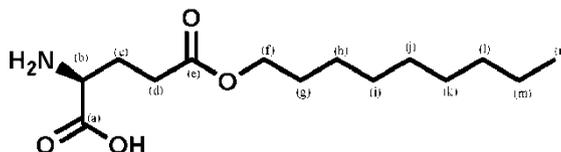
SM: ESI+:  $[M+H]^+$ : 232,1 (100%)

### Ejemplo 3

#### 5 5-(n-nonil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(noniloxi)-5-oxopentanoico

Se pone en suspensión el ácido L-glutámico (3 g, 1 eq.) en una mezcla de *tert*-butanol (10,5 eq.) y nonanol al 99% (4 eq.). Después del calentamiento del medio de reacción a 40°C, se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95% (1,5 eq.) gota a gota. Se aumenta la temperatura de calentamiento entonces a 65°C hasta la obtención de una solución límpida. Finalmente, se mantiene la temperatura durante cuatro horas a 65°C. Después de detener el calentamiento, se añade la trietilamina (0,57 eq.) gota a gota a la mezcla de reacción tan rápidamente como sea posible. Se añaden después 5 ml de agua y 66 ml de metanol. Finalmente, a temperatura ambiente, se añaden 2,1 eq. de trietilamina lo que inicia la precipitación. El medio de reacción se deja entonces bajo agitación durante 30 minutos. El precipitado se filtra después y después se resuspende en aproximadamente 50 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla bajo agitación y se calienta a 65°C durante 20 min. Se filtra de nuevo el precipitado, se lava con 13 ml de metanol y después con 13 ml de éter dietílico. El producto obtenido se seca al vacío a 25°C durante una noche y después se recristaliza añadiendo 50 ml de una solución isopropanol:agua/1:1 y calentando a reflujo isopropanol hasta la disolución completa. Se deja volver después la mezcla hasta temperatura ambiente y el producto cristaliza. Se lava entonces el precipitado con 5 ml de la mezcla isopropanol:agua/1:1 después con 15 ml de metanol y finalmente con 15 ml de éter dietílico. El producto se aísla en forma de cristales blancos y se seca al vacío a 20°C durante una noche.

Rendimiento: 40%



25 RMN (<sup>1</sup>H, MeOD): δ (ppm): 0,9 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(n)); 1,3 (m, 12H, CH<sub>2</sub>(m-h)); 1,7 (quint, 2H, CH<sub>2</sub>(g)); 2,1 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(c)); 2,5 (t, 2H, CH<sub>2</sub>(d)); 3,6 (t, 1H, CH(b)); 4,1 (t, 2H, CH<sub>2</sub>(f)).

30 RMN (<sup>13</sup>C, MeOD): δ (ppm): 14,5 (CH<sub>3</sub>(n)); 23,7 (CH<sub>2</sub>(m)); 27,1 (CH<sub>2</sub>(c)); 27,5 (CH<sub>2</sub>(h)); 29,8 (CH<sub>2</sub>(g)); 30,4 (CH<sub>2</sub>(k)); 30,5 (CH<sub>2</sub>(i)); 30,7 (CH<sub>2</sub>(j)); 31,1 (CH<sub>2</sub>(d)); 33,1 (CH<sub>2</sub>(l)); 55,5 (CH(b)); 66,0 (CH<sub>2</sub>(f)); 174,5 (C(e)); 177,9 (C(a)).

Analítica calculada para C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (273,37): teórico: C 61,51; H 9,96; N 5,12; Exp.: C 61,80; H 9,96; N 4,72

35 SM: ESI+:  $[M+H]^+$ : 274,2 (100%)

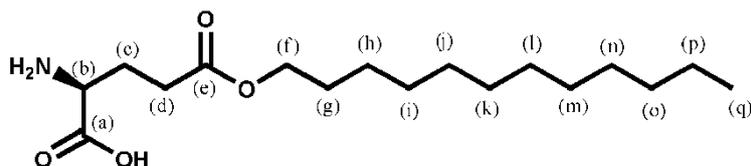
### Ejemplo 4

#### 40 5-(n-dodecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(dodeciloxi)-5-oxopentanoico

Se pone en suspensión el ácido L-glutámico (5 g, 1 eq.) en una mezcla de *tert*-butanol (34 ml, 10,5 eq.) y de 1-dodecanol (22,9 g, 3,6 eq.). Se calienta el medio de reacción a 40°C. Se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95% (2,9 ml) gota a gota. La suspensión se calienta a 65°C. Después de una hora y media, se obtiene una solución homogénea. La mezcla se agita durante una hora suplementaria a 65°C y se detiene el calentamiento. Después de volver a temperatura ambiente, se añade trietilamina (2,7 ml) gota a gota en 1 minuto. Después, se añaden agua (8 ml) y etanol (119 ml), seguido de la trietilamina (10,2 ml). Después de 30 minutos de agitación, el precipitado blanco se filtra y se seca. El sólido blanco pastoso así obtenido se tritura en agua (91 ml) a 65°C. El sólido se filtra, se lava mediante metanol (23 ml) y después con éter dietílico (23 ml) y se seca al vacío. El polvo blanco obtenido (5,72 g) se tritura entonces en una mezcla isopropanol:agua/2:1 (160 ml) a 85°C. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y el producto esperado se filtra sobre sinterizado, se aclara mediante una mezcla isopropanol:agua/2:1 (50 ml) y después metanol (50 ml) y éter dietílico (50 ml). El producto se seca al vacío durante la noche, después se tritura en agua (100 ml) y finalmente se cristaliza una segunda vez en una mezcla isopropanol:agua/2:1 (150 ml).

55 El producto se aísla finalmente en forma de cristales blancos y se seca al vacío a 20°C durante una noche.

Rendimiento del 43%



P.F.: 189,9°C

5 RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,9 (t, 3H,  $\text{CH}_3(\text{q})$ ); 1,3 (m, 18H,  $\text{CH}_2(\text{p-h})$ ); 1,8 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,5 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 2,95 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,3 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 4,58 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{b})$ ).

RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,3 ( $\text{CH}_3(\text{q})$ ); 21,9 ( $\text{CH}_2(\text{p})$ ); 24,2 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 25,01 ( $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 27,5 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 28,5-29,01 ( $\text{CH}_2(\text{i-n})$ ); 30,01 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 31,3 ( $\text{CH}_2(\text{o})$ ); 53,4 ( $\text{CH}(\text{b})$ ); 67,6 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 172,5 ( $\text{C}(\text{e})$ ); 176,6 ( $\text{C}(\text{a})$ ).

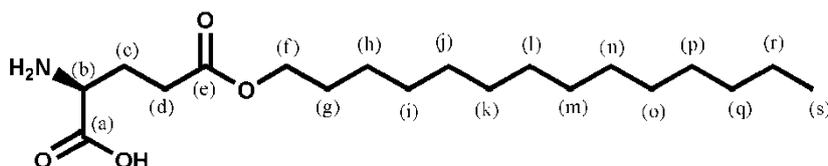
10 Analítica calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_4$  (315,24): teórico: C 64,73; H 10,54; N 4,44; Exp.: C 64,57; H 10,69; N 4,10

SM: ESI+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 316,2; ESI-:  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 314,2

### 15 Ejemplo 5

#### 5-(n-tetradecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5(tetradecil)pentanoico

20 Este compuesto aislado en forma de sólido blanco se ha obtenido con un rendimiento del 51% según el protocolo utilizado para la preparación del ácido L-Glutámico 5 dodeciléster con 4 g de ácido glutámico y 23,3 g de tetradecanol.



25 P.F.: 184,8°C

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,9 (t, 3H,  $\text{CH}_3(\text{s})$ ); 1,3-1,4 (m, 22H,  $\text{CH}_2(\text{r-h})$ ); 1,8 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,5 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 2,95 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,3 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 4,58 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{b})$ ).

30 RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,2 ( $\text{CH}_3(\text{s})$ ); 21,9 ( $\text{CH}_2(\text{r})$ ); 24,2 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 25,01 ( $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 27,5 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 28,5-29,07 ( $\text{CH}_2(\text{i-p})$ ); 30,00 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 31,4 ( $\text{CH}_2(\text{q})$ ); 53,4 ( $\text{CH}(\text{b})$ ); 67,6 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 172,5 ( $\text{C}(\text{e})$ ); 176,6 ( $\text{C}(\text{a})$ ).

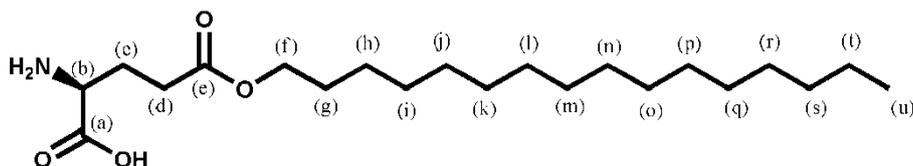
Analítica calculada para  $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_4$  (343,27): teórico: C 66,43; H 10,86; N 4,08; Exp.: C 65,66; H 10,58; N 3,94

35 SM: ESI+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 344,2; ESI-:  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 342,2

### Ejemplo 6

#### 5-(n-hexadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexadeciloxi)-5-oxopentanoico

40 Este compuesto aislado en forma de sólido blanco se ha obtenido con un rendimiento del 69% según el protocolo utilizado para la preparación del 5-(n-dodecil)-L-glutamato con 5 g de ácido glutámico y 33 g de hexadecanol.



45 P.F.: 179,3°C

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,8 (t, 3H,  $\text{CH}_3(\text{u})$ ); 1,23 (m, 26H,  $\text{CH}_2(\text{t-h})$ ); 1,65 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,4 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 2,8 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,16 (t, 2H,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 4,43 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{b})$ ).

50 RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,2 ( $\text{CH}_3(\text{u})$ ); 21,9 ( $\text{CH}_2(\text{t})$ ); 24,1 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 24,9 ( $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 27,4 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 28,4-28,9 ( $\text{CH}_2(\text{i-r})$ ); 29,8 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 31,3 ( $\text{CH}_2(\text{s})$ ); 53,2 ( $\text{CH}(\text{b})$ ); 67,4 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 172,3 ( $\text{C}(\text{e})$ ); 176,5 ( $\text{C}(\text{a})$ ).

Análítica calculada para  $C_{21}H_{41}NO_4$  (371,55): teórico: C 67,88; H 11,12; N 3,77; Exp.: C 67,60; H 10,93; N 3,77

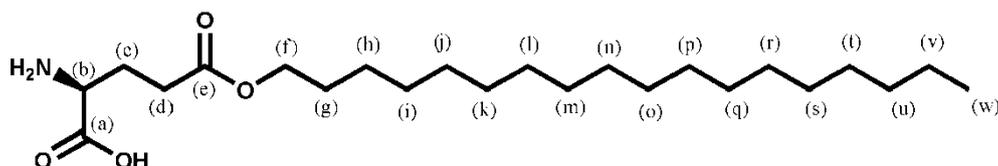
SM: ESI+:  $[M+H]^+$ : 372,3; ESI-:  $[M-H]^-$ : 370,2

5

### Ejemplo 7

#### 5-(n-octadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(octadeciloxi)-5-oxopentanoico

Este compuesto se aísla en forma de sólido blanco con un rendimiento del 45% según el protocolo utilizado para la preparación del 5-(n-dodecil)-L-glutamato éster con 2,5 g de ácido glutámico y 18,1 g de octadecanol.



15 P.F.: 180,5°C

RMN ( $^1H$ ,  $CF_3COOD$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,8 (t, 3H,  $CH_{3(w)}$ ); 1,3 (m, 30H,  $CH_{2(v-h)}$ ); 1,7 (m, 2H,  $CH_{2(g)}$ ); 2,5 (m, 2H,  $CH_{2(c)}$ ); 2,9 (t, 2H,  $CH_{2(d)}$ ); 4,2 (t, 2H,  $CH_{2(f)}$ ); 4,5 (m, 1H,  $CH_{(b)}$ ).

20 RMN ( $^{13}C$ ,  $CF_3COOD$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,2 ( $CH_{3(w)}$ ); 21,9 ( $CH_{2(v)}$ ); 24,1 ( $CH_{2(c)}$ ); 24,9 ( $CH_{2(h)}$ ); 27,5 ( $CH_{2(g)}$ ); 28,5-29,01 ( $CH_{2(i-t)}$ ); 29,9 ( $CH_{2(d)}$ ); 31,3 ( $CH_{2(u)}$ ); 53,3 ( $CH_{(b)}$ ); 67,5 ( $CH_{2(f)}$ ); 172,4 ( $C_{(e)}$ ); 176,6 ( $C_{(a)}$ ).

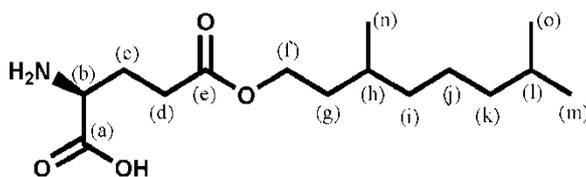
Análítica calculada para  $C_{23}H_{45}NO_4$  (399,61): teórico: C 69,13; H 11,35; N 3,51; Exp.: C 68,69; H 11,36; N 3,38

25 SM: ESI+:  $[M+H]^+$ : 400,3; ESI-:  $[M-H]^-$ : 398,3

### Ejemplo 8

#### 5-(3,7-dimetilooctil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(3,7-dimetilooctiloxi)-5-oxopentanoico

Este compuesto se aísla en forma de sólido blanco con un rendimiento del 51% según el protocolo utilizado para la preparación del 5-(n-dodecil)-L-glutamato éster con 3 g de ácido glutámico y 15,6 ml de 3,7-dimetil-1-octanol.



35 P.F.: 150,8°C

40 RMN ( $^1H$ ,  $CF_3COOD$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,95 (m, 6H,  $CH_{3(m+o)}$ ); 0,98 (m, 3H,  $CH_{3(n)}$ ); 1,3-1,4 (m, 6H,  $CH_{2(i-k)}$ ); 1,7 (m, 3H,  $CH_{2(g)}$  +  $CH_{(l)}$ ); 1,9 (m, 1H,  $CH_{(n)}$ ); 2,5 (m, 2H,  $CH_{2(c)}$ ); 2,9 (m, 2H,  $CH_{2(d)}$ ); 4,4 (t, 2H,  $CH_{2(f)}$ ); 4,6 (m, 1H,  $CH_{(b)}$ ).

45 RMN ( $^{13}C$ ,  $CF_3COOD$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 17,3 ( $CH_{3(n)}$ ); 20,5 ( $CH_{3(m)}$  +  $CH_{3(o)}$ ); 23,7 ( $CH_{2(c)}$  +  $CH_{2(j)}$ ); 27,06 ( $CH_{(l)}$ ); 29,07 ( $CH_{(h)}$ ); 29,7 ( $CH_{2(d)}$ ); 34,15 ( $CH_{2(g)}$ ); 36,16 ( $CH_{2(i)}$ ); 38,3 ( $CH_{2(k)}$ ); 53,05 ( $CH_{(b)}$ ); 65,8 ( $CH_{2(f)}$ ); 172,2 ( $C_{(e)}$ ); 176,3 ( $C_{(a)}$ ).

Análítica calculada para  $C_{15}H_{29}NO_4$  (287,4): teórico: C 62,69; H 10,17; N 4,87; Exp.: C 62,42; H 10,26; N 4,64

SM: ESI+:  $[M+H]^+$ : 288,3; ESI-:  $[M-H]^-$ : 286,3

### 50 Procedimiento 2

Síntesis que utiliza el ácido (S)-5-(benciloxi)-4-(benciloxicarbonilamino)-5-oxopentanoico como producto de partida. Las funciones protegidas por unos bencilos son entonces desprotegidas por hidrogenación catalítica.

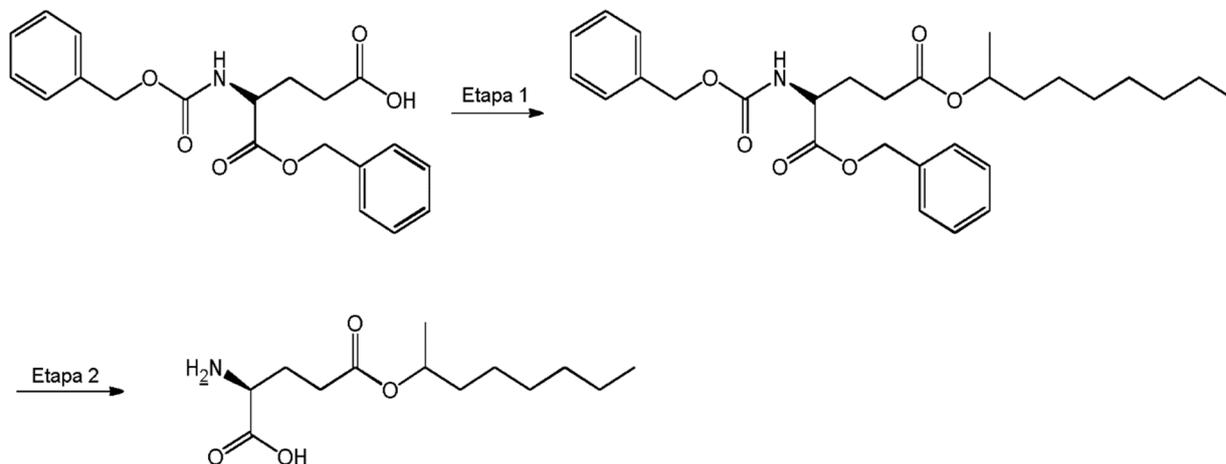
### 55 Puesta en evidencia de la actividad inmunorreguladora sobre IL2

El ensayo anteriormente descrito mostrado para este compuesto del ejemplo 8 está dotado de una actividad

significativa del -29% a 300  $\mu$ M sobre la secreción de IL2.

### Ejemplo 9

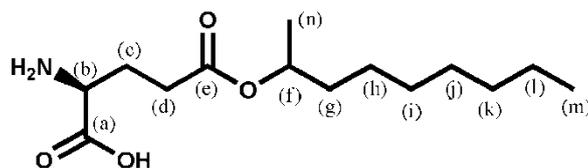
#### 5 5-(n-nonan-2-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-2-iloxi)-5-oxopentanoico



Equipamiento: matraz de un solo cuello de 250 ml provisto de una agitación magnética y colocado bajo barrido de nitrógeno

Se ponen en disolución el ácido alfa-(n-bencil)-L-glutamato-N-alfa-bencilcarbonilo (5 g, 1 eq.), 2-nonanol (2,92 g, 1,5 eq.), EDCI (2,58 g, 1 eq.), HOBT (1,82 g, 1 eq.) y DMAP (1,65 g, 1 eq.) en diclorometano (100 ml). Se agita el medio de reacción a temperatura ambiente durante la noche. El medio se lava sucesivamente con una solución de ácido clorhídrico 0,1N, una solución de hidrogenocarbonato de sodio saturada, y después una solución de cloruro de sodio saturada. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra para dar un aceite amarillo pálido que se purifica entonces por cromatografía sobre gel de sílice (gradiente heptano: acetato de etilo/100: 0 a 50:50) para dar un aceite amarillo (2,65 g, rendimiento del 40%) que se reintroducirá en la etapa 2.

El montaje se pone bajo atmósfera inerte (nitrógeno). El aceite amarillo se pone en disolución en metanol (132 ml) y se añade paladio sobre carbono (10%, 566 mg). El medio se hidrogena a temperatura ambiente durante la noche y después se filtra sobre celita. El filtrado se concentra in vacuo para conducir a un sólido blanco que se tritura en metanol (10 ml) a 0°C durante una hora. El sólido se filtra entonces sobre sínterizado, se aclara con metanol helado y se seca para dar un sólido blanco (1 g, rendimiento del 69%).



RMN ( $^1$ H,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,9 (t, 3H,  $\text{CH}_3(m)$ ); 1,3 (m, 13H,  $\text{CH}_3(n)$  +  $\text{CH}_2(h-i)$ ); 1,7 (m, 2H,  $\text{CH}_2(g)$ ); 2,5 (m, 2H,  $\text{CH}_2(c)$ ); 2,9 (t, 2H,  $\text{CH}_2(d)$ ); 4,5 (m, 1H,  $\text{CH}(f)$ ); 5,1 (m, 1H,  $\text{CH}(b)$ ).

RMN ( $^{13}$ C,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,3 ( $\text{CH}_3(m)$ ); 17,6 ( $\text{CH}_2(n)$ ); 21,7 ( $\text{CH}_2(l)$ ); 24,2 ( $\text{CH}_2(c)$ ); 24,6 ( $\text{CH}_2(h)$ ); 28,4-28,5 ( $\text{CH}_2(i-j)$ ); 30,2 ( $\text{CH}_2(d)$ ); 30,3 ( $\text{CH}_2(k)$ ); 34,9 ( $\text{CH}_2(g)$ ); 53,3 ( $\text{CH}(b)$ ); 75,8 ( $\text{CH}_2(f)$ ); 172,5 ( $\text{C}(e)$ ); 176,1 ( $\text{C}(a)$ ).

Analítica calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_4$  (273,37): teórico: C 61,51; H 9,96; N 5,12; Exp.: C 61,63; H 9,67; N 5,07

SM: ESI+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 274,3; ESI-:  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 272,2

### Ejemplo 10

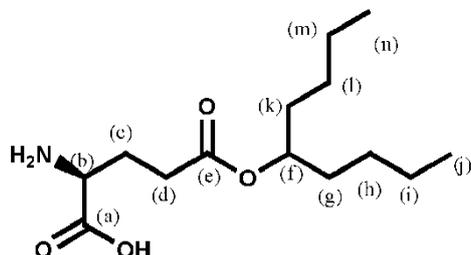
#### 5-(n-nonan-5-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-5-iloxi)-5-oxopentanoico

Este compuesto se obtiene según las mismas condiciones de realización que las utilizadas para el aislamiento del compuesto 5(n-nonan-2-il)-L-glutamato. Solo la trituración en el metanol en la última etapa no se realizó debido a la solubilidad parcial de este producto en este disolvente.

Etapa 1: 1,98 g de un aceite amarillo que cristaliza en el tiempo, rendimiento del 60%

Etapa 2: 300 mg, rendimiento del 68%

5



RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,9 (m, 6H,  $\text{CH}_3(\text{n}) + \text{CH}_3(\text{j})$ ); 1,3 (m, 8H,  $\text{CH}_2(\text{m}+\text{h}+\text{i})$ ); 1,4 (m, 4H,  $\text{CH}_2(\text{k}+\text{g})$ ); 2,1 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 2,5 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,5 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{f})$ ); 4,8 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{b})$ ).

10

RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 17,5 ( $\text{CH}_3(\text{j}) + \text{CH}_3(\text{n})$ ); 24,04 ( $\text{CH}_2(\text{l}+\text{m}+\text{h}+\text{i})$ ); 28,8 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 31,5 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 35,3 ( $\text{CH}_2(\text{g}+\text{k})$ ); 55,7 ( $\text{CH}(\text{b})$ ); 76,4 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 173,4 ( $\text{C}(\text{e})$ ); 174,6 ( $\text{C}(\text{a})$ ).

Analítica calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_4$  (273,37): teórico: C 61,51; H 9,96; N 5,12; Exp.: C 61,17; H 9,91; N 5,03

15

SM: ESI+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 274,3; ESI-:  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 272,2

### Ejemplo 11

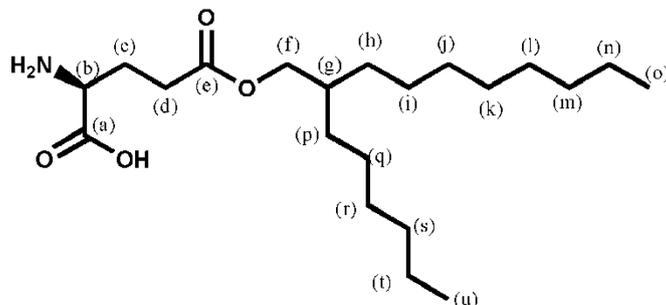
#### 5-(2-hexildecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-hexildeciloxi)-5-oxopentanoico

Este compuesto se obtiene según las mismas condiciones de realización que las utilizadas para el aislamiento del compuesto 5-(nonan-2-il)-L-glutamato. El bajo rendimiento de la última etapa se explica por una solubilidad parcial del producto en el metanol.

25

Etapa 1: 3,93 g de un sólido blanco, rendimiento del 57%

Etapa 2: 440 mg de un sólido blanco, rendimiento del 18%



30

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm): 0,9 (m, 6H,  $\text{CH}_3(\text{o}) + \text{CH}_3(\text{u})$ ); 1,3 (m, 24H,  $\text{CH}_2(\text{h}+\text{i}+\text{j}+\text{k}+\text{l}+\text{m}+\text{n}+\text{p}+\text{q}+\text{r}+\text{s}+\text{t})$ ); 1,7 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{g})$ ); 2,5 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 2,9 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,2 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 4,5 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{b})$ ).

RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm): 12,1 ( $\text{CH}_3(\text{o}) + \text{CH}_3(\text{u})$ ); 21,7 ( $\text{CH}_2(\text{n}+\text{t})$ ); 24,1 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 25,8 ( $\text{CH}_2(\text{i}+\text{q})$ ); 28,6-31,2 ( $\text{CH}_2(\text{d}+\text{j}+\text{k}+\text{r}+\text{h}+\text{p}+\text{m}+\text{l}+\text{s})$ ); 36,7 ( $\text{CH}(\text{g})$ ); 53,3 ( $\text{CH}(\text{b})$ ); 70,3 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 172,4 ( $\text{C}(\text{e})$ ); 176,6 ( $\text{C}(\text{a})$ ).

Analítica calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_4$  (371,3): teórico: C 67,88; H 11,12; N 3,77; Exp.: C 67,78; H 11,08; N 3,76

SM: ESI+:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 372,3; ESI-:  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 370,3

### Ejemplo 12

#### 5-(2-etilhexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-etilhexiloxi)-5-oxopentanoico

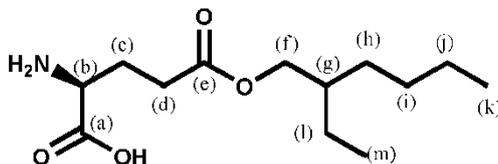
45

Este compuesto se obtiene según las mismas condiciones de realización que las utilizadas para el aislamiento del compuesto 5-(nonan-2-il)-L-glutamato. En el tratamiento de la etapa 2 interviene una variante. En efecto, después de la filtración sobre celita, el filtrado se concentra hasta aproximadamente 50 ml. Se añade éter diisopropílico (200 ml) y la mezcla formada se coloca a  $-18^\circ\text{C}$  durante una noche. La suspensión así obtenida se

filtra y el sólido blanco se seca al vacío.

Etapa 1: 4,22 g de un aceite incoloro, rendimiento del 65%

5 Etapa 2: 1,5 g de un sólido blanco, rendimiento del 70%



P.F.: 157,9°C

10 RMN (<sup>1</sup>H, CF<sub>3</sub>COOD, 300 MHz): δ (ppm): 0,9 (m, 6H, CH<sub>3</sub>(k) + CH<sub>3</sub>(m)); 1,4 (m, 8H, CH<sub>2</sub>(h+i+j+l)); 1,7 (m, 1H, CH<sub>g</sub>); 2,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(c)); 2,9 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(d)); 4,2 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(f)); 4,5 (m, 1H, CH<sub>(b)</sub>).

15 RMN (<sup>13</sup>C, CF<sub>3</sub>COOD, 75 MHz): δ (ppm): 8,9 (CH<sub>3</sub>(m)); 11,9 (CH<sub>3</sub>(k)); 22,0 (CH<sub>2</sub>(j)); 22,8 (CH<sub>2</sub>(l)); 24,2 (CH<sub>2</sub>(c)); 28,2 (CH<sub>2</sub>(i)), 29,5 (CH<sub>2</sub>(h)); 29,9 (CH<sub>2</sub>(d)); 38,3 (CH<sub>g</sub>); 53,3 (CH<sub>(b)</sub>); 69,9 (CH<sub>2</sub>(f)); 172,5 (C<sub>(e)</sub>); 176,6 (C<sub>(a)</sub>).

Análítica calculada para C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (259,2): teórico: C 60,21; H 9,72; N 5,40; Exp.: C 60,08; H 9,59; N 5,45

SM: ESI+: [M+H]<sup>+</sup>: 260,2; ESI-: [M-H]<sup>-</sup>: 258,1

20 Evaluación sobre modelo de queratinocitos del compuesto según el ejemplo 12:

25 Puesta en evidencia de la actividad anti-inflamatoria sobre los queratinocitos que expresan un fenotipo de dermatitis atópica (DA): Estudio de las citoquinas y quimioquinas sobreexpresadas en la patología de la dermatitis atópica.

30 Los queratinocitos primarios (NHEK, Normal Human Epidermal Keratinocytes) distribuidos en placa de 24 pocillos se preincubaban durante 1 hora con los principios activos y después se estimulan durante 24 horas con un cóctel de 4 agonistas que permite crear *in vitro* el entorno fisiopatológico de la dermatitis atópica: 100 ng/ml IL4 + 100 ng/ml IL13 + 1 µg/ml Poly I:C + 5 µg/ml Pam3CSK4: este modelo permite inducir la inflamación mediada por las citoquinas Th2 sobreexpresadas en la DA (IL4, IL13) y por los componentes bacterianos (mimetizada por Pam3CSK4, ligando TLR-2) y viral (mimetizada por Poly I:C, ligante TLR-3) de la DA. El análisis de la expresión génica de los marcadores de la DA se realiza en PCR-Array 48 genes y se repite sobre 3 donantes diferentes de NHEK.

35 La modulación de la respuesta inflamatoria observada se ilustra mediante la tabla adjunta, en la que:

40 Para el conjunto de los marcadores, la CR (Cantidad Relativa) inferior a 0,5, a 5 h o 24 h, indica una inhibición significativa:

- inhibición del marcador TSLP implicado en la polarización linfocitaria Th2 y específica de la DA;
- inhibición de las citoquinas inflamatorias IL1A, IL8, CSF2, IFNB1, VEGF;
- 45 → inhibición de las quimioquinas CCL, CXCL, implicadas en el reclutamiento, la infiltración cutánea y la activación de las células inflamatorias (leucocitos, linfocitos, linfocitos Th1 y Th2, monocitos).

50 Los resultados obtenidos de la demostración de la actividad anti-inflamatoria del ejemplo 12 frente a la expresión génica de los marcadores inflamatorios de la DA, citoquinas y quimioquinas se dan en la tabla siguiente:

Queratinocitos NHEK: marcadores de la inflamación inducidos por 100 ng/ml IL4 + 100 ng/ml IL13 + 1 µg/ml Poly I:C + 5 µg/ml Pam3CSK4	Actividad a 24h del compuesto según ej. 12		
		100 µM	300 µM
<i>Citoquinas</i>			
Interleucina 1, alfa	IL1A	0,53	0,53
Interleucina 8	IL8	0,29	0,18
Linfopoyetina estromal tímica	TSLP	0,20	0,54
GMCSF, factor 2 estimulante de colonias de granulocitos y monocitos	CSF2	1,55	0,33
Interferón beta 1	IFNB1	0,19	0,26
Factor de crecimiento endotelial vascular C	VEGFC	0,20	0,50

Queratinocitos NHEK: marcadores de la inflamación inducidos por 100 ng/ml IL4 + 100 ng/ml IL13 + 1 µg/ml Poly I:C + 5 µg/ml Pam3CSK4		Actividad a 24h del compuesto según ej. 12	
		100 µM	300 µM
<i>Quimioquinas</i>			
MCP-1, Proteína quimioatrayente de monocitos 1	CCL2	0,48	nd
MIP-1α, Proteína inflamatoria del macrófago 1-alfa	CCL3	0,51	0,06
MIP-1β, Proteína inflamatoria del macrófago 1-beta	CCL4	0,14	0,02
RANTES, Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T	CCL5	0,42	0,20
MIP-3α, Proteína inflamatoria del macrófago 3-alfa	CCL20	0,13	0,13
GRO-α, Actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa	CXCL1	0,33	0,36
MIP-2α, Proteína inflamatoria del macrófago 2-alpha	CXCL2	0,06	0,32
CXCL9, Monocina inducida por interferón gamma	CXCL9	0,20	0,29
IP-10, Proteína inducida por interferón gamma 10 kDa	CXCL10	0,18	0,06
I-TAC, Interferón inducible de células T alfa quimioatrayente	CXCL11	0,14	0,15
Actividades expresadas CR (Cantidad Relativa) con respecto al control estimulado 100 ng/ml IL4+100 ng/ml IL13 + 1 µg/ml Poly I:C + 5 µg/ml Pam3CSK4/RQ<0,5 = inhibición del marcador de la inflamación			

Ejemplo de formulación de un principio activo según la presente invención

5 La formulación se ha desarrollado específicamente para este tipo de compuesto de fórmula I, en particular en los que el radical R es un alquilo lineal o ramificado de 5 à 25 átomos de carbono, que presentan generalmente una muy baja hidrosolubilidad.

10 La formulación siguiente corresponde al compuesto del ejemplo 12, pero se puede generalizar perfectamente a los otros compuestos de fórmula I con una sustitución de alquilo de C<sub>5</sub> a C<sub>25</sub>:

Compuesto en ej. 12	1,0
Ciclometicona	3,5
Emoliente MYRITOL 318	3,5
Emoliente CETIOL HE	3,5
Gelificante SEPIPLUS400	3,0
Propilenglicol	9,0
Fenoxietanol	0,2
Agua purificada	csp 100 ml

La formulación anterior se ha preparado de la siguiente manera:

15 Fase A: Calentar la mezcla agua y fenoxietanol a 75°C. Mantener el calentamiento y añadir el gelificante bajo fuerte agitación.

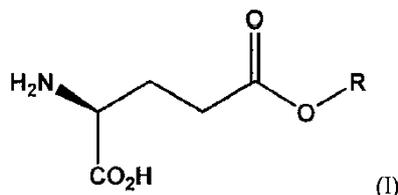
Fase B: Mezclar los emolientes y la silicona y calentar esta mezcla a 75°C.

20 Fase C: Mezclar el propilenglicol y el compuesto según el ejemplo 12: calentar esta mezcla a 80°C durante 30 minutos.

Emulsionar B en A y después añadir la fase C.

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos derivados del L-glutamato de fórmula general I siguiente:



5

en la que el radical R representa un grupo alquilo lineal o ramificado de C<sub>5</sub> a C<sub>25</sub> para su utilización tópica como principio activo dermatológico destinado al tratamiento y/o a la prevención de las dermatosis inflamatorias.

10 2. Compuestos para su uso según la reivindicación 1, caracterizados por que el radical R es un grupo alquilo lineal o ramificado de C<sub>5</sub> a C<sub>14</sub>.

3. Compuesto de fórmula general (I) para su uso según la reivindicación 1, caracterizado por que se selecciona de entre uno de los compuestos siguientes:

15

- 5-(n-pentil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5-(pentiloxi)pentanoico
- 5-(n-hexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexiloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-nonil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(noniloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-dodecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(dodeciloxi)-5-oxopentanoico
- 20 - 5-(n-tetradecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-oxo-5-(tetradecil)pentanoico
- 5-(n-hexadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(hexadeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(n-octadecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5-(octadeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(3,7-dimetilooctil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(3,7-dimetilooctiloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(nonan-2-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-2-iloxi)-5-oxopentanoico
- 25 - 5-(nonan-5-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-5-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(2-hexildecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-hexildeciloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(2-etilhexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-etilhexiloxi)-5-oxopentanoico.

25

30 4. Compuesto de fórmula general (I) para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la dermatosis inflamatoria consiste en una dermatitis atópica, un eczema de contacto, un acné, una dermatitis seborreica, una rosácea o una psoriasis.

5. Composición tópica, caracterizada por que comprende, a título de principio activo, un compuesto de fórmula I tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3, en asociación con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su utilización tópica como medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de dermatosis inflamatorias.

35

6. Compuestos derivados del ácido L-glutámico de fórmula general (I) caracterizado por que se selecciona de entre:

40

- 5-(3,7-dimetilooctil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(3,7-dimetilooctiloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(nonan-2-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-2-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(nonan-5-il)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(nonan-5-iloxi)-5-oxopentanoico
- 5-(2-hexildecil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-hexildeciloxi)-5-oxopentanoico
- 45 - 5-(2-etilhexil)-L-glutamato o ácido 2-amino-5(2-etilhexiloxi)-5-oxopentanoico.

45

7. Procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula I definidos en la reivindicación 6, caracterizado por que se hace reaccionar el ácido alfa-(n-bencil)-L-glutamato-N-alfa-bencilcarbonilo con un alcohol de fórmula R-OH en la que R tiene el significado correspondiente dado en la reivindicación 1, y por que el producto obtenido está desprotegido por hidrogenación catalítica.

50

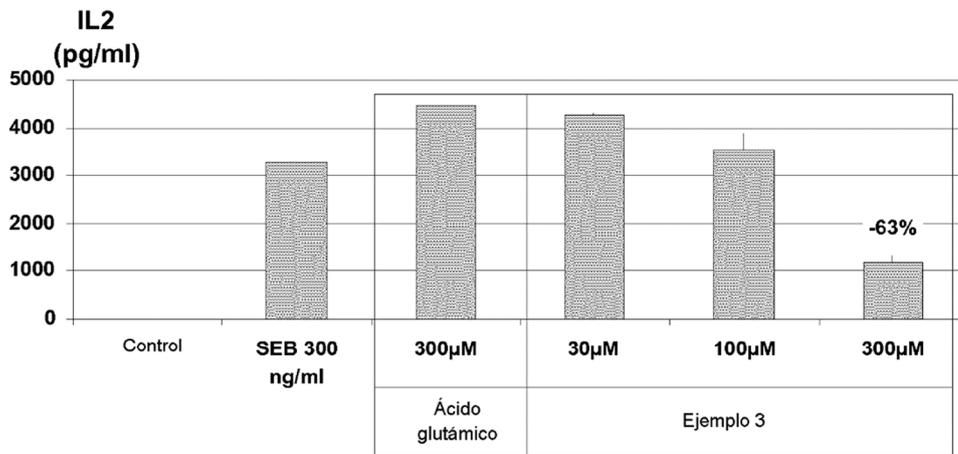


Figura 1a

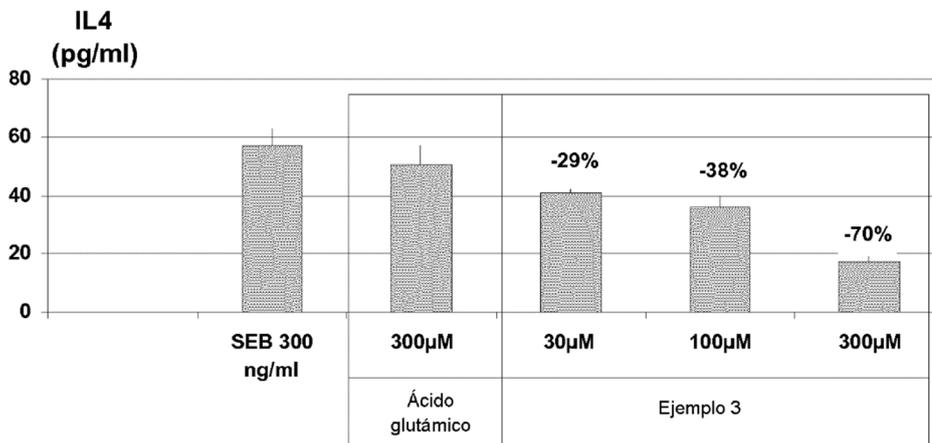


Figura 1b

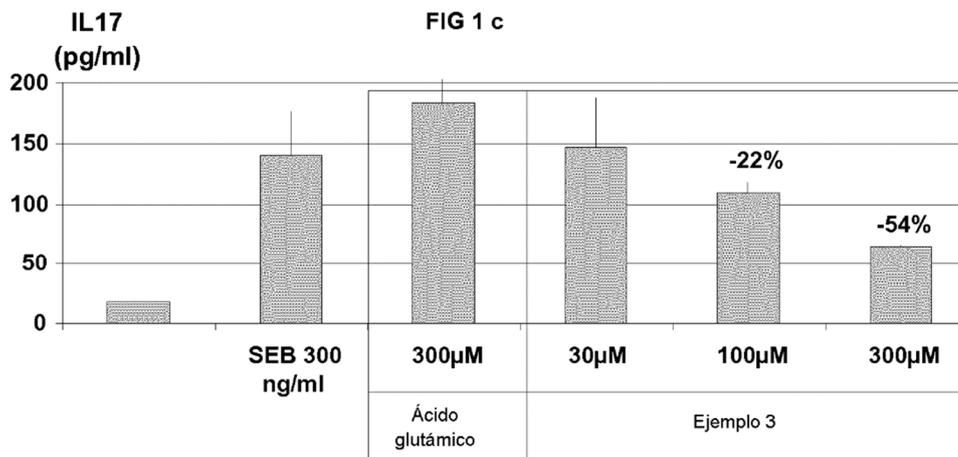


Figura 1c

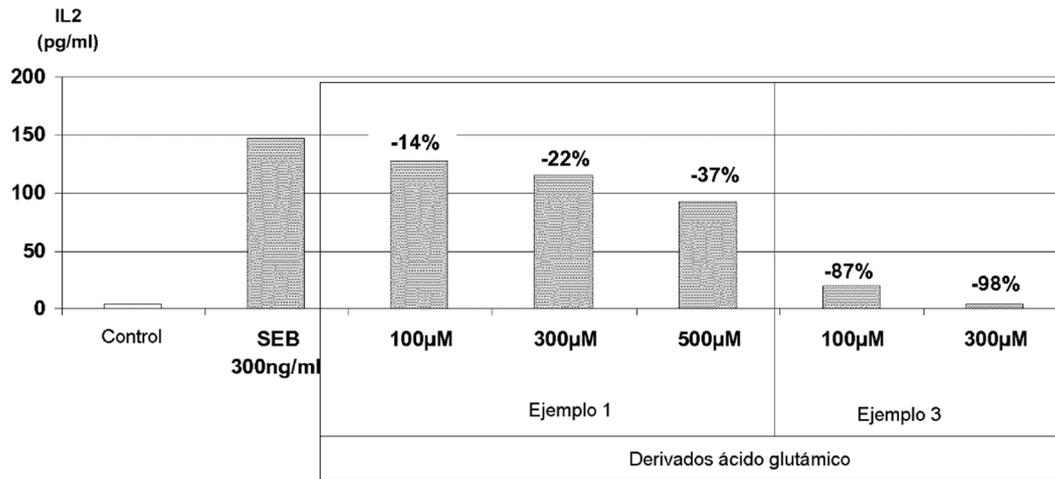


Figura 2a

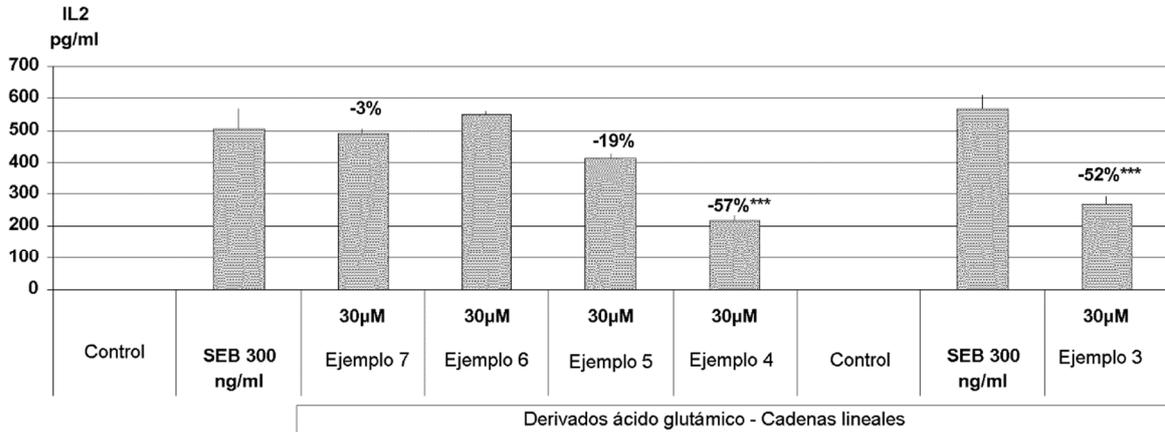


Figura 2b

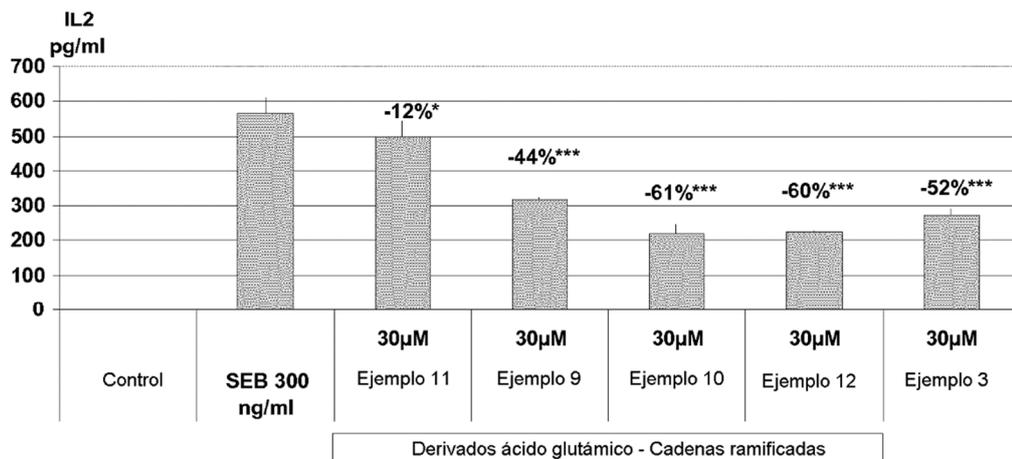


Figura 2c

Linfocitos CD4 <sup>+</sup> : citoquinas inducidas por 300 ng/ml SEB (24h)		% de actividad del ejemplo 12 sobre la producción de citoquinas			
		Concentraciones evaluadas			
		10µM	30µM	100µM	300µM
Respuesta Th1	IL2	-16	-29	-34	-43
	IL6	-12	-34	-37	-44
	IL12	22	-3	24	52
	IFNα	-16	-34	-57	-77
	IL1α	-43	-55	-66	-80
	TNFα	-23	-31	-17	-18
Respuesta Th2	IL4	-22	-40	-54	-69
	IL5	-44	-68	-68	-77
	IL10	-16	-33	-62	-87
	IL13	-62	-75	-78	-84
Respuesta Th17	IL17	-72	-74	-79	-86

Figura 3

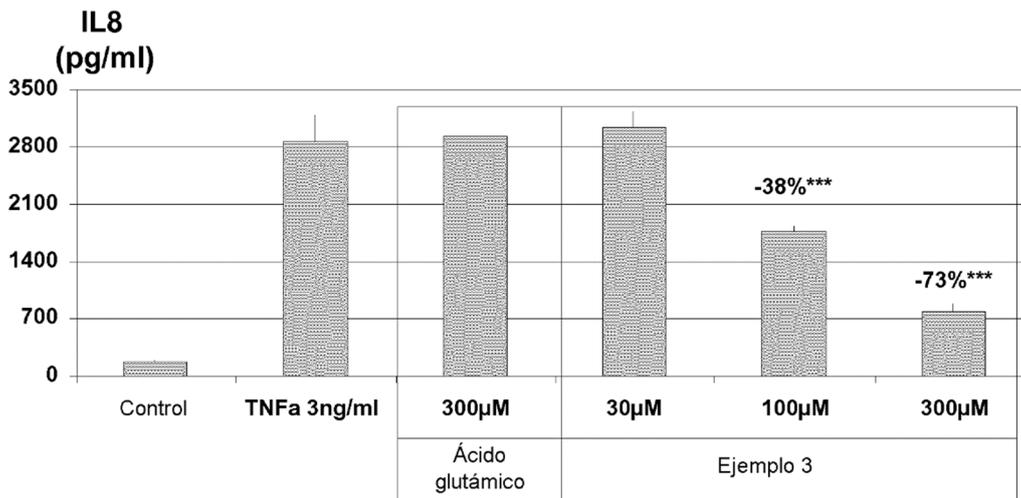


Figura 4