



PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

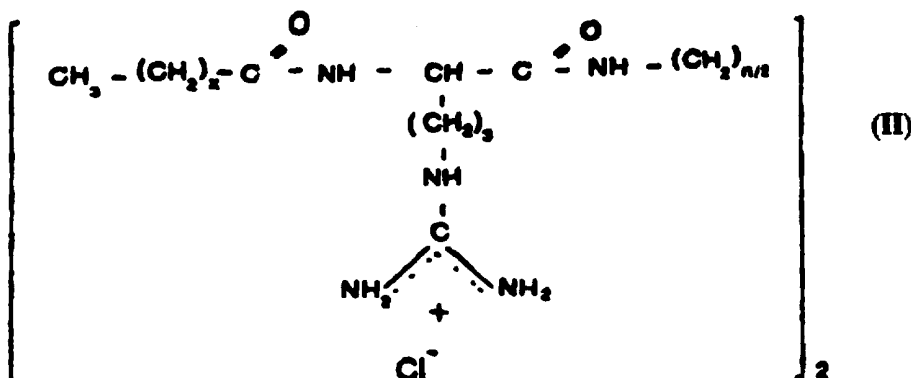
<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07C 279/14, C11D 1/50, A01N 47/44, A61K 31/155</p>	<p align="center">A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 96/24578 (43) Fecha de publicación internacional: 15 de Agosto de 1996 (15.08.96)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00026 (22) Fecha de la presentación internacional: 8 de Febrero de 1996 (08.02.96) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9500265 9 de Febrero de 1995 ES (09.02.95) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFI- CAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 17, E-28006 Madrid (ES). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): INFANTE MARTINEZ- PARDO, M^a Rosa [ES/ES]; Consejo Superior Investiga- ciones Científicas, Centro Investigación y Desarrollo, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). PEREZ MUÑOZ, Lourdes [ES/ES]; Consejo Superior Investiga- ciones Científicas, Centro Investigación y Desarrollo, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). (74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).</p>		<p>(81) Estados designados: CA, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modifi- cación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p>

(54) Title: GEMINAL CATIONIC SURFACTANTS OF THE TYPE $N_{\alpha}N_{\omega}$ BIS(N_{α} -ACYL-ARGININ) $_{\alpha,\omega}$ DIAMINO ALKYL DICHLOROHYDRATES AS ANTIMICROBIAL AGENTS

(54) Título: TENSOACTIVOS CATIONICOS GEMINALES DEL TIPO $N_{\alpha}N_{\omega}$ BIS(N_{α} -ACIL-ARGININA) $_{\alpha,\omega}$ DIAMINO ALQUIL DICLORHIDRATOS COME AGENTES ANTIMICROBIANOS

(57) Abstract

Surfactants having general formula (II) wherein $x = 8-14$; $n = 2-8$. The process for obtaining such surfactants comprises the following steps: a) producing nitroarginin; b) producing N_{α} -acil-nitroarginin; c) producing N_{α},N_{ω} -bis(N_{α} -acil-arginin- $_{\alpha,\omega}$ diaminoalkylamide dichlorohydrate. Said surfactants are antimicrobial agents which can be applied to cosmetics, pharmacy and food industry.



(57) Resumen

Tensioactivos de fórmula general (II): $x = 8-14$; $n = 2-8$. Su procedimiento de obtención sigue las etapas siguientes: a) formación de nitroarginina; b) formación de N_{α} -acil-nitroarginina; c) formación de N_{α},N_{ω} -bis(N_{α} -acil-arginina) $_{\alpha,\omega}$ diaminoalquilamida diclorhidrato. Son tensioactivos con aplicación antimicrobiana: cosmética, farmacia, alimentación.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumanía
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajistán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

1

Tensioactivos catiónicos geminales del tipo N^oN^o bis (N^o-acil-Arginina) α,ω diamino alquil diclorhidratos como agentes antimicrobianos**INTRODUCCION**

5

Como es bien conocido los tensioactivos son moléculas orgánicas que contienen dos grupos funcionales con características opuestas. Un tensioactivo convencional contiene un grupo hidrófilo (soluble en agua) y un grupo hidrófobo (insoluble en agua) ambos en la misma molécula. A esta estructura se la conoce
10 como estructura anfifílica.

Aunque actualmente se puede considerar que la industria dispone de los tensioactivos adecuados, las exigencias de orden ecológico obligan hoy día a la investigación y desarrollo de nuevas alternativas que protejan y mejoren el medio
15 ambiente y la calidad de vida.

Numerosas modificaciones estructurales se han llevado a cabo para mejorar la biocompatibilidad de estos compuestos bien partiendo de materias primas naturales tales como aminoácidos y/o azúcares, bien incrementando la interacción
20 hidrofóbica de estos compuestos en un esfuerzo para potenciar su actividad superficial y por tanto su eficacia.

Entre las numerosas modificaciones estructurales descritas en la literatura merecen nuestra atención, aquellas que dan lugar a los tensioactivos diméricos o
25 geminales caracterizados por contener en la misma molécula dos o más cadenas hidrofóbicas junto a sendos grupos iónicos. Está descrito que tales estructuras refuerzan las interacciones hidrofobas intra e intermoleculares resultando en consecuencia distintos tensioactivos altamente eficaces y en algunos casos con excelentes propiedades de solubilidad acuosa.

30

Estos materiales han demostrado tener imprevisibles propiedades físico-químicas (i.e. CMCs extremadamente bajas y gran efectividad de adsorción en las

superficies) lo cual contribuye en consecuencia a optimizar los aspectos medioambientales de los tensioactivos.

Entre los tensioactivos geminales iónicos, destacan las sales bicatiónicas de amonio cuaternario, también conocidas como bis-QUATS, por sus excelentes propiedades antimicrobianas incluso frente a bacterias Gram negativas, si se comparan con los clásicos mono-QUATS. Sin embargo, por ser sales de amonio cuaternario se sabe que son resistentes a la biodegradación y por tanto su aceptabilidad ecológica está cuestionada.

10

La presente invención pretende superar este aspecto dimerizando tensioactivos catiónicos ecológicamente aceptables, tales como los derivados monocatenarios de la N^o-acil-arginina. La nueva estructura presentará la doble ventaja de ser eficaz superficialmente (por su estructura geminal) y biodegradable (por ser derivado de aminoácido).

15

ESTADO DE LA TECNICA

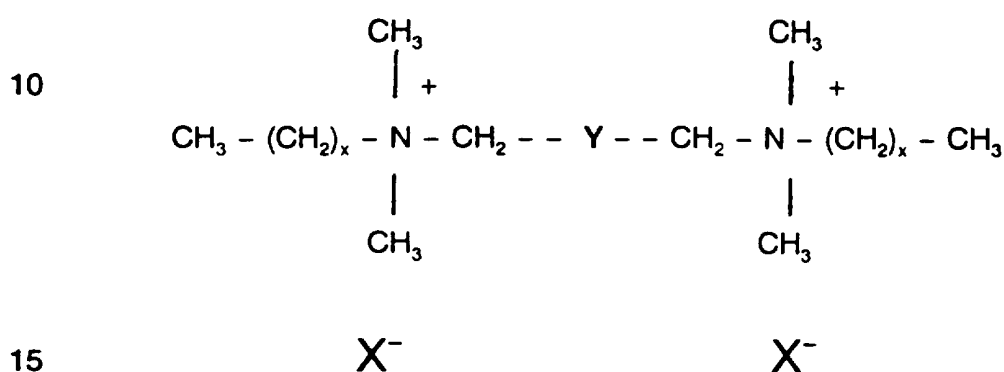
Aunque en la bibliografía se hallan descritos una gran variedad de tensioactivos antimicrobianos con estructuras geminales bicatiónicas, los compuestos objeto de la presente patente son una novedad y no aparece descrita ninguna referencia similar en la misma. La novedad de la presente invención resulta de la combinación en una misma molécula de dos residuos de N^o-acil-arginina en una estructura geminal mimética a los bis-QUATS.

25

La síntesis y desarrollo de los derivados monocatenarios de N^o-acilarginina ha sido llevada a cabo por nuestro equipo tras muchos años de estudio lo cual ha dado lugar a un gran número de resultados y publicaciones (Patente española 512.643; M.R. Infante, J. Molinero and P. Erra, JAOCS, Vol.69, no 7, 1992; J. Molinero, M.R. Julia, P. Erra, M. Robert and M.R. Infante, JAOCS, Vol 65, no 6, 1988; C. Solans, M.A. Pés, N. Azemar and M.R. Infante, Progr. Colloid Polym Sci 81,pp 144-150,1990)

30

Por otra parte, desde los años 50 se conocen numerosas estructuras bifuncionales del tipo bis-QUATS ((a)C.A.Bunton, L. Robinson, J.Schaak and M.F. Stam, J. Org. Chem., 1971, 36, 2346; (b) R. Zana, M. Benrraou and R. Rueff, Langmuir, 1991, 7,1072; (c) F. Devinski, 1. Lacko and T. Imam, J. Colloid Interface Sci., 1991, 143, 336; (d) R. Zana and Y. Talmon, Nature, 1993, 362, 228; (f) H.C. Parreira, E.R. Lukenbach and M.K. Lindemann, J. Am. Oil Chem. SOC., 1979, 56, 1015) cuya fórmula podría esquematizarse según I.



Donde x: 0-17
y: (CH₂)_n, NCH₃, O, S
20 X: Br, Cl ...

Estos compuestos contienen por molécula dos cadenas hidrofóbicas, dos grupos de amonio cuaternario y una cadena espaciadora, Y, de naturaleza alquílica o eteroatómica .

25

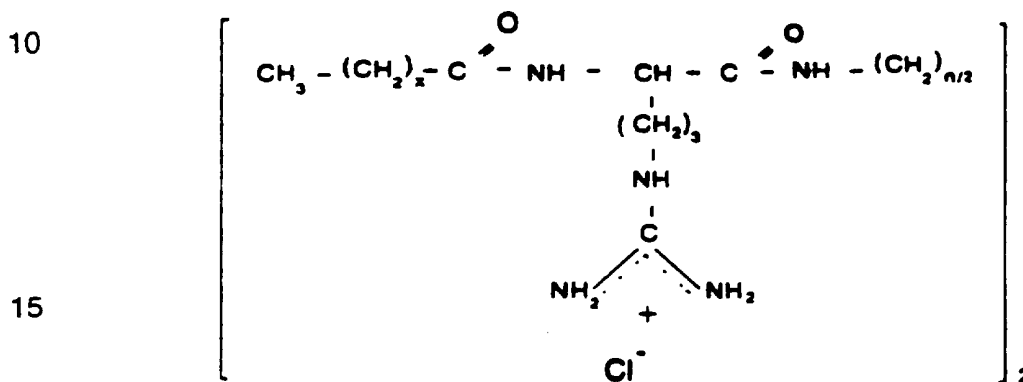
El creciente interés por estos agentes tensioactivos bifuncionales es consecuencia de sus inusuales propiedades físico-químicas (alta efectividad de adsorción, un rico polimorfismo básico y una gran capacidad de autoagregarse) lo que da lugar a sus interesantes aplicaciones en investigaciones biológicas. ((a) J.H. Fuhrhop and U. Liman, J. Am. Chem. Soc., 1984,106, 4643; (b) C. Tanford, The Hydrophobic Effect, Wiley, NY, 1980; (C) M. Lissel, D. Feldman, M. Nir and M. Rabinovitz, Tetrahedron Lett., 1989, 30,1683). En este sentido nuestro grupo ha

patentado recientemente unos nuevos tensioactivos bis-QUATS caracterizados por tener en la cadena espaciadora un puente disulfuro, (Patente española 9200443), para ser aplicados fundamentalmente sobre sustratos queratínicos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere particularmente a una nueva familia de tensioactivos diméricos derivados de arginina de naturaleza catiónica, cuya fórmula estructural se indica en II.



$x = 8-14; n = 2-8.$

20 Estos compuestos reúnen simultáneamente en la misma molécula dos residuos de N^o-acil-arginina unidos a través de una cadena espaciadora alquílica. Se han diseñado de tal manera que la longitud de la cadena espaciadora contribuirá a reforzar las interacciones hidrofóbicas inter o intramoleculares dando lugar en consecuencia a un diferente comportamiento en las propiedades de adsorción y

25 agregación molecular y adicionalmente, por ser catiónicos, a un diferente comportamiento antimicrobiano

Estructuralmente son compuestos simétricos y contienen en la misma molécula dos cadenas hidrocarbonadas saturadas o insaturadas de 6 a 20 átomos

30 de carbono como parte hidrófoba, unidas a sendos restos del aminoácido arginina

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

5

los cuales están unidos entre sí a través de una cadena espaciadora del tipo alquildiamino. El residuo de N^oacil arginina actúa de fuente tanto de la parte hidrofoba como del grupo catiónico. Cada uno de los grupos funcionales que constituyen la molécula (ácido graso, aminoácido, alquildiamina) están unidos entre sí a través de enlaces amida lo cual garantiza la estabilidad de la molécula a valores de pH: 3-9 al mismo tiempo que la molécula es más biodegradable si se compara con los bisQUATS ya conocidos. Los productos de hidrólisis que cabe esperar son ácido graso, arginina y una diamina ninguno de los cuales es peligroso tanto desde el punto de vista biológico como ecológico.

10

La síntesis de estos compuestos ha tenido lugar en cuatro fases:

- a) Formación de nitroarginina, utilizando como aminoácido de partida Larg, D-arg ó DL-arg y como protector del grupo guanidino de la arginina el grupo nitro.
- b) Formación de N^o-acil-nitroarginina a partir de la nitroarginina y ácido graso, utilizando cloruros de ácido grasos lineales, de 8 a 18 átomos como acilantes de la nitroarginina en un medio hidroalcohólico.
- c) Formación de N^o,N^o,bis(N^o-acil-nitroarginina) α,ω diaminoalquilamida a partir de N^o-acil-nitroarginina y diaminoalquilo, utilizando agentes de condensación, tales como BOP (hexafluorofosfato del benzotriazo N-oxi-tris-dimetilamino-fosfoni) ó DCCD (dicicloxilcarbodimida). d) Formación de N^o,N^o,bis(N^o-acil-arginina) α,ω diaminoalquilamida diclorhidrato mediante una hidrogenación catalítica, en PD/C (paladio/carbono) y metanol-ácido fórmico en una proporción entre el 30-50% de ácido fórmico, de N^o,N^o,bis(N^o-acilnitroarginina) α,ω diaminoalquil.

La presente invención se refiere a unos nuevos compuestos tensioactivos bicatiónicos geminales derivados del aminoácido arginina específicamente diseñados para que actúen como eficaces agentes de superficie y en consecuencia como potentes agentes antimicrobianos. Las variaciones de actividad serán función

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

6

de la longitud de la cadena grasa, así como de la longitud de la cadena espaciadora.

La invención se refiere a unas moléculas cuyas características estructurales
5 son

Poseer en la misma molécula dos cadenas hidrocarbonadas grasas, dos grupos catiónicos del tipo guanidina proporcionados por los dos residuos laterales del aminoácido arginina y una cadena espaciadora de tipo alquílica de diferente
10 longitud. Estas moléculas por ser geminales mostrarán una fuerte sinergia en su interacción hidrofóbica, por ser catiónicas tendrán una específica sustantividad por los microorganismos actuando como efectivos agentes antimicrobianos y por ser derivados de la N^o-acil-arginina serán compuestos biodegradables y compatibles con el medio ambiente.

15

Los compuestos se han preparado con una pureza del 99% utilizando para ello una ruta sintética abordada sistemáticamente a partir de materias primas e intermedios de coste no competitivo.

20

La preparación de los productos finales ha tenido lugar en cuatro fases tal como se indica en el esquema general 1.

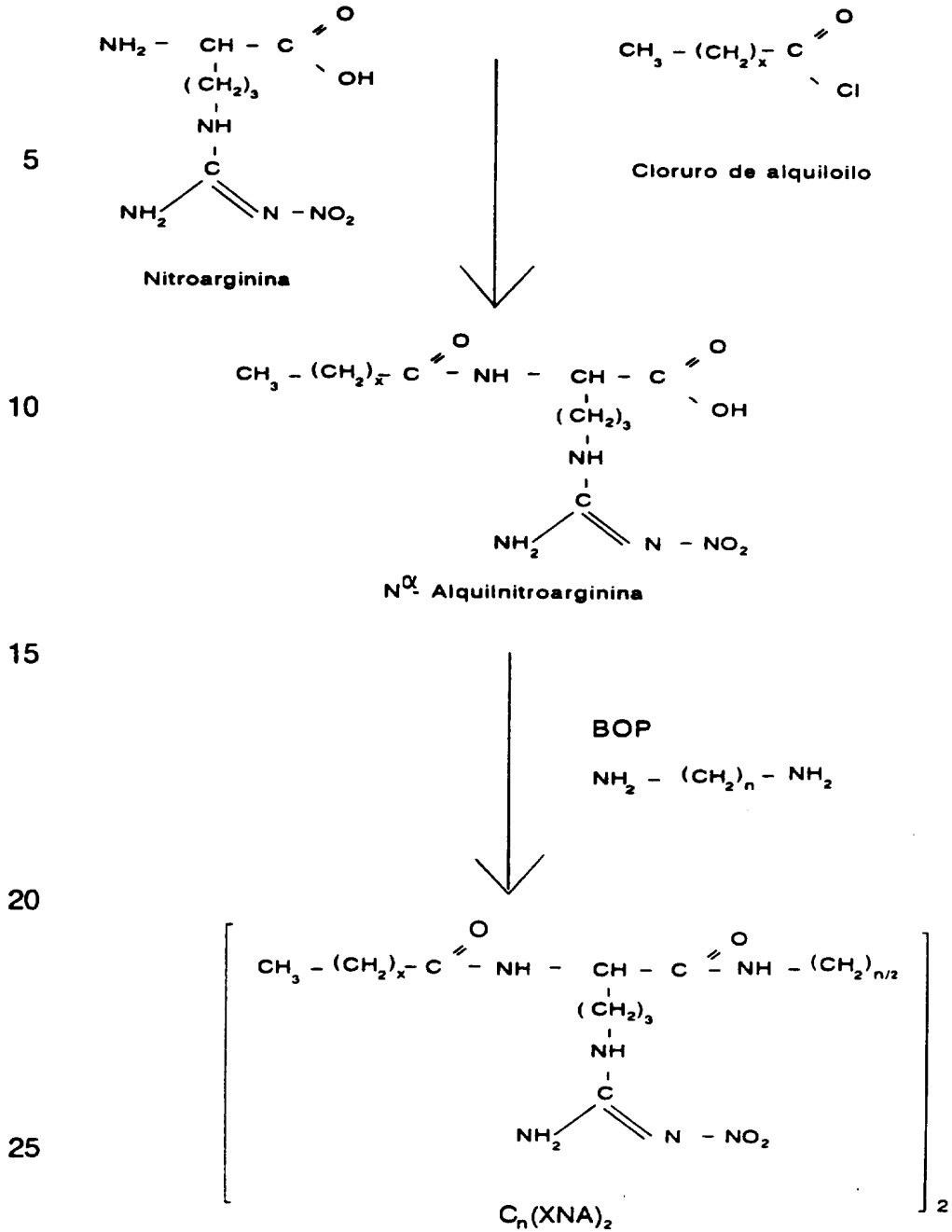
25

30

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

7

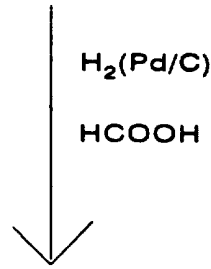


WO 96/24578

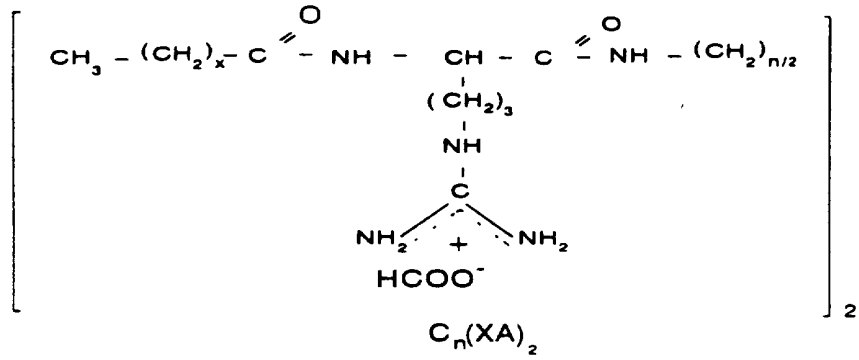
PCT/ES96/00026

8

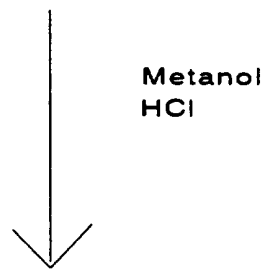
5



10

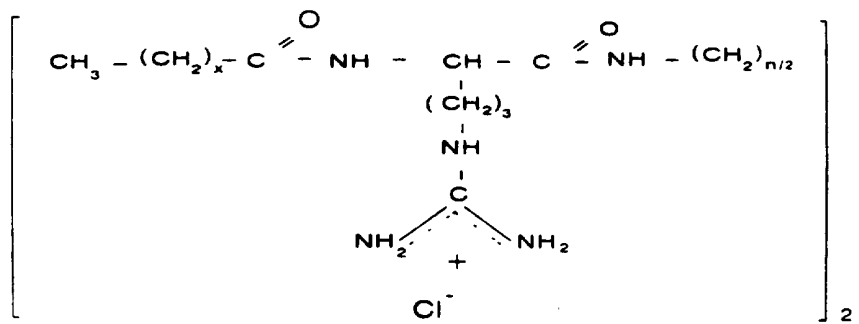


15



20

25



30

Donde x: 8-14
 n: 2-8

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

9

La preparación de la N^o-acil-nitroarginina tiene lugar en las dos primeras etapas mediante procedimientos ya conocidos. El compuesto que se forma mediante la condensación simultánea de la diamina alquílica con dos moléculas de la N^o-acil-nitroarginina es novedad aunque tiene lugar utilizando el clásico agente
5 de condensación BOP.

La obtención de los productos finales se consigue en la última etapa por hidrogenación catalítica en Pd/C y fórmico.

10 Todas estas reacciones transcurren a temperaturas bajas y empleando disolventes tales como: H₂O, EtOH, Cl₂CH, y fórmico/MeOH.

En estas condiciones los productos son aislados sin dificultad manteniéndose estables a lo largo de todo el proceso.

15

La purificación de los productos intermedios y finales se lleva a cabo por extracciones líquido/líquido, líquido/sólido, cristalización y HPLC preparativa.

Los compuestos sintetizados son tensioactivos catiónicos antimicrobianos
20 de elevada pureza, solubles en agua y estables en medio acuoso a valores de pH entre 3 y 9 y a temperaturas hasta 70°C. Su aspecto es el de sólidos blancos muy higroscópicos.

En relación a sus correspondientes monómeros (Patente n° 512.643) los
25 compuestos de la presente invención presentan una elevada eficacia para adsorberse en las superficies acuosas, una gran facilidad para formar micelas y muestran una sustancial mejora en la actividad antimicrobiana, en especial frente a bacterias Gram positivas.

30

Síntesis

Los compuestos se preparan como se ha mencionado anteriormente en cuatro etapas:

- 5 a) se lleva a cabo mediante la siguiente reacción: se disuelven hidrocloreto de L-arginina en ácido sulfúrico concentrado, en la proporción de 50% en volumen, eliminando al vacío el ácido clorhídrico formado; a esta disolución se le añade una cantidad de nitrato amónico pulverizado y se deja reaccionar el menos durante 15 minutos a temperatura ambiente y tras eliminar el gas formado se vierte la mezcla sobre hielo picado y se enfría a 10 0°C; la solución se lleva a pH 6.8 por adición de amoníaco concentrado y se mantiene la temperatura de 0°C hasta precipitación total del producto, alrededor de 48 horas; el precipitado así formado se filtra y se cristaliza con agua caliente.
- 15 b) se prepara una disolución en el rango 0,10–0,30 molar de nitroarginina y Na(OH) en una disolución acuosa del 20 al 30% acetona; a continuación se añade lentamente una cantidad equimolecular de cloruro de ácido graso, manteniendo el pH entre 11 y 13 mediante la adición de Na(OH). La mezcla se mantiene agitando durante varias horas y se añade HCl hasta pH ácido, apareciendo un precipitado blanco que se filtra, se lava con agua y eter y 20 finalmente, se cristaliza en etanol–eter.
- 25 c) se prepara una disolución 0,30–0,50 Molar de N^o-acil-nitroarginina y exceso de base orgánica terciaria (triethylamina ó N-metil morfolina) en cloroformo o bien dimetilformamida. A esta mezcla se le añade el agente condensante BOP en una concentración entre 0,30–0,50 molar y la alquildiamina en una concentración entre 0,15 y 0,25 molar. La mezcla de la reacción se mantiene en agitación entre 15–30 horas a una temperatura entre 10 y 25°C, posteriormente se añade eter apareciendo un precipitado que se lava varias veces con éter.
- 30 d) se realiza mediante la desprotección del grupo nitro para la consecución de los dímeros N^o-acil-arginina por una hidrogenación catalítica en un medio que contiene PD/C y metanol-ácido fórmico en una proporción entre

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

11

el 30–50% en ácido fórmico a una presión de al menos 50 atm, temperatura ambiente y en un tiempo máximo de 24 horas.

Ejemplo:

5

Síntesis del N^o,N^o,bis(N^o-decanoilarginina) α,ω diaminobutilamida [C₄ (KA)₂]

Cantidades equimoleculares de nitroarginina (0.0685m) y Na(OH) se disuelven en 290 ml de una disolución acuosa de acetona 34% (v/v). A
10 continuación se añade el mismo número de moles de cloruro de decaloilo (0.0685), gota a gota y muy lentamente controlando que el pH se mantenga entre 11 y 13 mediante la adición de Na(OH). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante dos horas, transcurrido este tiempo se añade HCl hasta pH=1 y aparece un precipitado blanco. Se filtra este sólido y se lava con agua hasta pH neutro,
15 posteriormente se lava con eter y se cristaliza en etanol-eter, obteniendo el NaDecanoilnitroarginina puro.

A continuación 0.021 moles de Na-Decanoilnitroarginina se disuelven en 50 ml de cloroformo y 0.050 moles de trietilamina. A esta disolución se le añade 0.010
20 moles de Butildiamina y 0.021 moles de BOP (hexafluorofosfato del benzotriazol-N--oxo-tris (dimetilamino)fosfonio). La mezcla de reacción así obtenida se mantiene en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente se añade eter a esta mezcla y aparece un precipitado amarillento y viscoso, se filtra y el residuo se disuelve en metanol dejándolo durante 24 horas a una
25 temperatura de 4°C. Pasado este tiempo en el metanol tenemos un residuo sólido el cual es filtrado al vacío y lavado varias veces en un soslher con eter.

En función de la pureza deseada la mezcla así obtenida se disuelve en ácido fórmico y se purifica mediante sucesivas cristalizaciones en MeOH o bien
30 aplicando la técnica de HPLC preparativo.

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

12

Una vez puro, el producto, $C_4(KNA)_2$, se somete a una hidrogenación catalítica con Pd/C en medio de ácido fórmico y a una presión de 600 psi durante 24 horas. La mezcla así resultante se filtra, se elimina el disolvente, se disuelve en agua y se liofiliza. El sólido obtenido se cristaliza en MeOH(ClH)/éter obteniéndose así el $C_4(KA)_2$ diclorhidratado.

Características del producto: $C_4(KA)_2$

Peso Molecular: 746

CCF (SiO₂; Butanol/Acético/Agua 4.2:5:2.5) Rf: 0,64

10 IR (KBr): 3300 cm⁻¹ (NH); 2923 cm⁻¹ (CH₂); 1638, 1621 cm⁻¹ (C=O-N amida I), 1546 cm⁻¹ (N-C=O, amida II):

¹H-RMN (200 MHz,δ): 0,84 ppm (t, 6H, 2CH₃); 1,2-1,7 ppm (m, 40H, CH₂); 2,1 ppm (t, 4H, 2CH₂); 1,3 ppm (m, 8H, 4CH₂-NH); 4,2 ppm (m, 2H, 2CH); 7,5-8,5 ppm (m, 14H, 6NH, 4NH₂).

¹³C-RMN (50 MHz,δ): 13,93 ppm (CH₃); 22-40 ppm (CH₂); 51,90 ppm (CH); 157,42 ppm (C, grupo guanidino); 171,53 ppm (1 HN-C=O, amida) 172,28 ppm (1 HN-C=O, amida).

Las propiedades fundamentales de actividad superficial en solución acuosa a 25°C que definen el interés práctico de un tensioactivo: tensión superficial a la concentración micelar crítica (γ) y concentración micelar crítica (cmc) se han determinado según métodos convencionales. Asimismo la actividad antimicrobiana se ha evaluado en base a los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) expresada en μ g/mL siguiendo las metodologías más comunes. En la tabla I se indican los valores de λ , CMC y MIC para dos dimeros de la misma serie homóloga: $C_4(KA)_2$ (x=8, n=4) y $C_4(LA)_2$ (x=10, n=4). A efectos comparativos en esta misma tabla se indican los mismos valores para los compuestos monocatenarios catiónicos KAM y LAM respectivamente.

TABLA I

Propiedades físico-químicas y antimicrobianas de C₄ (KA)₂, C₄ (LA)₂, KAM y LAM

5

10

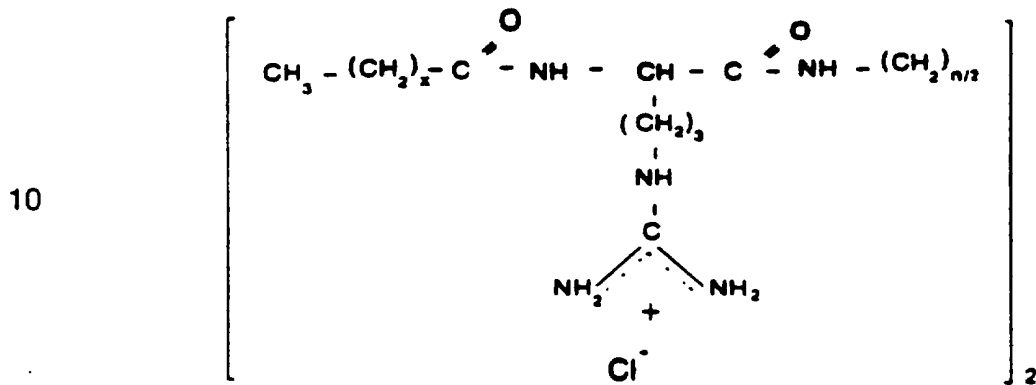
Com- puesto	γ_{cmc} mN/cm (25°)	CMC mM (25°C)	MIC (μ g/ml)						
			1	2	3	4	5	6	7
C ₄ (KA) ₂	25	7.8×10^{-6}	64	32	16	8	8	8	8
C ₄ (LA) ₂	25	4.0×10^{-6}	>128			32	32	16	16
KAM	30.2	14.1×10^{-3}	>128			>128			
LAM	30.0	3.7×10^{-3}	64	>128	32	>128	64	64	>128

15

1. Alcalígenes faecalis ATCC 8750
- 20 2. Bordetella bronchiseptica ATCC
3. Streptococcus faecalis ATCC 10541
4. Bacillus subtilis ATCC 6633
5. Staphylococcus aureus ATCC 25178
6. Staphylococcus epidermidis ATCC 155-1
- 25 7. Micrococcus luteus ATCC 9341

REIVINDICACIONES

1. Tensioactivos catiónicos geminales del tipo N^αN^ω bis (N^α-acil-arginina)α,ω diamino alquil diclorhidratos como agentes antimicrobianos de elevada actividad superficial, caracterizados por la fórmula general:



15 $x = 8-14; n = 2-8.$

2. Procedimiento de obtención de tensioactivos catiónicos de fórmula general según reivindicación 1 caracterizado por las siguientes etapas:

- 20 a) Formación de nitroarginina, utilizando como aminoácido de partida L-arg, D-arg ó DL-arg y como protector del grupo guanidino de la arginina el grupo HClnitro.
- b) Formación de N^α-acil-nitroarginina a partir de la nitroarginina y ácido graso, utilizando cloruros de ácido grasos lineales, de 10 a 18 átomos como acilantes de la nitroarginina en un medio hidroalcohólico.
- 25 c) Formación de N^α,N^ω,bis(N^α-acil-nitroarginina)α,ω diaminoalquilamida a partir de N^α-acil-nitroarginina y diaminoalquilo, utilizando como agentes de condensación, tales como BOP ó DCCD.
- d) Formación de N^α,N^ω,bis(N^α-acil-arginina)α,ω diaminoalquilamida diclorhidrato mediante una hidrogenación catalítica, en PD/C y metanolácido

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

15

fórmico en una proporción entre el 30–50%, de N^α,N^ωbis(N^α-acilnitroarginina)α,ω diaminoalquil.

3. Procedimiento de obtención de tensioactivos catiónicos según reivindicación 2, caracterizado porque para la etapa a) se lleva a cabo mediante la siguiente reacción: se disuelven hidrocloreto de L-arginina en ácido sulfúrico concentrado, en la proporción de 50% (w,v), eliminando al vacío el ácido clorhídrico formado; a esta disolución se le añade una cantidad de nitrato amónico pulverizado y se deja reaccionar al menos durante 15 minutos a temperatura ambiente y tras eliminar el gas formado se vierte la mezcla sobre hielo picado y se enfría a 0°C la solución se lleva a pH 6.8 por adición de amoníaco concentrado y se mantiene la temperatura de 0°C hasta precipitación total del producto, alrededor de 48 horas; el precipitado así formado se filtra y se cristaliza con agua caliente.
4. Procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque para la etapa b) se prepara una disolución en el rango 0,10–0,30 molar de nitroarginina y Na(OH) en una disolución acuosa del 20 al 30% acetona; a continuación se añade lentamente una cantidad equimolecular de cloruro de ácido graso, manteniendo el pH entre 11 y 13 mediante la adición de Na(OH). La mezcla se mantiene agitando durante varias horas y se añade HCl hasta pH ácido, apareciendo un precipitado blanco que se filtra, se lava con agua y eter y finalmente, se cristaliza en etanol-eter.
5. Procedimiento según reivindicación 2, caracterizado porque para la etapa c) se prepara una disolución 0,30–0,50 Molar de N^α-acil-nitroarginina y exceso de base orgánica terciaria (triethylamina ó N-metil morfolina) en cloroformo o bien dimetilformamida. A esta mezcla se le añade el agente condensante BOP en una concentración entre 0,30–0,50 molar y la alquildiamina en una concentración entre 0,15 y 0,25 molar. La mezcla de la reacción se mantiene en agitación entre 15–30 horas a una temperatura entre 10 y 25°C, posteriormente se añade eter apareciendo un precipitado que se lava varias veces con éter.

WO 96/24578

PCT/ES96/00026

16

6. Procedimiento según reivindicación 2, caracterizado porque la etapa d) se realiza mediante la desprotección del grupo nitro para la consecución de los dimeros N^oacil-arginina por una hidrogenación catalítica en un medio que contiene PD/C y metanol-ácido fórmico en una proporción entre el 30-50% en ácido fórmico a una presión de al menos 50 atm, temperatura ambiente y en un tiempo máximo de 24 horas.

7. Tensioactivos según reivindicaciones anteriores caracterizados por su actividad antimicrobiana ante agentes tales como, *Alicaliógenes faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*.

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ C07C 279/14 C11D 1/50 A01N 47/44 A61K 31/155

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶ C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2020148 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16 July 1991 (16.07.91) see the whole document	1,7
A	WO 9316991 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 02 September 1993 (02.09.93) see the whole document	1,7
A	US 3825560 A (SAITO T ET AL) 23 July 1974 (23.07.74) see column 2, line 37 - line 42; claims	1,7
A	ES 8303312 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16 February 1983 (16.02.83) see the whole document	1,7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "B" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 - "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 - "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 - "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 - "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 June 1996 (11.06.96)	Date of mailing of the international search report 14 June 1996 (14.06.96)
Name and mailing address of the ISA/ SPANISH PATENT AND TRADEMARK OFFICE	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00026

ES 2020148 A

NONE

WO 9316991 A

02.09.93

AU 3632993 B

13.09.93

US 3825560 A

23.07.74

DE 2064086 A

01.07.71

FR 2074495 A

01.10.71

GB 1290067 A

20.09.72

ES 8303312 A

NONE

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

olicitud internacional n°
PCT/ES 96/00026

A. CLASIFICACION DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
CIP6 C07C 279/14 C11D 1/50 A01N 47/44 A61K 31/155 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) CIP6 C07C		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
A	ES 2020148 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.07.91 Ver el documento completo	1,7
A	WO 9316991 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 02.09.93 Ver el documento completo	1,7
A	US 3825560 A (SAITO T ET AL) 23.07.74 Ver columna 2, línea 37 - línea 42; reivindicaciones	1,7
A	ES 8303312 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.02.83 Ver el documento completo	1,7
<input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" documento anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "I" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante: La invención reivindicada no puede considerarse nueva ni que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante: La invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11 Junio 1996 (11.06.96)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 14 Junio 1996 (14.06.96)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OEPM C/ PANAMA, 1, 28071 MADRID, ESPAÑA nº de fax 34 1 3495304	Funcionario autorizado MARIA NOVOA nº de teléfono 3495552	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
información reservada a miembros de familias de patentes

Solicitud int: n°
PCT/ ES 96/00026

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2020148 A		NINGUNO	
WO 9316991 A	02.09.93	AU 3632993 B	13.09.93
US 3825560 A	23.07.74	DE 2064086 A FR 2074495 A GB 1290067 A	01.07.71 01.10.71 20.09.72
ES 8303312 A		NINGUNO	