

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239299**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431074**

(22) Data zgłoszenia: **09.09.2019**

(51) Int.Cl.

C07D 491/107 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.03.2021 BUP 06/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ŁUKASZ LAMCH, Wrocław, PL

KAZIMIERA A. WILK, Wilczyce, PL

MARTA TSIRGOTIS-MANIECKA, Wrocław, PL

ANNA LESIAK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 239299 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie.

Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie pozwala na otrzymanie cennych biodegradowalnych i biokompatybilnych polimerowych materiałów budulcowych, prostą i dogodną metodą, prowadzącą do otrzymania związków z wysoką wydajnością. Związki te, zawierające znacznik fluorescencyjny (Rodaminę B), połączony z łańcuchem polimerowych stabilnym wiązaniem kowalencyjnym, mogą znaleźć zastosowanie w nanomedycynie i farmacji, m.in. jako składniki teranostycznych (łączących funkcję diagnostyczną i terapeutyczną) nośników substancji biologicznie aktywnych.

Z opisu zgłoszenia patentowego nr CN105817208 znane są adsorbenty na bazie usieciowanego chitozanu, zawierające przyłączoną chemicznie Rodaminę B. Reakcja przyłączenia Rodaminy B do chitozanu przebiega w dwóch etapach: pierwszy polega na wytworzeniu hydrazynu Rodaminy B w wyniku jej reakcji z wodzianem hydrazyny, a drugi – na reakcji utworzonego półproduktu z chitozanem. Według opisu patentowego materiały te mogą być zastosowane do adsorpcji i detekcji jonów rtęci w wodzie. Wykorzystanie toksycznej hydrazyny wyklucza biomedyczne aplikacje utworzonych produktów.

Z opisu patentowego CN10449674 znane są znaczniki fluorescencyjne, o strukturze mikrokryształicznej, na bazie chitozanu z przyłączoną fluoresceiną, zdolne do chelatowania jonów metali. Proces przyłączenia fluoresceiny do chitozanu polega na powierzchniowej modyfikacji mikrokryształitów chitozanu za pomocą izocyjaninianu fluoresceiny. Według opisu patentowego zmodyfikowane nanokryształity chitozanu te mogą znaleźć zastosowanie jako znaczniki fluorescencyjne do wykrywania jonów metali. Struktura otrzymanych produktów, w zakresie krystaliczności i modyfikacji powierzchniowej, znacznie utrudnia zastosowania w medycynie i farmacji, w których konieczne jest rozpuszczenie zmodyfikowanego chitozanu.

Znana z publikacji Int. J. Biol. Macromolecules, 2014, 65, 21 (P. Zhang i M. Cao, „Preparation of a novel organo-soluble chitosan grafted polycaprolactone copolymer for drug delivery”) metoda otrzymywania chitozanu zmodyfikowanego polikaprolaktonem polega na kilkuetapowym procesie, obejmującym modyfikację chitozanu glicydołem, syntezę polikaprolaktonu zakończonego ugrupowaniem izocyjaninianowym i reakcją pomiędzy. Reakcję przyłączenia polikaprolaktonu, zakończonego ugrupowaniem izocyjaninianowym, do zmodyfikowanego chitozanu prowadzi się w temperaturze 40°C przez 48 godzin w środowisku bezwodnego dimetylosulfotlenku. Otrzymany produkt (chitozan z bocznymi łańcuchami polikaprolatonu) posiada poprawioną, w stosunku do chitozanu, rozpuszczalność w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Brak znacznika fluorescencyjnego utrudnia zastosowanie otrzymanego produktu w nanonośnikach o charakterze teranostycznym (przeznaczonych do jednoczesnej terapii i diagnozy).

Nie jest znany z literatury przedmiotu: sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie o wzorze ogólnym 1, będący przedmiotem wynalazku.

Istotą wynalazku jest sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie o wzorze ogólnym 1, polegający na tym, że proces przyłączenia rodaminy B prowadzi się w środowisku lodowatego kwasu octowego i otrzymuje chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie, a otrzymany surowy produkt izoluje się i oczyszcza się na drodze odparowania rozpuszczalnika, dializy i liofilizacji. Alternatywnie proces można prowadzić dwuetapowo, gdzie pierwszy etap obejmuje otrzymanie aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B, w wyniku reakcji Rodaminy B z N-hydroksysukcynimidem w obecności odpowiednich czynników sprzęgających i katalizatorów, a drugi etap – przyłączenie aktywnego estru do chitozanu w środowisku lodowatego kwasu octowego.

Korzystnie przyłączenia rodaminy B do chitozanu prowadzi się w warunkach Steglicha w środowisku kwasu organicznego, korzystnie kwasu octowego.

Korzystnie proces przyłączenia rodaminy B do chitozanu prowadzi się przez 24 – 72 h, korzystnie około 48 h.

Korzystnie proces przyłączenia rodaminy B do chitozanu prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i N-hydroksysukcynimidu (NHS) jako czynników kondensujących oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).

Korzystnie proces syntezy aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu

(DCC) jako czynnika kondensującego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).

Korzystnie proces syntezy aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B prowadzi się w środowisku mieszaniny rozpuszczalników organicznych, korzystnie bezwodnego acetonu i dichlorometanu (w stosunku od 1:1, v:v do 1:2, v:v) przez 48 – 72 h.

Korzystnie aktywny ester N-hydroksysukcynimidowy Rodaminy B izoluje się z mieszaniny poreakcyjnej poprzez filtrację i odparowanie rozpuszczalnika (rozpuszczalników) pod zmniejszonym ciśnieniem.

Korzystnie mieszaninę poreakcyjną (po reakcji przyłączenia Rodaminy B do chitozanu) poddaje się filtracji, a następnie zatęża poprzez odparowanie rozpuszczalnika (kwasu octowego) pod zmniejszonym ciśnieniem.

Korzystnie oczyszczanie produktu prowadzi się na drodze dializy wobec wody destylowanej, zmieniając kilkakrotnie medium dializacyjne, a następnie izoluje się produkt poprzez liofilizację.

Zasadniczą zaletą sposobu według wynalazku jest wytwarzanie prostą metodą, z użyciem powszechnie dostępnych surowców, cennych biokompatybilnych i biodegradowalnych składników budulcowych o budowie amfifilowej i szerokiej gamie potencjalnych zastosowań w medycynie i farmacji dzięki obecności związanego kowalencyjnie znacznika fluorescencyjnego.

Chitozan z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie według wynalazku potencjalnie wykazują szereg interesujących własności użytkowych, z których najistotniejsza jest zawartość trwale związanego z makrocząsteczką znacznika fluorescencyjnego, biokompatybilność i biodegradowalność, amfifilowa struktura, a także łatwość dalszej chemicznej / fizycznej modyfikacji. Z tego względu może być wykorzystany jako składnik budulcowy nano- i mikrostruktur, m.in. nośników dla substancji biologicznie aktywnych, a także innych formułacji farmaceutycznych, w tym przeznaczonych do jednoczesnej terapii i diagnostyki (tzw. teranostyki). Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie charakteryzuje się prostotą, łagodnymi warunkami syntezy (temperatura pokojowa, ciśnienie atmosferyczne) oraz możliwością otrzymywania produktów o różnym stopniu podstawienia Rodaminy B z dużymi wydajnościami. Z uwagi na pH-respondywność (możliwość przyjęcia / oddysocjowania protonu przy określonych wartościach pH) może stanowić składniki tzw. inteligentnych nośników substancji biologicznie aktywnych.

Przedmiot wynalazku objaśniony jest na przykładzie otrzymywania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie o różnym stopniu podstawienia znacznikiem fluorescencyjnym (20, 5 i 1 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę rodaminy B).

P r z y k ł a d I

W pierwszym etapie w celu otrzymania aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B, przeznaczonego do reakcji syntezy chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie (1 mer chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B), do kolby stożkowej wprowadza się 1,20 g (0,0025 mola) Rodaminy B, 0,51 g (0,0025 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 0,28 g (0,0025 mola) N-hydroksysukcynimidu (NHS) i 0,01 g 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) oraz 75 cm³ mieszaniny bezwodnego acetonu i dichlorometanu (1:2, v:v). Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 72 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, a rozpuszczalniki (mieszanina acetonu i dichlorometanu) usuwa poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Następnie uzyskany półprodukt (aktywny ester N-hydroksysukcynimidowy Rodaminy B) rozpuszcza się, wraz z 0,50 g (0,0029 mola) chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%), w 80 cm³ lodowatego kwasu octowego. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 72 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę poreakcyjną filtruje się, a większą część rozpuszczalnika (kwasu octowego) usuwa poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Uzyskaną mieszaninę dysperguje się w około 50 cm³ wody destylowanej i umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da). Dializę prowadzi się wobec 5 dm³ wody przez 120 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 1,25 g produktu (około 76% wyd. teoretycznej).

P r z y k ł a d II

W pierwszym etapie w celu otrzymania aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B, przeznaczonego do reakcji syntezy chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie (5 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B), do kolby stożkowej wprowadza się 0,24 g (0,0005 mola) Rodaminy B, 0,10 g (0,0005 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 0,06 g (0,0005 mola)

N-hydroksysukcynimidu (NHS) i 0,002 g 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) oraz 35 cm³ mieszaniny bezwodnego acetonu i dichlorometanu (1:1, v:v). Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 48 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, a rozpuszczalniki (mieszanina acetonu i dichlorometanu) usuwa poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Następnie uzyskany półprodukt (aktywny ester N-hydroksysukcynimidowy Rodaminy B) rozpuszcza się, wraz z 0,50 g (0,0029 mola) chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%), w 80 cm³ lodowatego kwasu octowego. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 48 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę poreakcyjną filtruje się, a większą część rozpuszczalnika (kwasu octowego) usuwa poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Uzyskaną mieszaninę dysperguje się w około 50 cm³ wody destylowanej i umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da). Dializę prowadzi się wobec 5 dm³ wody przez 96 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 0,61 g produktu (około 82% wyd. teoretycznej).

Przykład III

W pierwszym etapie w celu otrzymania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie (20 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B) do kolby stożkowej wprowadza się 0,50 g (0,0029 mola) chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%), 0,06 g (0,000125 mola) Rodaminy B, 0,025 g (0,000125 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 0,015 g (0,000125 mola) N-hydroksysukcynimidu (NHS), 0,0005 g 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) oraz 80 cm³ lodowatego kwasu octowego. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 48 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, a większą część rozpuszczalnika (kwasu octowego) usuwa poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Uzyskaną mieszaninę dysperguje się w około 50 cm³ wody destylowanej i umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da). Dializę prowadzi się wobec 5 dm³ wody przez 96 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 0,48 g produktu (około 87% wyd. teoretycznej).

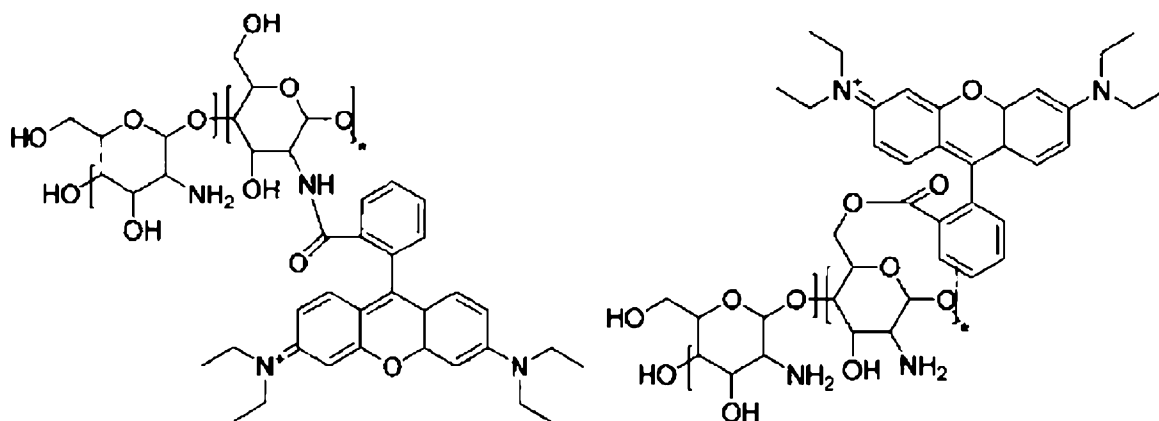
Widmo FT-IR chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie (cm⁻¹): 614, 641, 668, 763, 910, 1037, 1078, 1155, 1381, 1416, 1569, 1630 (karbonyl wiązania amidowego pomiędzy chitozanem a Rodaminą B), 1736 (karbonyl wiązania estrowego pomiędzy chitozanem a Rodaminą B), 2862, 2934, 3339.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie o wzorze ogólnym 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia rodaminy B prowadzi się w środowisku lodowatego kwasu octowego i otrzymuje chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie, a otrzymany surowy produkt izoluje się i oczyszcza się na drodze odparowania rozpuszczalnika, dializy i liofilizacji. Alternatywnie proces można prowadzić dwuetapowo, gdzie pierwszy etap obejmuje otrzymanie aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B, w wyniku reakcji Rodaminy B z N-hydroksysukcynimidem w obecności odpowiednich czynników sprzęgających katalizatorów, a drugi etap – przyłączenie aktywnego estru do chitozanu w środowisku lodowatego kwasu octowego.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przyłączenia Rodaminy B do chitozanu prowadzi się w warunkach Steglich'a w środowisku kwasu organicznego, korzystnie kwasu octowego.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia Rodaminy B do chitozanu prowadzi się przez 24 – 72 h, korzystnie około 48 h.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia Rodaminy B do chitozanu prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i N-hydroksysukcynimidu (NHS) jako czynników kondensujących oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces syntezy aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako czynnika kondensującego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces syntezy aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego Rodaminy B prowadzi się w środowisku mieszaniny rozpuszczalników organicznych, korzystnie bezwodnego acetonu i dichlorometanu (w stosunku od 1:1, v:v do 1:2, v:v) przez 48 – 72 h.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że aktywny ester N-hydroksysukcynimidowy Rodaminy B izoluje się z mieszaniny poreakcyjnej poprzez filtrację i odparowanie rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną poddaje się filtracji, a następnie zatęża poprzez odparowanie rozpuszczalnika (kwasu octowego) pod zmniejszonym ciśnieniem.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie produktu prowadzi się na drodze dializy wobec wody destylowanej, zmieniające kilkakrotnie medium dializacyjne, a następnie izoluje się produkt poprzez liofilizację.

Rysunek



wzór 1