

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242021 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437029**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.22 BUP 34/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.09 WUP 02/2023**

(51) MKP:

C07D 417/04 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MARCIN SZALA, Chorzów, PL

ALEKSANDRA GRZELAKOWSKA, Łódź, PL

JOLANTA KOLIŃSKA, Konstantynów Łódzki, PL

RADOSŁAW PODSIADŁY, Łódź, PL

JULIA MODRZEJEWSKA, Kutno, PL

(74) Pełnomocnik:

Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Związki, pochodne lucyferyny, sposób ich wytwarzania i ich zastosowanie

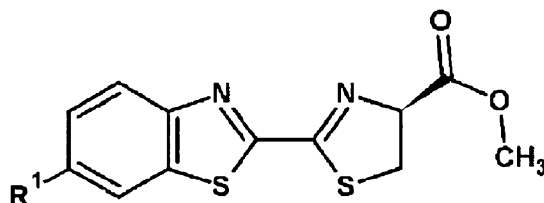
PL 242021 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe związki, pochodne lucyferyny, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie.

Lucyferyny jest to grupa związków chemicznych obecnych w organizmach żywych, zdolnych do emitowania światła na drodze bioluminescencji.

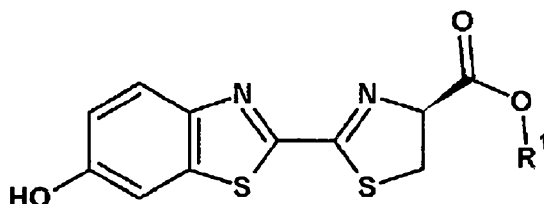
Z czasopism: *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137 (24), 7592–7595, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16 (2), 331–337, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 94, 140–148, *Chemistry – A European Journal*, 2016, 22 (27), 9330–9337, *Chemical Communications*, 2018, 54 (14), 1774–1777 znane są pochodne estru metylowego lucyferyny, o wzorze a



wzór a

gdzie R¹ oznacza grupę hydroksylową lub metoksyłową, a także sposób ich otrzymywania polegający na reakcji lucyferyny z pirydyną oraz DCC (*N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidem) w metanolu w temperaturze pokojowej w czasie 3 godzin w atmosferze gazu obojętnego, lub też na reakcji lucyferyny z TMSCHN₂ (trimetylosililodiazometanem) w mieszaninie toluen/metanol 1 : 7 v/v w temperaturze pokojowej w czasie 2 godzin.

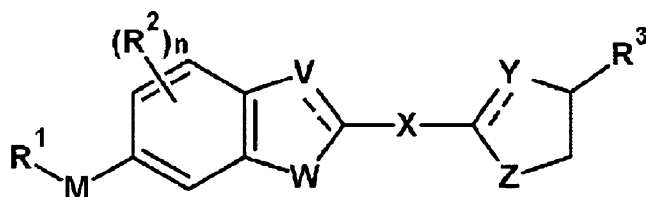
Z czasopisma *Angewandte Chemie – International Edition*, 2014, 53 (48), 13059–13063 znane są pochodne estrowe lucyferyny, o wzorze b



wzór b

w którym R¹ oznacza grupę metylową lub etylową.

Z opisu zgłoszenia patentowego WO2014/162157 A1 znane są związki, pochodne lucyferyny, o wzorze c



wzór c

w którym R¹ oznacza atom wodoru lub podstawioną grupę alkilową, R² oznacza podstawioną grupę hydroksylową, podstawioną grupę aminową, podstawioną grupę tiolową, podstawioną grupę alkilową lub podstawioną grupę aryłową, R³ oznacza grupę karboksylową lub grupę karboksylową podstawioną łańcuchem C₁-₆ alkilowym, M oznacza atom tlenu lub atom siarki lub grupę NR⁴, w której R⁴ oznacza atom wodoru, podstawioną grupę alkilową, podstawioną grupę alkenylową, podstawioną grupę aryłową, podstawioną grupę heteroaryłową lub podstawioną grupę heterocykliczną, X oznacza podstawioną grupę alkenylenową, podstawioną grupę alkinylenową, podstawioną grupę aryłową lub ich kombinację grupy alkilenokarbonylowej, n oznacza 0, 1, 2, 3, V i Y oznaczają niezależne od siebie CR⁵ lub atom azotu, W i Z oznaczają niezależne od siebie CR⁷, atom siarki lub atom tlenu, R⁵ oznacza atom wodoru,

podstawioną grupę hydroksylową, podstawioną grupę aminową lub podstawioną grupę alkilową, R^7 oznacza atom wodoru, podstawioną grupę alkilową lub podstawioną grupę arylową.

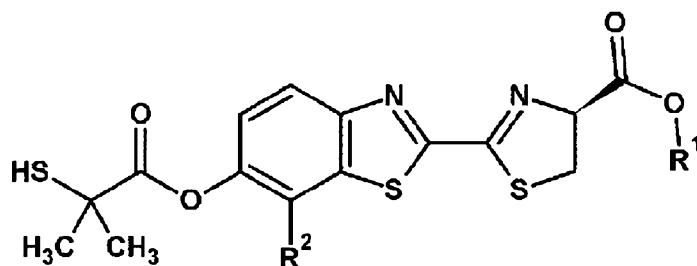
Nitroksyl (HNO), według terminologii IUPAC azanon, jest jednym z przedstawicieli reaktywnych form azotu. Powstaje jako produkt jednoelektronowej redukcji NO^+ .

W celu detekcji nitroksylu w układach biologicznych stosuje się próbniki z odpowiednią grupą reaktywną. W ostatnim czasie jednym z takich ugrupowań są pochodne z grupą merkaptooctową.

Znane są próbniki fluorescencyjne do oznaczania nitroksylu, takie jak pochodne kumaryny (czasopismo *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (51), 18476–18479), opis zgłoszenia patentowego US2020/0140452) oraz pochodne fluoresceiny (czasopismo *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (51), 18476–18479, opis zgłoszenia patentowego US2020/0140452).

Celem wynalazku jest otrzymanie nowych związków – pochodnych lucyferyny, przeznaczonych do detekcji fluorescencyjnej nitroksylu (HNO).

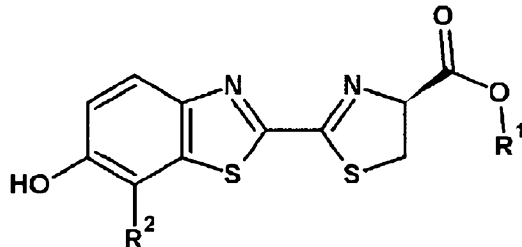
Przedmiotem wynalazku są związki, pochodne lucyferyny, o wzorze 1



wzór 1

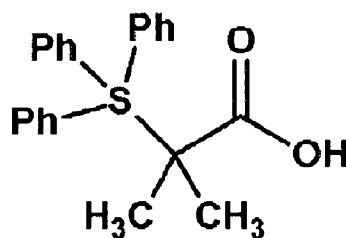
w którym R^1 oznacza grupę alkilową o liczbie atomów węgla od 1–6 w postaci łańcucha prostego, rozgałęzionego lub cykloalkilowego, a R^2 oznacza atom wodoru, fluoru, chloru, bromu lub jodu.

Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych powyżej, **według wynalazku** polega na tym, że ester metylowy pochodnej lucyferyny, o wzorze 2



wzór 2

w którym R^1 oznacza grupę alkilową o liczbie atomów węgla 1–6 w postaci łańcucha prostego, rozgałęzionego lub cykloalkilowego, zaś R^2 oznacza atom wodoru, fluoru, chloru, bromu lub jodu, poddaje się reakcji z roztworem kwasu 2-metylo-2-(trifenyl- λ^4 -sulfanylo)propionowego o wzorze 3



wzór 3

w bezwodnym dichlorometanie, stosując 1 część wagową związku o wzorze 2 / 1 część wagową kwasu o wzorze 3 rozpuszczonego w bezwodnym dichlorometanie, po czym dodaje się chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropyl)-*N'*-etylokarbodiimidu (chlorowodorek EDC) oraz 4-(dimetyloamino)pirydynę (DMAP), stosując EDC i DMAP w ilościach odpowiednio 2,0–6,0 części wagowych i 0,2–0,6 części wagowych / 1 część wagową związku o wzorze 2 i całość miesza w temperaturze

pokojoyej w czasie 2–16 godzin w atmosferze argonu. Następnie całość przemywa się trzykrotnie nasyconym wodnym roztworem chlorku sodu, fazę organiczną suszy za pomocą siarczanu magnezu(VI) i po odparowaniu do sucha pozostałość rozpuszcza się w chloroformie, stosując 0,2–2,0 części wagowych chloroformu / 1 część wagową związku o wzorze 2, dodaje kwas trifluorooctowy oraz trietylosilan w ilościach odpowiednio 5,0–20,0 części wagowych i 5,0–10,0 części wagowych / 1 część wagową związku o wzorze 2 i miesza całość w temperaturze pokojowej w czasie 1–3 godziny. Po odparowaniu pozostałości rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, surowe produkty oczyszcza się, stosując chromatografię kolumnową, w której fazę ruchomą stanowi mieszanina dichlorometanu i metanolu o stosunku objętościowym składników 30 : 1 v/v.

Zastosowanie **według wynalazku** polega na tym, że związki o wzorze 1, określone powyżej, stosuje się jako fluorescencyjne próbники do selektywnej detekcji nitroksylu (HNO). Zastosowanie związków określonych powyżej jako próbników do detekcji nitroksylu polega na tym, że związki te poddaje się reakcji z substancją badaną na obecność nitroksylu, zawierającą 0,03–100% masowych nitroksylu w stosunku do masy próbника, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego o pH 5,7–9,0 użytych w stosunku objętościowym 1 : 9 v/v, w czasie inkubacji co najmniej 30 minut, po czym identyfikuje się produkt tej reakcji i zidentyfikowanie produktu jako produktu utlenienia próbника nitroksylem czyli estru D-lucyferyny oznacza, że badana substancja stanowi lub zawiera nitroksyl.

Związki o wzorze 1 reagują stechiometrycznie z nitroksylem i dlatego są znacznie lepszymi próbnikami do detekcji nitroksylu niż stosowane dotychczas do tego celu próbники. Związki o wzorze 1 umożliwiają detekcję nitroksylu obok reagentów z grupy obejmującej nadtlenek wodoru, kwas chlorowy(I), nadtlendioazotyn, anion wodorosiarczkowy, anion siarczkowy, anion azotanowy(III), anion siarcznowy(IV), L-cysteina, glutation.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, na którym fig. 1 przedstawiono chromatogramy oraz wykresy zmian stężenia próbników stosowanych w przykładzie III, potwierdzające powstanie produktów utlenienia tych próbników nitroksylem, fig. 2 ilustruje zmiany intensywności fluorescencji przy długości fali 542 nm i długości fali 546 nm próbników stosowanych w przykładzie IV po dodaniu nitroksylu, zaś fig. 3 ilustruje wykres relatywnej intensywności fluorescencji, przy długości fali 542 nm i długości fali 546 nm próbników stosowanych w przykładzie V po dodaniu nitroksylu, w obecności odpowiednio nadtlenu wodoru, nadtlendioazotynu, kwasu chlorowego(I), wodorosiarczku sodu, siarczku sodu, azotanu(III) sodu, siarczanu(IV) sodu, hydroksyloaminy, L-cysteiny, glutationu.

Części podane w przykładach oznaczają części wagowe.

Przykład I

0,30 części estru metylowego pochodnej lucyferyny o wzorze 2, w którym R¹ oznacza grupę metylową, a R² oznacza atom wodoru, poddano reakcji z 0,30 części kwasu 2-metylo-2-(trifenyl-λ⁴-sulfonyl)propionowego o wzorze 3 rozpuszczonego w 0,15 częściach bezwodnego dichlorometanu, a następnie dodano 1,80 części chlorowodoru N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu (chlorowodorek EDC) oraz 0,12 części 4-(dimetyloamino)pirydyny (DMAP) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin w atmosferze argonu. Następnie całość przemyto trzykrotnie nasyconym wodnym roztworem chlorku sodu, fazę organiczną osuszono za pomocą siarczanu magnezu(VI) i odparowano do sucha. Pozostałość rozpuszczono w 0,15 częściach chloroformu i dodano 6,00 części kwasu trifluorooctowego oraz 3,00 części trietylosilanu i mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Pozostałości rozpuszczalnika odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano, stosując chromatografię kolumnową, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina dichlorometanu i metanolu zmieszanych w stosunku 30 : 1 v/v.

Otrzymano 0,20 części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom wodoru, w postaci jasnożółtego proszku (wydajność 66%) o temperaturze topnienia 71°C.

Widmo ¹H NMR otrzymanego związku wykonane w chloroformie-d zawierało następujące sygnały: 3,73 (dd, J = 11,1, 9,7 Hz, 1H, CH₂), 3,82 (dd, J = 11,2, 8,9 Hz, 1H, CH₂), 3,86 (s, 3H, CH₃), 5,39 (t, J = 9,3 Hz, 1H, CH), 7,30 (dd, J = 8,9, 2,3 Hz, 1H, aromatyczny), 7,74 (d, J = 2,2 Hz, 1H, aromatyczny), 8,15 (d, J = 8,9 Hz, 1H, aromatyczny), oraz widmo MS (ESI): [M+H]⁺ = 397,0354 (100%) w pełni potwierdziły budowę otrzymanego związku.

Przykład II

0,30 części estru metylowego pochodnej lucyferyny o wzorze 2, w którym R¹ oznacza grupę metylową, a R² oznacza atom chloru, poddaje się reakcji z 0,30 części kwasu 2-metylo-2-(trifenyl-λ⁴-sulfonyl)propionowego o wzorze 3 rozpuszczonego w 0,15 częściach bezwodnego dichlorometanu, a następnie dodano 1,80 części chlorowodoru EDC oraz 0,12 części DMAP i mieszano w temperaturze

pokojujowej przez 16 godzin w atmosferze argonu. Następnie całość przemyto trzykrotnie nasyconym wodnym roztworem chlorku sodu, fazę organiczną osuszono za pomocą siarczanu magnezu(VI) i odparowano do sucha. Pozostałość rozpuszczono w 0,15 częściach chloroformu i dodano 6,00 części kwasu trifluorooctowego oraz 3,00 części trietylosilanu i całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Pozostałości rozpuszczalnika odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano, stosując chromatografię kolumnową, w której fazę ruchomą stanowiła mieszanina dichlorometanu i metanolu zmieszanych w stosunku 30 : 1 v/v.

Otrzymano 0,20 części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom chloru, w postaci jasnożółtego proszku (wydajność 67%) o temperaturze topnienia 56°C. Widmo ¹H NMR wykonane w chloroformie-d zawierało następujące sygnały: 3,74 (dd, *J* = 11,2, 9,7 Hz, 1H, CH₂), 3,84 (dd, *J* = 11,2, 8,9 Hz, 1H, CH₂), 3,87 (s, 3H, CH₃), 5,39 (dd, *J* = 9,7, 9,0 Hz, 1H, CH), 7,38 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, aromatyczny), 8,06 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, aromatyczny), widmo MS (ESI): [M+H]⁺ = 430,9964 (100%) w pełni potwierdziło budowę otrzymanego związku.

Przykład III

Przygotowano 7,92 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom wodoru, oznaczonego jako próbnik P1 oraz 8,58 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom chloru, oznaczonego jako próbnik P2, co stanowiło 20 mM próbника P1 oraz 20 mM próbника P2, z których każdy rozpuszczono w 0,15 ml acetonitrylu oraz 1,35 ml 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego o pH = 7,4 oraz dodano odpowiednio 4, 8, 12, 16, 20, 30, 40 mM nitroksylu (HNO) jako roztwór soli Angeliego – Na₂(N₂O₃) w 0,1 M wodnym roztworze wodorotlenku sodu. Następnie badano ilość powstającego produktu reakcji próbника P1 oraz próbника P2 z nitroksylem, po czasie inkubacji 30 minut, na chromatografii firmy Shimadzu z detektorem DAD (model SPD-M20A), kolumna Kinetex Biphenyl firmy Phenomenex (50 mm x 4,6 mm) o średnicy ziarna 2,6 μm, faza ruchoma: woda + 0,1% TFA – acetonitryl + 0,1% TFA o gradientowym przepływie od 10 do 100% acetonitryl + 0,1% TFA przez 10 minut, v/v, szybkość przepływu 1,5 ml/min, objętość pobieranej próbki 10 μl.

Przeprowadzony eksperyment potwierdził powstawanie produktu utlenienia próbника P1 z nitroksylem, jakim był ester metylowy *D*-lucyferyny oraz produktu utlenienia próbника P2 z nitroksylem jakim był ester metylowy 7-chloro-*D*-lucyferyny, a tym samym potwierdził zastosowanie w/w próbników do detekcji nitroksylu (fig. 1 rysunku).

Przykład IV

Przygotowano 3,96 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom wodoru, oznaczonego jako próbnik P1 oraz 4,29 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom chloru, oznaczonego jako próbnik P2, co stanowiło 10 mM próbника P1 i 10 mM próbника P2, z których każdy rozpuszczono w 0,30 ml acetonitrylu oraz 2,70 ml 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego o pH = 7,4 oraz dodano odpowiednio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 mM HNO jako roztwór soli Angeliego – Na₂(N₂O₃) w 0,1 M wodnym roztworze wodorotlenku sodu. Następnie badano zmiany widma fluorescencji w zależności od ilości dodanego HNO, po czasie inkubacji 30 minut, na spektrofлуorymetrze firmy Edinburgh Instruments (model FLS920), zakres rejestracji widma 360–660 nm przy długości wzbudzenia wynoszącym 332 nm dla próbника P1 oraz zakres rejestracji widma 410–680 nm przy długości wzbudzenia wynoszącym 397 nm dla próbника P2. Przeprowadzony eksperyment potwierdził zastosowanie próbника P1 oraz próbника P2 jako fluorescencyjnej sondy do detekcji HNO (fig. 2 rysunku).

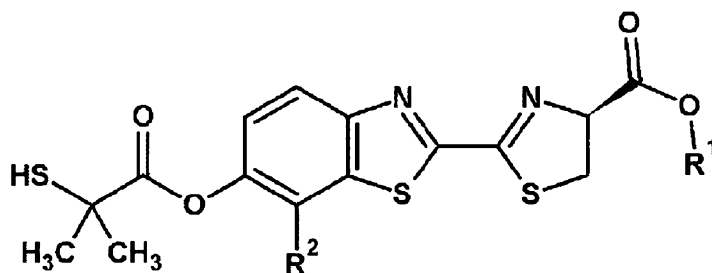
Przykład V

Przygotowano 3,96 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom wodoru, oznaczonego jako próbnik P1 oraz 4,29 x 10⁻⁵ części związku o wzorze 1, w którym R¹ oznaczało grupę metylową, a R² oznaczało atom chloru, oznaczonego jako próbnik P2, co stanowiło 10 mM próbника P1 oraz 10 mM próbника P2, z których każdy rozpuszczono w 0,30 ml acetonitrylu oraz 2,70 ml 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego o pH = 7,4 oraz dodano 100 mM odpowiednio nadtlenu wodoru, nadtlendioazotynu, kwasu chlorowego(I), wodorosiarczku sodu, siarczku sodu, azotanu(III) sodu, siarczanu(IV) sodu, hydroksyloaminy lub 500 mM odpowiednio *L*-cysteiny, glutationu oraz 10 mM HNO jako roztwór soli Angeliego – Na₂(N₂O₃) w 0,1 M wodnym roztworze wodorotlenku sodu, zwanych dalej analitami. Następnie badano zmianę widma fluorescencji w zależności od dodanej ilości analitów, po czasie inkubacji 30 minut, na spektrofлуorymetrze firmy Edinburgh Instruments (model FLS920), zakres rejestracji widma 360–660 nm przy długości wzbudzenia wynoszącym

332 nm dla próbnika P1 oraz zakres rejestracji widma 410–680 nm przy długości wzbudzenia wynoszącym 397 nm dla próbnika P2. Przeprowadzony eksperyment potwierdził selektywność próbnika P1 oraz próbnika P2 jako fluorescencyjnej sondy do detekcji nitroksylu HNO względem innych analitów (fig. 3 rysunku).

Zastrzeżenia patentowe

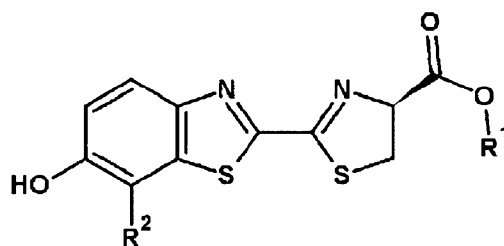
1. Związki, pochodne lucyferyny, o wzorze 1



wzór 1

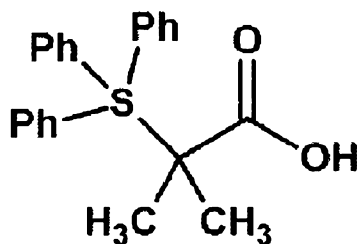
w którym R¹ oznacza grupę alkilową o liczbie atomów węgla od 1–6 w postaci łańcucha prostego, rozgałęzionego lub cykloalkilowego, a R² oznacza atom wodoru, fluoru, chloru, bromu lub jodu.

2. Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych w zastrz. 1, **znamienny tym**, że ester metylowy pochodnej lucyferyny, o wzorze 2



wzór 2

w którym R¹ oznacza niezależną od siebie grupę alkilową o liczbie atomów węgla 1–6 w postaci łańcucha prostego, rozgałęzionego lub cykloalkilowego, zaś R² oznacza atom wodoru, fluoru, chloru, bromu lub jodu, poddaje się reakcji z roztworem kwasu 2-metylo-2-(trifenyl-λ⁴-sulfonyl)propionowego o wzorze 3



wzór 3

w bezwodnym dichlorometanie, stosując 1 część wagową związku o wzorze 2 / 1 część wagową kwasu o wzorze 3 rozpuszczonego w bezwodnym dichlorometanie, po czym dodaje się chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropyl)-*N'*-etylokarbodiimidu (chlorowodorek EDC) oraz 4-(dimetyloamino)pirydynę (DMAP) stosując EDC i DMAP w ilościach odpowiednio 2,0–6,0 części wagowych i 0,2–0,6 części wagowych / 1 część wagową związku o wzorze 2 i całość miesza w temperaturze pokojowej w czasie 2–16 godzin w atmosferze argonu, następnie przemywa się trzykrotnie nasyconym wodnym roztworem chlorku sodu, fazę organiczną suszy za pomocą siarczanu

magnezu(VI) i po odparowaniu do sucha pozostałość rozpuszcza się w chloroformie, stosując 0,2–2,0 części wagowych chloroformu / 1 część wagową związku o wzorze 2, dodaje kwas trifluorooctowy oraz trietylosilan w ilościach odpowiednio 5,0–20,0 części wagowych i 5,0–10,0 części wagowych / 1 część wagową związku o wzorze 2 i miesza całość w temperaturze pokojowej w czasie 1–3 godziny i po odparowaniu pozostałości rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, surowe produkty oczyszcza się, stosując chromatografię kolumnową, w której fazę ruchomą stanowi mieszanina dichlorometanu i metanolu o stosunku objętościowym składników 30 : 1 v/v.

3. Zastosowanie związków o wzorze 1, określonych w zastrzeżeniu 1 jako fluorescencyjnych próbników do selektywnej detekcji nitroksylu.
4. Zastosowanie według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że związki o wzorze 1 określone w zastrzeżeniu 1, poddaje się reakcji z substancją badaną na obecność nitroksylu, zawierającą 0,03–100% masowych nitroksylu w stosunku do masy próbника, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego o pH 5,7–9,0, użytych w stosunku objętościowym 1:9 v/v w czasie inkubacji co najmniej 30 minut, po czym identyfikuje się produkt tej reakcji i zidentyfikowanie produktu jako produktu utlenienia próbника nitroksylem czyli estru D-lucyferyny oznacza, że badana substancja stanowi lub zawiera nitroksyl.

Rysunki

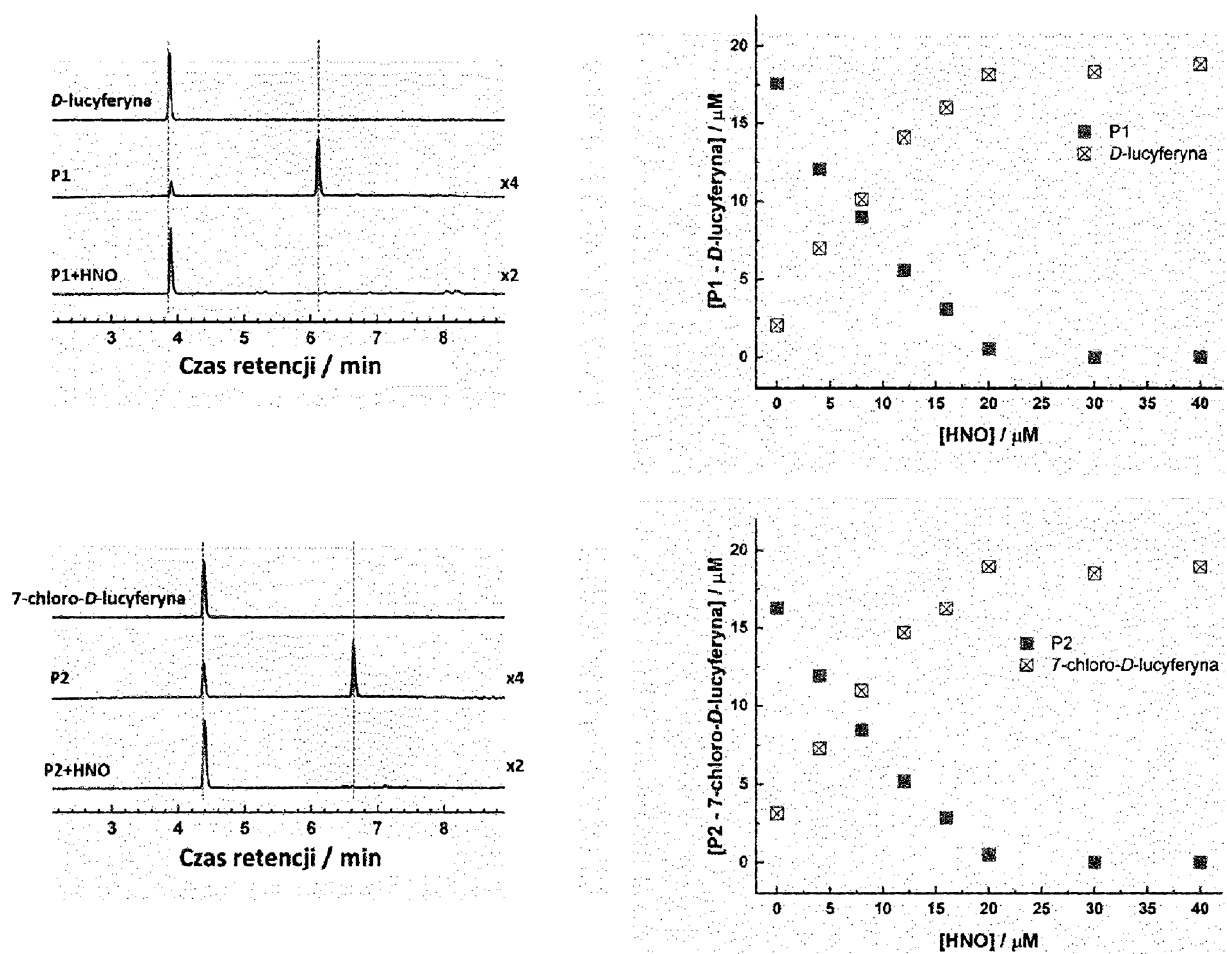


Fig. 1

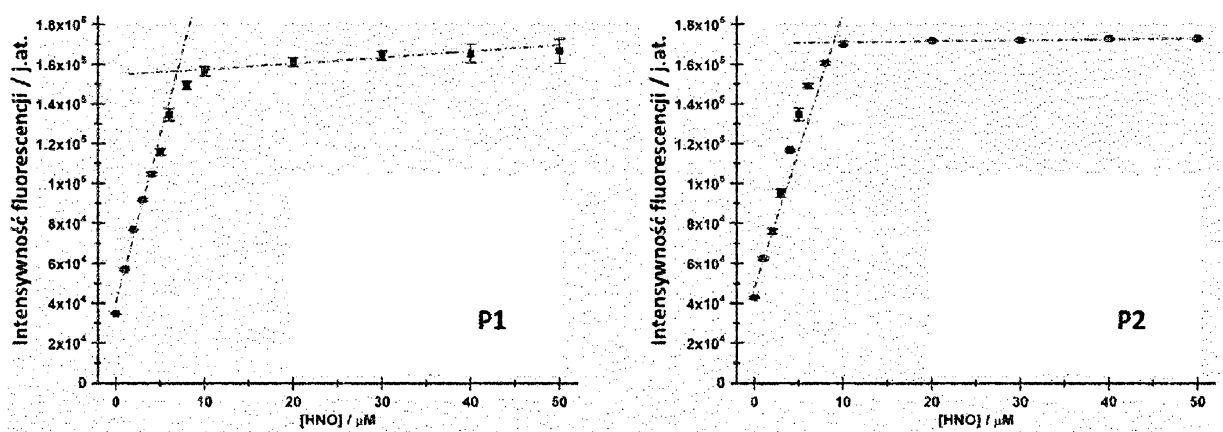


Fig. 2

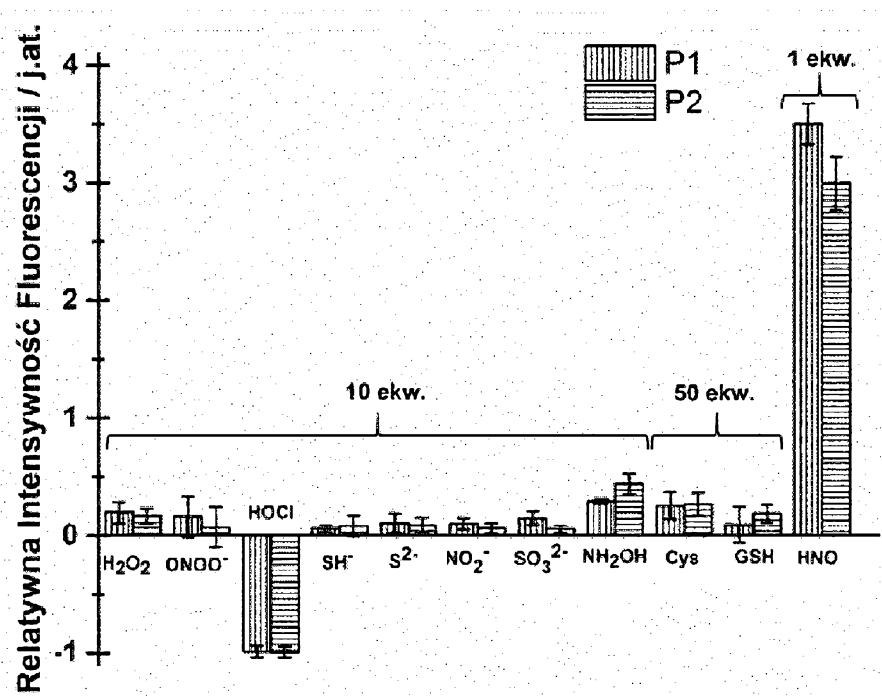


Fig. 3