

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **210237**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **381659**

(51) Int.Cl.
C07H 19/052 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **01.02.2007**

(54) **Sposób otrzymywania tosylanu**
1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5- deoksy D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.08.2008 BUP 16/08

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.12.2011 WUP 12/11

(73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
BARBARA DMOCHOWSKA, Reda, PL
EUGENIA SKORUPOWA, Gdańsk, PL
ANDRZEJ WIŚNIEWSKI, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:
recz. pat. Andrzej M. Jaeszke

PL 210237 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-DL-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego.

Wynalazek dotyczy nowych sposobów otrzymywania czwartorzędowych soli imidazoliowych.

Znane są i powszechnie stosowane w różnych dziedzinach czwartorzędowe związki amoniowe, które charakteryzują się między innymi właściwościami bakteriobójczymi, grzybobójczymi i wirusobójczymi. Sole te są szeroko opisane w literaturze przedmiotu, między innymi w J. Pernak, *Ind. J. Heterocycl. Chem.*, 1997, 7, 97, oraz J. Pernak, A. Arndt, B. Brycki, *Atch. Pharm. Med. Chem.*, 1997, 330, 253, oraz E. Urbanik, J. Zabielska-Matejuk, A. Skrzypczak, J. Pernak, *Material and Organismen*, 1977, 31, 247, jak również A. Skrzypczak, B. Brycki, I. Mirska, J. Pernak, *Eur. J. Med. Chem.*, 1997, 32, 661.

Mimo, iż szeroko znane są czwartorzędowe sole amoniowe, to w przypadku czwartorzędowych związków amoniowych cukrów i ich pochodnych wiedza o ich syntezie i wykorzystaniu jest niewielka.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie opracowania nowego sposobu otrzymywania nowej czwartorzędowej soli imidazoliowej, wykazującej oczekiwaną zwiększoną aktywność biologiczną i dające się przewidzieć korzystne działanie przede wszystkim przeciwgrzybicze, pozwalającej, po odpowiedniej jej adaptacji przemysłowej, na wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i w medycynie.

Sposób otrzymywania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego charakteryzyczny tym, że od 0,050 g do 0,075 g lecz najkorzystniej 0,069 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) 1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-O-tosylo-D,L-rybitolu o wzorze (3), oraz od 0,010 g do 0,0160 g, lecz najkorzystniej 0,0145 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) imidazolu, umieszcza się w szczelnie zamkniętym termostatycznym naczyniu technologicznym, zwłaszcza w szklanej ampułce i poddaje ogrzewaniu w urządzeniu grzejnym o temperaturze 115°C z tolerancją utrzymywana w przedziale $+ - 5^{\circ}\text{C}$, przez okres utrzymywany w przedziale od 100 godzin do 125 godzin, lecz najkorzystniej 119 godzin, po którego upływie reakcję przerywa się, naczynie technologiczne chłodzi się w warunkach naturalnych do temperatury otoczenia, a tak otrzymany surowy produkt przenosi się z termostatowanego naczynia technologicznego do innego naczynia technologicznego, zwłaszcza do kolby reakcyjnej, mającej pojemność nie mniej niż 10-krotnie większą od gramatury wsadu i rozpuszcza się w niej wsad w niewielkiej ilości bakteriologicznie unieczynnionej wody technologicznej, zwłaszcza wody destylowanej, w stosunku wagowym nie przekraczającym 1:1, przy jednoczesnym okresowym mieszaniu mechanicznym prowadzonym w temperaturze otoczenia nie wyższej niż 28°C, w czasie utrzymywany w przedziale od 5 min do 30 min, lecz najkorzystniej wynoszącym 10 min i tak sporządzony 50%-wy roztwór wodny, poddaje się dwukrotnie ekstrahowaniu chloroformem w celu pozbycia się śladowych ilości nie przereagowanej pochodnej O-tosylowej o wzorze (3), po którego zakończeniu, warstwę wodną znajdującą się w technologicznym naczyniu reakcyjnym, zatęża się przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem i uzyskuje się około 0,107 g tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, mającego postać gęstopłynnej substancji olejistej o masie nie mniejszej niż 0,100 g (wydajność 92.2%) i o $R_f = 0,4$ (układ $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ w stosunku jak 3:1).

Sposób otrzymywania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, spełniając założone cele, wykazuje jednocześnie szereg zalet. Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR 400 MHz) oraz spektrometrii mas (MALDI TOF-MS), potwierdzają czystość otrzymanego tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego według wzoru (4). Tytułowe związki można otrzymać wyłącznie opracowaną według wynalazku metodą.

Zapis analizy NMR przedstawia się następująco: ^1H NMR (D_2O): δ 1.41 i 1.53 (2s, każdy 3H, CMe_2), 2.42 (s, 3H, MePh), 4.09 (dd, 2H, $J_{1,1}$ 11.4, H-1' x 2), 4.14 (d, 2H, $J_{1,2}$ 12.0, H-1 x 2), 4.34 (m, 2H, $J_{4,5}$ 1.6, H-5' x 2), 4.41 (dd, 2H, $J_{4,5}$ 4.0, $J_{5,5'}$ 14.8, H-5 x 2), 4.48 (m, 2H, H-4 x 2), 4.87 (d, 2H, $J_{2,3}$ 6.0, H-3 x 2), 5.09 (dd, 2H, $J_{1,2}$ 3.4, H-2 x 2), 7.40 i 7.73 (2s, każdy 2H, Ph), 8.91 i 7.61 (3H, imidazol); ^{13}C NMR (D_2O): δ 123.11 (C, imidazol), 142.69, 140.00, 129.66, 125.59 (C, Ph), 113.58 (C, CMe_2), 83.17 (C-4), 82.00 (C-3), 80.85 (C-2), 71.27 (C-1), 47.97 (C-5), 25.44 i 23.75 (Me_2 , CMe_2), 20.68 (MePh). MALDI TOF-MS (CHCA): m/z 381.27 ($[\text{M} - \text{OTs}]^+$). Otrzymana sposobem według wynalazku czwartorzędowa sól 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowa będzie prawdopodobnie wykazywać korzystne właściwości przeciwgrzybicze.

Wynalazek jest szczegółowo opisany na przykładzie jego wykonania i zilustrowany na schemacie, przedstawiającym zapisy czterech związków (1), (2), (3) i (4), biorących udział w reakcjach prowadzonych wynalezionym sposobem.

W celu otrzymania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, użyto 0,069 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) 1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-0-tosylo-D,L-rybitolu o wzorze (3), oraz 0,0145 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) imidazolu. Oba reagenty umieszczono w szczelnie zamkniętym termostatowanym naczyniu technologicznym, zwłaszcza w szklanej ampułce i poddano ogrzewaniu w urządzeniu grzejnym o temperaturze 115°C, przez 119 godzin, po którego upływie reakcję przerywano, a naczynie technologiczne ochłodzono w warunkach naturalnych do temperatury otoczenia. Tak otrzymany surowy produkt przeniesiono z termostatowanego naczynia technologicznego do kolby reakcyjnej, mającej pojemność 10-krotnie większą od gramatury wsadu i rozpuszczono znajdujący się w niej wsad w niewielkiej ilości bakteriologicznie unieczynnionej wody technologicznej destylowanej, w stosunku wagowym 1:1, przy jednoczesnym okresowym mieszaniu mechanicznym prowadzonym w temperaturze otoczenia w czasie około 10 min. Tak sporządzony 50%-wy roztwór wodny, poddano następnie dwukrotnie ekstrakcji chloroformem w celu pozbycia się śladowych ilości nie przereagowanej pochodnej O-tosylowej o wzorze (3), po którego zakończeniu, warstwę wodną znajdującą się w technologicznym naczyniu reakcyjnym, zatężono przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem. W wyniku tak przeprowadzonego przykładowo procesu, uzyskano około 0,107 g tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, mającego postać gęstopłynnej substancji olejistej o masie nie mniejszej niż 0,100 g (wydajność 92.2%) i o $R_f = 0,4$ (układ $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ w stosunku jak 3:1).

W Zakładzie Enzymologii Molekularnej MWB UG-AMG w Gdańsku, przeprowadzono badania dotyczące określenia aktywności biologicznej jako działania hamującego na izolowane enzymy i linie komórkowe oraz zdolności rozkładu biologicznego związków (katabolizmu) w niefrakcjonowanych homogenatach tkanek zwierzęcych. Zastosowane były standardowe metody pomiaru aktywności deaminazy AMP poprzez mierzenie ilości gromadzącego się produktu reakcji - amoniaku metodą Chaney'a i Marbacha lub poprzez sprzęgnięcie z reakcją dehydrogenazy glutaminianowej i spektrofotometrię koenzymu ostatniej reakcji NAD-PH. Kinetyka reakcji oraz zależność od stężeń substratów i efektów reakcji były zbadane z użyciem modelu Dixona, który pozwolił sformułować wstępną hipotezę o mechanizmie działania związków egzogennych na reakcję deaminacji AMP. Żywotność komórek w obecności badanych związków była kontrolowana metodą kolorymetryczną z użyciem systemu WST. Pomiar ilości powstających w homogenatach tkanek zwierzęcych katabolitów badanych związków był dokonany z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej i kolumn zawierających różne złoża. W celach porównawczych wskazane badania przeprowadzono z wieloma czwartorzędowymi solami amoniowymi: np. tosyłanem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, chlorkiem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, tetrafluoroboranem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, bromkiem *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)trimetylo-amoniowym i bromkiem *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)pirydyniowym.

Badania te wykazały, że dwie czwartorzędowe sole amoniowe: bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)trimetyloamoniowy i bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)pirydyniowy wykazywały aktywność inhibitorową typu niekompetycyjnego (odpowiednie $C_{50\%} = 0,05$ i 0,5 mM), wobec deaminazy AMP (AMD-DA) izolowanej z mięśni szkieletowych szczura [patrz literatura A. Składanowski, P. Stepnowski, K. Kleszczyński, B. Dmochowska, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19(2), 291]. Z uwagi na istotną rolę tego enzymu w metabolizmie nukleotydów purynowych i jego powszechność występowania, efekty takie mogą mieć znaczenie toksyczne i ekotoksyczne. U podstaw syntezy tej grupy związków leżało m.in. wprowadzenie ugrupowania cukrowego uważanego powszechnie za zdolne do szybkiej degradacji biologicznej. Jednakże, czwartorzędowe sole amoniowe pochodne imidazolu z dużo większą siłą hamowały aktywność enzymu w porównaniu do czwartorzędowych soli *N*-D-glukopiranozyloamoniowych.

Najnowsze badania nad czwartorzędowymi solami trimetyloamoniowymi pochodnymi anhydroalditoli dotyczą syntezy 3-hydroksymuskaryny tj. tosyłanu *N*-[(2S,3S,4R,5S)-2,5-anhydro-1,6-dideoksyheksitol-6-ilo]trimetyloamoniowego z L-ramnozy. Pochodne muskaryny mają zastosowanie w chemioterapii i w leczeniu choroby Alzheimera [patrz literatura Manteu S. J., Ford P. S., Watkin D. J., Fleet G. W. J., Brown D., *Tetrahedron*, 1993, 49, 3343].

Na podstawie opisanych wyników uznać można za wysoce prawdopodobne, że tosyłan 1,3-bis-(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowy według wzoru (4) otrzymany sposobem według wynalazku, posiadający w swej strukturze imidazol i anhydroalditol, będzie wykazywał większą aktywność biologiczną niż przebadane czwartorzędowe sole *N*-D-glukopitanyloamoniowe.

Po przeprowadzeniu badań potwierdzających właściwości przeciwgrzybicze tosyłanu 1,3-bis-(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, otrzymanego sposobem według wynalazku, związek będzie mógł być wykorzystany w medycynie, jak również w przemyśle farmaceutycznym.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, **znamienny tym**, że od 0,050 g do 0,075 g lecz najkorzystniej 0,069 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) 1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-O-tosylo-DL-rybitolu o wzorze (3), oraz od 0,010 g do 0,0160 g, lecz najkorzystniej 0,0145 g ($2,2 \cdot 10^{-4}$ mola) imidazolu, umieszcza w szczelnie zamkniętym termostatowanym naczyniu technologicznym, zwłaszcza w szklanej ampułce i poddaje ogrzewaniu w urządzeniu grzejnym o temperaturze 115°C z tolerancją utrzymywana w przedziale $+ - 5^{\circ}\text{C}$, przez okres utrzymywany w przedziale od 100 godzin do 125 godzin, lecz najkorzystniej 119 godzin, po którego upływie reakcję przerywa się, naczynie technologiczne chłodzi się w warunkach naturalnych do temperatury otoczenia, a tak otrzymany surowy produkt przenosi się z termostatowanego naczynia technologicznego do innego naczynia technologicznego, zwłaszcza do kolby reakcyjnej, mającej pojemność nie mniej niż 10-krotnie większą od gramatury wsadu i rozpuszcza się w niej wsad w niewielkiej ilości bakteriologicznie unieczynnionej wody technologicznej, zwłaszcza wody destylowanej, w stosunku wagowym nie przekraczającym 1:1, przy jednoczesnym okresowym mieszaniu mechanicznymi prowadzonym w temperaturze otoczenia nie wyższej niż 28°C, w czasie utrzymywany w przedziale od 5 min do 30 min, lecz najkorzystniej wynoszącym 10 min i tak sporządzony 50%-wy roztwór wodny, poddaje się dwukrotnie ekstrahowaniu chloroformem w celu pozbycia się śladowych ilości nie przereagowanej pochodnej O-tosylowej o wzorze (3), po którego zakończeniu, warstwę wodną znajdującą się w technologicznym naczyniu reakcyjnym, zatęża się przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem i uzyskuje się około 0,107 g tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-O-izopropylideno-5-deoksy-D,L-tybitol-5-ilo)-imidazol-3-iowego, mającego postać gęstopłynnej substancji oleistej o masie nie mniejszej niż 0,100 g (wydajność 92.2%) i o $R_f = 0,4$ (układ $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ w stosunku jak 3:1).

Rysunek

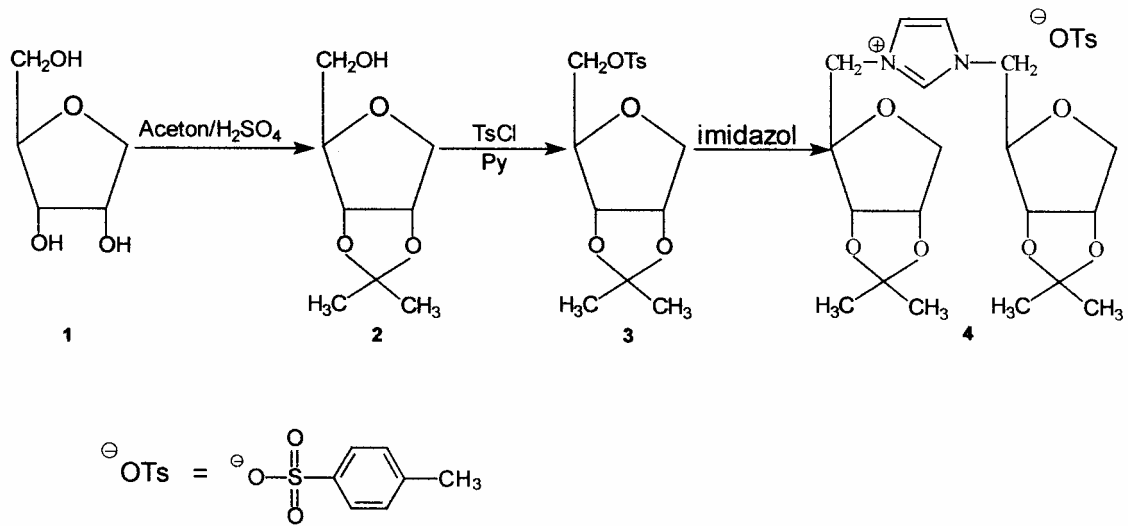


FIG. 1

