

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **231879**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422972**

(51) Int.Cl.

C07C 245/08 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **26.09.2017**

(54) **Pochodne azobenzenu z aminokwasami oraz sposób ich wytwarzania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.06.2018 BUP 12/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2019 WUP 04/19

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA MATCZYSZYN, Wrocław, PL

PIOTR MŁYNARZ, Kielczów, PL

ZIEMOWIT POKŁADEK, Kielce, PL

MARTA DUDEK, Wrocław, PL

MARCO DEINA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 231879 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne azobenzenu z aminokwasami znajdujące zastosowanie głównie jako przełączniki molekularne w biologii. Związki będące przedmiotem wynalazku umożliwiają kontrolę aktywności biomolekuł, w zależności od tego, w jakiej formie występuje pochodna azobenzenu, jak i także od typu użytego enancjomeru danego aminokwasu. Przedmiotem wynalazku jest również sposób ich wytwarzania.

Dotychczas w literaturze naukowej oraz patentowej nie została opisana żadna z pochodnych azobenzenu z aminokwasami będąca przedmiotem wynalazku oraz sposobu ich wytwarzania.

Istotą wynalazku są pochodne azobenzenu z aminokwasami: 4,4'-di(2S,3S-treonyloamino)azobenzen i 4,4'-di(2R,3R-treonyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną treoniny, 4,4'-di(S- α -lizyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R- α -lizyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną lizyny oraz 4,4'-di(S-aspartyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R-aspartyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną asparaginy.

Sposób wytwarzania pochodnych azobenzenu z aminokwasami 4,4'-di(2S,3S-treonyloamino)azobenzen i 4,4'-di(2R,3R-treonyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną treoniny, 4,4'-di(S- α -lizyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R- α -lizyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną lizyny oraz 4,4'-di(S-aspartyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R-aspartyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną asparaginy polega na tym, że do roztworu odpowiedniego aminokwasu w dimetyloformamidzie dodaje się DIPEA (ang. N,N-diisopropylethylamine), HATU (ang. 2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) oraz 4,4'-diaminoazobenzen. Kolejno otrzymane pochodne azobenzenu zawiesza się w acetonitrylu i dodaje się dietyloaminę. Następnie rozpuszczalnik usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem, a osad rozpuszcza się w dichlorometanie i dodaje się kwas trifluorooctowy. Rozpuszczalnik usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem, w efekcie czego, otrzymuje się pochodne azobenzenu z aminokwasami S lub R o wzorze ogólnym 1, w formie soli kwasu trifluorooctowego, w postaci pomarańczowego lub czerwonego proszku.

Wytworzone według wynalazku pochodne azobenzenu z aminokwasami charakteryzują się wysoką rozpuszczalnością w wodzie oraz niską stabilnością termiczną formy *cis*, czas połowicznego zaniku formy *cis* w temperaturze 25°C wynosi ok. 25 minut. Naświetlanie formy *trans* światłem o długości fali 380 nm powoduje przejście *trans-cis*, natomiast użycie światła $\lambda \geq 500$ nm powoduje izomeryzację *cis-trans*. Pochodne azobenzenu z aminokwasami: lizyną (L, D) treoniną (L, D) oraz asparaginą (L, D) selektywnie oddziałują z biomolekułami np. albuminą ludzką. Białko z definicji jest chiralne, przez co wykorzystanie chiralnych pochodnych azobenzenu umożliwia sterowanie właściwościami HSA w zależności od rodzaju użytego enancjomeru. Ponadto, możliwe jest sterowanie właściwościami białka w zależności od formy, w której występuje pochodna azobenzenu.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania oraz na schematach reakcji.

Przykład 1

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. 2S,3S-9-fluorenylometoksykarbonylo(*O*-*tert*-butylo)treoniny, 50 eq. dimetyloformamidu, 4.8 eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek: 4,4'-di[2S,3S-9-fluorenylometoksykarbonylo(*O*-*tert*-butylo)treonyloamino]azobenzen, umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient: woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di(2S,3S-treonyloamino)azobenzenu z wydajnością odpowiednio: 56%.

Otrzymany produkt w formie *trans* charakteryzuje się następującymi właściwościami spektroskopowymi:

- **4,4'-di(2S,3S-treonyloamino)azobenzen**

¹H NMR (601 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.47 - 7.36 (m, 8H), 4.22 (p, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.98 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.29 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide) δ :

166.25, 148.67, 138.99, 123.44, 121.04, 66.31, 59.21, 18.83.

Przykład 2

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. 2*R*,3*R*-9-fluorenylometoksykarbonylo(*O*-*tert*-butylo)treoniny, 50 eq. dimetyloformamidu, 4.8 eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek: 4,4'-di[2*R*,3*R*-9-fluorenylometoksykarbonylo(*O*-*tert*-butylo)treonyloamino]azobenzen, umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient: woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di(2*R*,3*R*-treonyloamino)azobenzenu z wydajnością 58%.

Otrzymany produkt w formie *trans* charakteryzuje się następującymi właściwościami spektroskopowymi:

- **4,4'-di(2*R*,3*R*-treonyloamino)azobenzen**

^1H NMR (601 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.57 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.51 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 4.2-4.18 (m, 2H), 1.34 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide) δ :

166.35, 148.81, 139.06, 123.48, 121.22, 66.30, 59.22, 18.82

Przykład 3

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. *S*- α -9-fluorenylometoksykarbonylo(ω -*tert*-butoksykarbonylo)lizyny, 50 eq. dimetyloformamidu, 4.8 eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek: 4,4'-di[*S*- α -9-fluorenylometoksykarbonylo(ω -*tert*-butoksykarbonylo)lizyloamino]azobenzen umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient: woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di[*S*- α -lizyloamino]azobenzenu z wydajnością 45%.

- **4,4'-di(*S*- α -lizyloamino)azobenzen**

^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.75 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 4.17 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.98 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 2.11-1.90 (m, 4H), 1.76-1.63 (m, 4H), 1.59-1.40 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, Deuterium Oxide) δ :

168.22, 149.12, 139.23, 123.57, 121.48, 53.71, 39.00, 30.51, 26.44, 21.33.

Przykład 4

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. *R*- α -9-fluorenylometoksykarbonylo(ω -*tert*-butoksykarbonylo)lizyny, 50 eq. dimetyloformamidu, 4.8 eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek: 4,4'-di[*R*- α -9-fluorenylometoksykarbonylo(ω -*tert*-butoksykarbonylo)lizyloamino]azobenzen umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient:

woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di(*R*- α -lizyloamino)azobenzenu z wydajnością odpowiednio 46%.

• **4,4'-di(*R*- α -lizyloamino)azobenzen**

¹H NMR (601 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 4.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.06-2.96 (m, 4H), 2.11-1.95 (m, 4H), 1.80-1.67 (m, 4H), 1.59-1.49 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide) δ :

168.18, 149.09, 139.19, 123.53, 121.45, 53.68, 38.97, 30.47, 26.41, 21.30.

Przykład 5

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. *S*-9-fluorenylometoksykarbonyloasparaginanu *tert*-butyloвого, 50 eq. dimetyloformamidu, eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek di-*tert*-butylo 4,4'-[*S*-(9-fluorenylometoksykarbonylo-aspartyloamino)azobenzen umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient: woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di(*S*-aspartyloamino)azobenzenu z wydajnością 50%.

• **4,4'-di(*S*-aspartyloamino)azobenzen**

¹H NMR (601 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.51 - 7.37 (m, 8H), 4.47 (dd, *J* = 7.7, 4.9 Hz, 2H), 3.17 - 3.05 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide) δ :

172.58, 166.67, 148.58, 139.03, 123.47, 120.99, 50.21, 34.86.

Przykład 6

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 2.4 eq. *R*-9-fluorenylometoksykarbonyloasparaginanu *tert*-butyloвого, 50 eq. dimetyloformamidu, 4,8 eq. DIPEA oraz 2.4 eq. HATU, a następnie dodaje się 1 eq. 4,4'-diaminoazobenzenu. Roztwór pozostawia się na mieszanie na 12 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wykonuje się ekstrakcję w układzie woda/eter dietylowy (3 x 50 mL), fazę organiczną suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek di-*tert*-butylo 4,4'-[*R*-9-fluorenylometoksykarbonyloaspartyloamino]azobenzen umieszcza się w acetonitrylu, a następnie dodaje się taką samą ilość dimetyloaminy. Roztwór miesza się przez 1 h, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Osad zawiesza się dichlorometanem oraz dodaje się kwas trifluorooctowy. Roztwór miesza się przez 2 godziny, po czym odparowuje się rozpuszczalnik wraz z kwasem trifluorooctowym pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą HPLC, stosując gradient: woda/acetonitryl 95/5 do 30/70 w czasie 30 min. W efekcie otrzymuje się czerwony lub pomarańczowy proszek 4,4'-di(*R*-aspartyloamino)azobenzenu z wydajnością 52%.

• **4,4'-di(*R*-aspartyloamino)azobenzen**

¹H NMR (601 MHz, Deuterium Oxide) δ :

7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 4.39 (dd, *J* = 7.7, 4.9 Hz, 2H), 3.12-2.96 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide) δ :

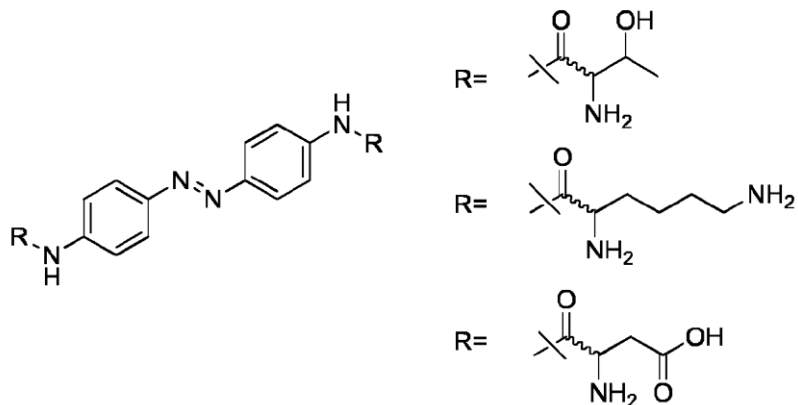
172.61, 166.75, 148.67, 139.07, 123.48, 121.13, 50.20, 34.86.

Zastrzeżenia patentowe

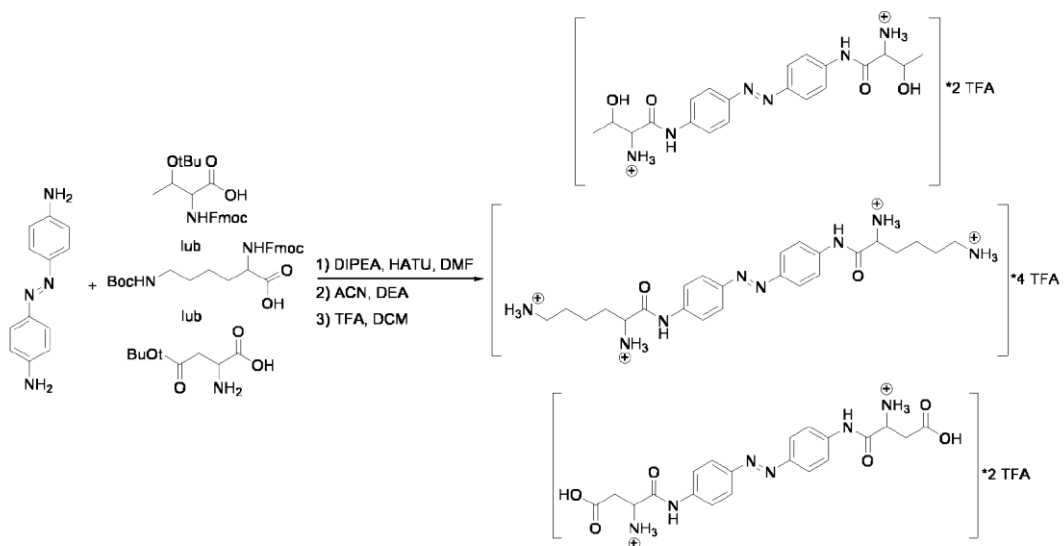
1. Pochodne azobenzenu z aminokwasami w postaci: 4,4'-di(2*S*,3*S*-treonyloamino)azobenzen i 4,4'-di(2*R*,3*R*-treonyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną treoniny, 4,4'-di(*S*- α -lizyloamino)azobenzen i 4,4'-di(*R*- α -lizyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną lizyny oraz 4,4'-di(*S*-aspartyloamino)azobenzen i 4,4'-di(*R*-aspartyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną asparaginy.

2. Sposób wytwarzania pochodnych azobenzenu z aminokwasami w postaci: 4,4'-di(2S,3S-treonyloamino)azobenzen i 4,4'-di(2R,3R-treonyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną treoniny, 4,4'-di(S- α -lizyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R- α -lizyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną lizyny oraz 4,4'-di(S-aspartyloamino)azobenzen i 4,4'-di(R-aspartyloamino)azobenzen o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza pochodną asparaginy, **znamienny tym**, że do roztworu odpowiedniego aminokwasu: 2S,3S- (lub 3S,3R)-9-fluorenylometoksykarbonylo(*O*-*tert*-butylo)treoniny, S (lub R)- α -9-fluorenylometoksykarbonylo(ω -*tert*-butoksykarbonylo)lizyny oraz S (lub R)-9-fluorenylometoksykarbonyloasparaginianu *tert*-butylowego w dimetyloformamidzie dodaje się DIPEA, HATU oraz 4,4'-diaminoazobenzen, kolejno odblokowuje się grupy aminowe poprzez zawieszenie danego związku w acetonitrylu oraz dodanie dietyloaminy, po czym rozpuszczalnik usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie usuwa się grupy ochronne: Boc lub tBu poprzez zawieszenie osadu w dichlorometanie oraz dodanie kwasu trifluorooctowego, w efekcie czego, po odparowaniu rozpuszczalnika, otrzymuje się: 4,4'-di-(2S,3S-treonyloamino)azobenzen, 4,4'-di(2R,3R-treonyloamino)azobenzen, 4,4'-di(S- α -lizyloamino)azobenzen, 4,4'-di(R- α -lizyloamino)azobenzen, 4,4'-di(S-aspartyloamino)azobenzen lub 4,4'-di(R-aspartyloamino)azobenzen w formie soli kwasu trifluorooctowego, w postaci pomarańczowego lub czerwonego proszku.

Rysunki



Wzór ogólny 1



Schemat reakcji 1