

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 285 985 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 08 G 65/32  
C 08 G 65/48

**DEUTSCHES PATENTAMT**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	DD C 08 G / 331 000 6	(22)	20.07.89	(44)	10.01.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

---

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, Berlin, 1115, DD
(74)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, Arbeitsgemeinschaft Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, Berlin, 1115, DD

---

(54)	<b>Verfahren zur Herstellung von aktivierten Polymeren aus thiolgruppenhaltigen Polymeren</b>
------	---

---

(55) Verfahren; Aktivierung; Thiolgruppen; Chlorameisensäureester

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von aktivierten Polymeren aus thiolgruppenhaltigen Polymeren. Polymere mit Thiolgruppen werden mit geeigneten Chlorameisensäureestern in organischen Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart von säurebindenden Mitteln, in hochreaktive Verbindungen der Polymeren überführt, die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Diese aktivierten Derivate können zur Modifizierung von Verbindungen mit nukleophilen Eigenschaften eingesetzt werden. Die modifizierten, aktivierte Gruppen tragenden Polymeren finden in der Biotechnologie, Biochemie, Chemie und Pharmazie Anwendung.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Polymeren aus thiolgruppenhaltigen Polymeren, dadurch gekennzeichnet, daß Polymere der Struktur



$R_1 = SH$ , O-Alkyl mit Alkyl von  $C_1$  bis  $C_4$  bedeuten, in einem organischen Lösungsmittel oder einem Gemisch organischer Lösungsmittel im Verlaufe von 15 Minuten bis 6 Stunden bei  $0^\circ C$  bis  $120^\circ C$ , gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, mit aktivierten Estern der Struktur



$R_2 = p$ -Nitrophenyl, 2,4,6-Trichlorphenyl, Succinimidyl, 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl oder Benztriazolyl bedeuten, zu Polymeren der Struktur



$R_1$  und  $R_2$  die oben genannte Bedeutung besitzen und die gebildeten aktivierten Polymerenderivate durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch beziehungsweise durch Ausfällen mit Ether oder Petrolether aus den Reaktionslösungen isoliert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel aliphatische, halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Methylchlorid und Chloroform oder aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid oder Gemische dieser Lösungsmittel oder Gemische dieser Lösungsmittel mit Ketonen wie Aceton, beziehungsweise mit cyclischen Ethern wie Tetrahydrofuran und Dioxan, beziehungsweise mit Essigsäurealkylestern wie Essigsäureethylester verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel Verbindungen wie Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Trialkylamine oder stickstoffhaltige Heteroaromaten verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen bei Umgebungstemperatur bis zu  $100^\circ C$  erfolgen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als aktivierter Ester N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid eingesetzt wird.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung aktivierter Polymere aus Polymeren, die Thiolgruppen kovalent gebunden enthalten und deren Anwendung in der Biotechnologie, Biochemie, Chemie und Pharmazie erfolgen kann.

**Charakteristik des bekannten Standes der Technik**

Die Aktivierung von Polymeren besitzt in der Biotechnologie und Biochemie eine herausragende Stellung, da erst nach diesem in der Regel chemischen Reaktionsschritt eine kovalente Verknüpfung der Polymeren mit biologisch aktiven Verbindungen, die nukleophile Gruppen besitzen, möglich wird. Auf diese Weise werden der größte Teil der zur Stoffwandlung mit Biokatalysatoren und auch zur Isolierung und Reinigung biologisch aktiver Makromoleküle durch chromatographische Verfahren benötigten Polymeren mit Hydroxylgruppen als funktionelle Gruppen modifiziert (Methods Enzymol. 1988, 137 [Immobilized Enzymes and Cells], Pt's A, B).

Für die Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Polymeren ist die Verwendung geeigneter, aktivierter Ester bekannt (Biotechnol. Bioeng., 1989, 33, 26-31). Eine weite Verbreitung zur Aktivierung von Makromolekülen mit Hydroxylgruppen wie Cellulose, Sepharose, Poly-hydroxyethylmethakrylat, Dextrane oder Polyethylenglykol haben bisher die Chlorameisensäureester des p-Nitrophenols, des 2,4,6-Trichlorphenols oder des N-Hydroxycuccinimids als aktivierte Ester gefunden. Ihre Anwendungseigenschaften, zum Beispiel bei der Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen, befriedigen aber in vielen Fällen nicht.

### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von aktivierten Polymeren aus thiolgruppenhaltigen Polymeren zu entwickeln, die in wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln löslich sind, sich durch eine hinreichende, hydrolytische Stabilität unter Lagerungsbedingungen und eine hohe Reaktivität gegenüber Verbindungen mit nukleophilen Gruppen auszeichnen.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Herstellung neuartiger, aktivierter Derivate von thiolgruppenhaltigen Polymeren mit oben genannten Eigenschaften. Erfindungsgemäß werden thiolgruppenhaltige Polymerenderivate der allgemeinen Formel  $R_1-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-SH$  mit einem aktivierten Ester der allgemeinen Formel  $Cl-CO-O-R_2$  umgesetzt, wobei  $R_1 = SH$ , O-Alkyl mit Alkyl von  $C_1$  bis  $C_4$  und  $R_2 = p$ -Nitrophenyl, 2,4,6-Trichlorphenyl, Succinimidyl, 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl oder Benzotriazolyl bedeuten. Die Reaktionszeiten für die Aktivierungsreaktionen liegen im Bereich von 15 Minuten bis 6 Stunden, wobei die längeren Reaktionszeiten für die Umsetzungen bei Vorliegen von Suspensionen zutreffen. Als Reaktionstemperaturen werden Temperaturen im Bereich von  $0^\circ C$  bis  $120^\circ C$  angewendet, vorzugsweise von Umgebungstemperatur bis  $100^\circ C$ . Da während der Reaktion Salzsäure freigesetzt wird, empfiehlt es sich, zur Erhöhung der Aktivierungsausbeuten in Gegenwart eines säurebindenden Mittels zu arbeiten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird damit begonnen, daß das thiolgruppenhaltige Polymer vorzugsweise in einem halogenierten, aliphatischen Kohlenwasserstoff wie Chloroform oder Methylenchlorid beziehungsweise einem aromatischen Kohlenwasserstoff wie Benzen oder Toluol aufgelöst wird und dazu eine Lösung des Chloramidsäureesters in den gleichen Lösungsmitteln oder in einem Keton oder in einem cyclischen Ether – von Vorteil ist es, in Aceton oder Dioxan aufgelöstes N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid zu verwenden – bei Umgebungstemperatur zugetropft wird.

Erfindungsgemäß erfolgt die Aktivierung auch in aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Acetonitril allein oder in Gemischen dieser aprotischen Lösungsmittel mit Ketonen wie Aceton oder mit cyclischen Ethern wie Tetrahydrofuran und Dioxan oder Essigsäurealkylestern wie Essigsäureethylester. Letztere Ester werden auch verwendet, wenn in Gemischen mit Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol gearbeitet wird.

Erfindungsgemäß wird zum Erreichen hoher Aktivitätsausbeuten und vor allem bei großen Reaktionsansätzen auch in Gegenwart einer basischen Verbindung gearbeitet, um die freigesetzte Salzsäure zu binden, was vorzugsweise Triethylamin oder Pyridin sein sollten. In diesen Fällen wird das säurebindende Mittel gemeinsam mit den thiolgruppenhaltigen Polymeren aufgelöst und in der Reaktionslösung vorgelegt.

Nach dem Vermischen der Reaktionskomponenten, vorzugsweise bei Umgebungstemperatur, wird die Reaktionstemperatur erhöht, wobei in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch vorteilhafterweise bei Temperaturen im Bereich von  $50^\circ C$  bis  $100^\circ C$  weiter gearbeitet wird. Dadurch werden hochaktivierte Polymere innerhalb sehr kurzer Reaktionszeiten von 15 Minuten bis 3 Stunden erhalten.

Zur Isolierung der aktivierten Polymeren werden die organischen Lösungsmittel abdestilliert – bei Verwendung von hochsiedenden Lösungsmitteln oder säurebindenden Mitteln gegebenenfalls unter Anwendung eines Vakuums – oder die Reaktionslösungen werden eingeengt und mit Ether oder Petrolether versetzt. Die nach beiden Methoden anfallenden Feststoffe werden zur weiteren Reinigung in Chloroform, Methylenchlorid, Benzen oder Toluol aufgelöst und durch Versetzen dieser Lösungen mit Ether oder Petrolether wieder isoliert.

Die neuen, aktivierten Polymeren der thiolgruppenhaltigen Polymere sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sowohl in wässrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Sie besitzen eine hohe Reaktivität gegenüber Verbindungen mit nukleophilen Gruppen und werden in organischen Lösungsmitteln – ausgenommen solchen mit nukleophilen Gruppen – ohne besondere Vorkehrungen aufbewahrt. Durch diese Eigenschaften sind sie vorteilhaft geeignet für eine Anwendung in der Biotechnologie, Biochemie, Chemie und Pharmazie.

Die Erfindung wird nachfolgend durch Beispiele weiter erklärt.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

3g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 100ml Chloroform aufgelöst, dem 2ml Triethylamin zugesetzt worden waren. Unter Rühren werden dieser Lösung bei Umgebungstemperatur 1g in 20ml Aceton aufgelöstes N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid tropfenweise zugesetzt. Die Reaktionstemperatur wird auf  $70^\circ C$  erhöht, und nach 60 Minuten wird damit begonnen, die Lösungsmittel bei einer Temperatur bis zu  $70^\circ C$  zu entfernen. Der resultierende Feststoff wird mit 25ml Chloroform versetzt, die Suspension wird danach filtriert und die Chloroformlösung wird auf 10ml eingeengt. Zur restlichen Lösung werden 50ml Petrolether addiert, die Lösung wird auf  $4^\circ C$  abgekühlt, und der Niederschlag wird nach dem Abfiltrieren mit Ether gewaschen, getrocknet und über Calciumchlorid aufbewahrt.  
Ausbeute: 3g

#### Beispiel 2

0,2g N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid werden in 20ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,5g festes w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylenglykol in Form des Natriumsalzes addiert. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei  $60^\circ C$  gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Dimethylformamid im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 10ml Methylenchlorid aufgenommen, die Suspension wird filtriert und die resultierende Lösung wird auf 5ml eingeengt. Zu dieser Lösung werden 20ml Petrolether addiert, der anfallende Niederschlag wird abgetrennt, mit Ether gewaschen, getrocknet und über Calciumchlorid aufbewahrt.

**Beispiel 3**

3g w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylenglykol werden in 100ml getrocknetem Benzen gelöst. 2 ml Pyridin werden zu der Lösung addiert und danach 1 g in 20 ml wasserfreiem Aceton aufgelöster Chlorameisensäureester des N-Hydroxysuccinimids. Das Reaktionsgemisch wird auf 70°C erwärmt, und die Umsetzung wird in 2 Stunden zu Ende gebracht. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert und der Rückstand wird wie in den Beispielen 1 und 2 aufgearbeitet.  
Ausbeute: 1,9g